

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491398 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.21

(51) Int. Cl. A61K 9/127 (2006.01)
A61K 49/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.01

(54) ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАХВАЧЕННОГО ОБЪЕМА ЛИПОСОМЫ

(31) 63/295,896

(32) 2022.01.02

(33) US

(86) PCT/IL2023/050003

(87) WO 2023/126947 2023.07.06

(71) Заявитель:

МЁБИУС МЕДИКАЛ ЛТД.;
ЙИССУМ РИСЕРЧ ДЕВЕЛОПМЕНТ
КОМПАНИ ОФ ЗЕ ХИБРЮ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЕРУСАЛИМ
ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:

Баренхольц Йехезкель, Турджеман
Керен, Пинкус Рон (IL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу определения захваченного объема и захваченного водного объема множества липосом в липосомальной композиции. Указанный способ можно использовать для расчета концентрации активного фармацевтического ингредиента, заключенного в липосомы, и для обеспечения качества предварительно полученной липосомальной композиции.

A1

202491398

202491398

A1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАХВАЧЕННОГО ОБЪЕМА ЛИПОСОМЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к способу определения захваченного объема липосомы и его применению для определения характеристик липосом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Захваченный объем (V_t) и захваченный водный объем (V_{taq}) липосом являются важными параметрами при определении характеристик липосом, в частности, поскольку они определяют объем, доступный для инкапсуляции активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Таким образом, определение V_t и V_{taq} позволяет рассчитать концентрацию инкапсулированного в липосомы АФИ в липосомальной композиции. В
15 композициях, содержащих пустые липосомы, захваченный объем и захваченный водный объем являются важными характеристиками структуры липосом и их свойств.

Захваченный объем липосом можно определить с помощью различных способов, большинство из которых включают определение маркера, захваченного внутрь липосом, после удаления незахваченного маркера. Такой способ может подходить для всех типов
20 липосом при условии, что указанный маркер не просачивается из липосом и может быть обеспечено эффективное разделение липосом и вnelипосомальной среды. Однако такой подход требует инкапсуляции маркера во время получения липосомы. Соответственно, его нельзя использовать для исследования партий, предназначенных для клинического применения.

25 Oku et al. (*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 691(2), 1982, 332-340) описывают способ определения объема водного компартмента липосом с применением флуоресцентного красителя, кальцеина. Долю общего объема, находящегося в липосомах, получают как долю флуоресценции, которая сохраняется после добавления ионов кобальта(II), которые, при образовании хелатных комплексов с кальцеином, гасят его
30 флуоресценцию.

Perkins et al. (*Chemistry and Physics of Lipids*, 64, 1993, 197-217) описывают несколько способов количественного определения захваченного объема липосомы. В первом способе использовали $^3\text{H}_2\text{O}$ и ^{14}C -глюкозу для маркировки общего водного объема и внешнего объема. Такой способ основан на различии кинетики проницаемости мембраны для $^3\text{H}_2\text{O}$

по сравнению с ^{14}C -глюкозой. Указанный способ осуществляли при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для предотвращения связывания и проникновения глюкозы, а также снижения риска вдыхания паров $^3\text{H}_2\text{O}$. Второй способ, называемый ViVo, осуществляли путем добавления спинового зонда ESR (электронный парамагнитный резонанс) 4-триметиламмония TEMPO (CAT1) к
5 общему объему 1 мл образца, а затем сравнения концентрации зонда в супернатанте, расположенном выше центрифугированного осадка, с концентрацией зонда в общем объеме с помощью стандартной кривой.

Существует неудовлетворенная потребность в точном послепроизводственном измерении захваченного объема липосом, которое можно использовать для определения
10 характеристик липосомальных композиций, подходящих для клинического применения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении описан послепроизводственный способ определения
15 захваченного объема и захваченного водного объема липосом, и их применение для определения характеристик и контроля качества серийного производства липосом для клинического применения.

Настоящее изобретение частично основано на обнаружении простого, точного и воспроизводимого способа определения захваченного объема и захваченного водного
20 объема липосом. В предложенном способе используют маркер с молекулярной массой 1 кДа или выше, который не проникает в липосомы и не встраивается в липидную мембрану или не связывается с ней, присутствуя, таким образом, исключительно во внешней водной фазе. После отделения липосом от суспендирующей жидкости (например, с помощью центрифугирования) измеряют увеличение концентрации маркера в жидкости, поскольку
25 как липидная мембрана, так и внутрилипосомальная водная среда занимают часть объема дисперсии, но не содержат маркер. Такое увеличение концентрации свидетельствует о захваченном объеме. Расчет захваченного объема основан на объеме внешней водной среды, определенном из отношения сигнала, индуцированного маркером в суспендирующей жидкости после отделения липосом, к общему сигналу перед отделением.
30 В некоторых вариантах реализации расчет может быть дополнительно основан на определении сигнала, индуцированного маркером в суспендирующей жидкости и в содержащем липосомы осадке после разделения по сравнению с общим сигналом, индуцированным маркером до разделения.

В отличие от известных в предшествующем уровне техники способов, которые либо не подходят в качестве постпроизводственных способов, либо используют зонды, проникающие в липидный бислой и зависящие от дзета-потенциала и поверхностного заряда липосом, способ согласно настоящему изобретению представляет собой
5 постпроизводственный способ, который является чувствительным, воспроизводимым и в меньшей степени зависит от концентрации маркера, мутности, гашения и т.д. Указанный способ также является относительно простым и более удобным при реализации.

Согласно первому аспекту предложен способ определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом в липосомальной композиции,
10 включающий стадии:

(i) получения липосомальной композиции, содержащей множество липосом с заданной концентрацией липидов, суспендированных или диспергированных в жидкой среде;

(ii) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом
15 указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

(iii) измерения сигнала, индуцированного маркером в указанной липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

(iv) отделения жидкой среды от множества липосом с получением, тем самым,
20 жидкой среды и осадка, содержащего множество липосом и промежуточную среду между липосомами;

(v) измерения сигнала, индуцированного маркером в отделенной жидкой среде, полученной на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять объем жидкой среды и
25 промежуточной среды;

(vi) необязательно измерения сигнала, индуцированного маркером в осадке, содержащем множество липосом и промежуточную среду между липосомами, полученном на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять свободный объем между липосомами
в осадке; и

(vii) расчета захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii) и (v) или на стадиях (iii), (v) и (vi), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

Следует понимать, что при выполнении стадии (vi) стадия (vii) включает расчет захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом

на основе объемов, определенных на стадиях (iii), (v) и (vi), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

Согласно другому аспекту предложен способ определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом в липосомальной композиции, включающий стадии:

(i) получения липосомальной композиции, содержащей множество липосом с заданной концентрацией липидов, суспендированных или диспергированных в жидкой среде;

(ii) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

(iii) измерения сигнала, индуцированного маркером в указанной липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

(iv) отделения жидкой среды от множества липосом с получением, тем самым, жидкой среды и осадка, содержащего множество липосом и промежуточную среду между липосомами;

(v) измерения сигнала, индуцированного маркером в отделенной жидкой среде, полученной на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять объем жидкой среды и промежуточной среды;

(vi) расчета захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii) и (v), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

Следует понимать, что расчет захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii) и (v), включает расчет соотношения между сигналом маркера в отделенной жидкой среде после стадии (iv) и его сигналом в липосомальной композиции перед стадией (iv).

Согласно еще одному аспекту предложен способ определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом в липосомальной композиции, включающий стадии:

(i) получения липосомальной композиции, содержащей множество липосом с заданной концентрацией липидов, суспендированных или диспергированных в жидкой среде;

(ii) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

5 (iii) измерения сигнала, индуцированного маркером в указанной липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

(iv) отделения жидкой среды от множества липосом с получением, тем самым, жидкой среды и осадка, содержащего множество липосом и промежуточную среду между липосомами;

10 (v) измерения сигнала, индуцированного маркером в отделенной жидкой среде, полученной на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять объем жидкой среды и промежуточной среды;

(vi) необязательно измерения сигнала, индуцированного маркером в осадке, содержащем множество липосом и промежуточную среду между липосомами, полученном
15 на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять свободный объем между липосомами в осадке; и

(vii) расчета захваченного объема (V_l) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii), (v) и (vi), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

20 В одном из вариантов реализации определение захваченного объема (V_l) и захваченного водного объема (V_{taq}) включает определение удельного захваченного объема и удельного захваченного водного объема, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации маркер является водорастворимым. Согласно другим вариантам реализации молекулярная масса маркера составляет не менее
25 примерно 2 кДа. В определенных вариантах реализации маркер представляет собой радиоактивный маркер. В конкретных вариантах реализации маркер представляет собой инулин. В других конкретных вариантах реализации маркер представляет собой ^{14}C -карбокси-инулин.

В дополнительных вариантах реализации сигнал, индуцированный маркером,
30 измеряют с применением по меньшей мере одного метода, выбранного из детектирования излучения, калориметрии, флуоресценции, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии в сочетании ГХ (ГХ-МС), инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, ЯМР,

колориметрии, спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра и их комбинаций. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

5 В различных вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество липосом, выбранных из группы, состоящей из однослойных везикул (SUV), крупных однослойных везикул (LUV), гигантских однослойных везикул (GUV), олигослойных везикул (OLV), многослойных везикул (MLV), мультивезикулярных липосом (MVL) и их смеси или комбинации. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

10 В определенных вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество липосом размером в диапазоне от примерно 0,3 мкм до примерно 50 мкм, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. В других вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество липосом размером в диапазоне от примерно 1 мкм до примерно 40 мкм, включая каждое значение в пределах указанного

15 диапазона.

В различных вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество липосом с концентрацией липидов от примерно 50 мМ до примерно 200 мМ, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. В конкретных вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество липосом с концентрацией

20 липидов от примерно 100 мМ до примерно 150 мМ, включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

В некоторых вариантах реализации липосомальная композиция содержит множество пустых липосом, по существу не содержащих активный фармацевтический ингредиент. В других вариантах реализации липосомальная композиция содержит

25 множество липосом, инкапсулирующих активный фармацевтический ингредиент. Согласно последним вариантам реализации способ, предложенный в настоящем изобретении, дополнительно включает определение концентрации активного фармацевтического ингредиента, инкапсулированного посредством множества липосом.

В различных вариантах реализации отделение жидкой среды от множества липосом

30 осуществляют путем центрифугирования, фильтрации или декантации. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. В одном из вариантов реализации отделение жидкой среды от множества липосом обеспечивает жидкую среду, по существу лишенную липосом.

Согласно предпочтительному в настоящее время варианту реализации отделение жидкой среды от множества липосом осуществляют путем центрифугирования.

В некоторых вариантах реализации центрифугирование липосомальной композиции осуществляют при относительном центробежном ускорении от примерно 10000 до
5 примерно 30000 ($\times g$), включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

В дополнительных вариантах реализации центрифугирование липосомальной композиции осуществляют при температуре от примерно 2°C до примерно 25°C, включая
каждое значение в пределах указанного диапазона.

В дополнительных вариантах реализации центрифугирование липосомальной
10 композиции осуществляют в течение периода времени в диапазоне от примерно 10 минут
до примерно 100 минут, включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

В различных вариантах реализации способ, описанный в настоящем документе,
можно применять для контроля качества липосомальной композиции. Согласно таким
вариантам реализации указанный способ дополнительно включает сравнение
15 определенного захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) с
эталонными значениями захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) и
отбраковку указанной липосомальной композиции, если определенный захваченный объем
(V_t) и захваченный водный объем (V_{taq}) отличаются от эталонных значений более чем на
плюс или минус 10%.

В других вариантах реализации способ, описанный в настоящем документе, можно
20 применять для контроля качества липосомальной композиции, содержащей активный
фармацевтический ингредиент (АФИ), инкапсулированный во множество липосом, при
этом указанный способ включает определение концентрации АФИ, инкапсулированного во
множество липосом, в липосомальной композиции на основе захваченного объема (V_t) и
25 захваченного водного объема (V_{taq}), как описано в настоящем документе, сравнение
определенной концентрации АФИ с эталонной концентрацией АФИ и отбраковку
указанной липосомальной композиции, если определенная концентрация АФИ отличается
от эталонной концентрации АФИ более чем на плюс или минус 10%.

Согласно некоторым вариантам реализации предложена липосомальная
30 композиция, приготовленная для внутрисуставного введения, содержащая полиоловый
агент, регулирующий тоничность; и множество липосом, состоящих по существу из 1,2-
димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-
фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, при этом указанная композиция по
существу не содержит активный фармацевтический агент, и при этом указанное множество

липосом характеризуется удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида, включая каждое значение в пределах указанного диапазона, как определено с помощью любого из способов, описанных в настоящем документе.

5 Согласно другому аспекту предложена липосомальная композиция, приготовленная для внутрисуставного введения, содержащая жидкую среду; полиоловый агент, регулирующий тоничность; и множество липосом, состоящих по существу из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, при этом указанная композиция по
10 существу не содержит активный фармацевтический агент, и при этом указанное множество липосом характеризуется удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида, включая каждое значение в пределах указанного диапазона, как определено способом, включающим стадии:

(i) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом
15 указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

(ii) измерения сигнала, индуцированного маркером в липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

20 (iii) определения объема жидкой среды и промежуточной среды между липосомами, полученной путем отделения жидкой среды от множества липосом, и измерения сигнала, индуцированного маркером в жидкой среде после отделения; и

(iv) расчета захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (ii) и (iii), и концентрации
25 липидов, образующих липосомы.

Согласно различным вариантам реализации стадия (iii) определения объема жидкой среды и промежуточной среды между липосомами дополнительно включает определение свободного объема между липосомами в осадке путем измерения сигнала, индуцированного маркером в осадке после отделения от жидкой среды. В одном из
30 вариантов реализации разделение осуществляют путем центрифугирования.

Согласно некоторым вариантам реализации жидкая среда содержит гистидиновый буфер. Согласно другим вариантам реализации полиол представляет собой линейный полиол. Согласно еще другим вариантам реализации полиол выбирают из группы, состоящей из маннита, декстрозы, лактозы, трегалозы и их комбинаций. Каждый

возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Согласно конкретным вариантам реализации полиол представляет собой маннит. Согласно различным вариантам реализации массовое соотношение между множеством липосом и полиоловым агентом, регулирующим тоничность, составляет от примерно 6:1 до примерно 2:1, включая все итерации соотношений в пределах указанного диапазона.

Согласно дополнительным вариантам реализации множество липосом состоит по существу из комбинации DMPC и DPPC, при этом массовый процент присутствующего DMPC составляет от примерно 1% (масс./масс.) до примерно 10% (масс./масс.), и массовый процент присутствующего DPPC составляет от примерно 2% (масс./масс.) до примерно 12% (масс./масс.), включая каждое значение в пределах указанных диапазонов. Согласно некоторым вариантам реализации pH липосомальной композиции лежит в диапазоне от примерно 5 до примерно 8, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Согласно другим вариантам реализации множество липосом характеризуются удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1,5 до примерно 3,5 мкл/мг липида, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Согласно еще другим вариантам реализации множество липосом характеризуются удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 2 до примерно 3 мкл/мг липида, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Согласно другим вариантам реализации множество липосом характеризуются захваченным водным объемом, составляющим от примерно 10% до примерно 35%, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Согласно дополнительным вариантам реализации множество липосом характеризуются захваченным водным объемом, составляющим от примерно 20% до примерно 30%, включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

Если не указано иное, все технические и/или научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которое обычно подразумевают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или исследовании вариантов реализации настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, иллюстративные способы и/или материалы описаны ниже. Подразумевается, что такие иллюстративные способы и/или материалы не являются обязательно ограничивающими.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1** приведено схематическое изображение флакона Эппендорфа после центрифугирования с указанием различных объемов, применяемых для расчета захваченного объема согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения.

5 На **фигуре 2** представлена калибровочная кривая оптической плотности феррицианида в воде и НМВ при длине волны 420 нм.

На **фигуре 3** представлена диаграмма, на которой показаны захваченный объем и мутность верхней фазы различных образцов согласно определению с применением феррицианида в качестве красителя. А - 3 мМ липида; В - 52 мМ липида; С - 122 мМ липида; 10 D - 160 мМ липида; Е - 206 мМ липида; F - 305 мМ липида; G - 10 мМ NaCl; H - 100 мМ NaCl; I - 150 мМ NaCl; J - 3000 мМ NaCl; K - MLVs; L – LMVVs; и M - MLVs.

На **фигуре 4** представлена диаграмма, на которой показаны удельный захваченный водный объем (светло-серый цвет) и удельный захваченный объем (темно-серый цвет) согласно определению с применением супернатанта и общего объема (слева) и 15 супернатанта и осадка (справа).

На **фигуре 5** приведен график, на котором показан % захваченного водного объема и % ОСО при различных концентрациях липидов. Полученные результаты основаны на радиоактивности супернатанта (n=3).

На **фигуре 6** приведен график, на котором показан удельный захваченный водный 20 объем (мкл захваченного объема/мг липида) относительно концентрации липида. Средний удельный захваченный водный объем составлял $2 \pm 0,1$ мкл на мг липида (n=15).

На **фигуре 7** представлен график, на котором показан удельный захваченный водный объем при различных концентрациях ^{14}C -карбоксиинулина (СРМ (количество импульсов в минуту), нормализованное к общей массе образца).

25 На **фигуре 8** представлена диаграмма, на которой показано кратное изменение удельного захваченного водного объема липосомальной композиции, содержащей HSPC и холестерин или только HSPC (n=2).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Настоящее изобретение относится к способу определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) липосомальной композиции неразрушающим способом. Указанный способ можно использовать для контроля качества получения липосомальных композиций с улучшенной точностью и воспроизводимостью.

В то время как применяемые в настоящее время способы определения захваченных объемов липосом требуют инкапсуляции маркеров внутри липосом, настоящее изобретение устанавливает другой подход. При таком подходе используют маркер, который неспособен проникать в липосомы и имеет молекулярную массу ≥ 1 кДа, такой как радиоактивный маркер ^{14}C -карбокси-инулин. При применении маркера, который не может проходить через липидную мембрану, он распределяется только в липосомальной внешней водной фазе. После отделения жидкой среды от липосом (например, посредством центрифугирования) происходит осаждение липосом таким образом, что в супернатанте по существу не остается липосом. Для расчета объема внешней водной фазы можно измерять концентрацию маркера в супернатанте. Результат вычитания объема внешней водной фазы, включая свободный объем между липосомами, и расчетного объема липидов из общего объема липосомальной композиции соответствует захваченному объему липосомы.

Такой способ позволяет преодолевать ограничения ранее описанных подходов, поскольку он представляет собой постпроизводственный способ, который можно использовать на небольшой части уже сформированных липосом и который не включает инкапсуляцию маркера внутри липосом, что делает их непригодными для клинического применения. Кроме того, при применении захваченного маркера для определения захваченного объема требуется равномерное распределение маркера во всех водных компартментах. Однако известно, что в многослойных везикулах (MLV) захваченное растворенное вещество не всегда распределяется равномерно из-за различий между проникающей способностью растворенного вещества и водопроницаемостью. Способ, описанный в настоящем документе, обеспечивает точное измерение захваченного объема различных липосом, включая MLVs, и может быть реализован без изменения структур липосом. В предложенном способе используют высокомолекулярные полярные маркеры, которые не проникают через липидный бислой, что обеспечивает, тем самым, точное и воспроизводимое измерение захваченного объема и захваченного водного объема. Способ согласно настоящему изобретению можно использовать для контроля качества и физической оценки серийного производства пустых липосом и липосом, содержащих АФИ.

Некоторые варианты реализации изобретения описаны в настоящем документе со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Такое описание вместе с графическими материалами делает очевидным для обычного специалиста в данной области техники, каким образом можно осуществлять некоторые варианты реализации на практике. Графические материалы приведены с целью иллюстративного описания, при этом не предпринимается никакие попытки показать структурные детали варианта реализации

более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания изобретения. Для ясности некоторые объекты, изображенные на графических материалах, не масштабируются.

В настоящем изобретении предложен способ определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема ($V_{\text{таq}}$) множества липосом в липосомальной композиции, включающий несколько стадий, некоторые из которых могут быть выполнены последовательно в любом порядке или одновременно, при этом каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. В контексте настоящего описания термин «захваченный объем» относится к сумме объема, занимаемого липидной мембраной, составляющей липосомы, и объема внутрилипосомальной водной среды. В некоторых аспектах и вариантах реализации описанный в настоящем документе способ включает определение захваченного водного объема. В контексте настоящего описания термин «захваченный водный объем» относится к объему внутрилипосомальной водной среды. В дополнительных аспектах и вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению обеспечивает определение удельного захваченного объема и удельного захваченного водного объема, которые представляют собой захваченный объем и захваченный водный объем, соответственно, нормализованные по массе липидов.

В контексте настоящего описания термин «липосома» относится к везикуле, характеризующейся внутренним водным центром, окруженным липидной мембраной, обычно содержащей фосфолипидный бислой(слои). Примеры фосфолипидов включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерины или любые их производные или комбинации. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Подходящие фосфатидилхолины в пределах объема настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и их смесь или комбинацию. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Подходящие фосфатидилэтанолламины включают, но не ограничиваются ими, 1,2-дилауроил-L-фосфатидил-этанолламин (DLPE), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE), 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DPhPE), 1,3-дипальмитоил-sn-глицеро-2-фосфоэтанолламин (1,3-DPPE), 1-пальмитоил-3-олеоил-sn-глицеро-2-фосфоэтанолламин (1,3-POPE), биотин-

фосфатидилэтаноламин, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DMPE),
дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-
фосфоэтаноламин (DSPE) и смесь или их комбинацию. Каждый возможный выбор
представляет собой отдельный вариант реализации. Подходящие фосфатидилглицерины
5 включают, но не ограничиваются ими: 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-(фосфо-гас-(1-
глицерин)) (DMPG), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин (DPPG), 1,2-
дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG) и их смесь или комбинацию. Каждый возможный
выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

Согласно принципам настоящего изобретения описанный в данном документе
10 способ можно использовать для определения захваченного объема липосом со
структурами, включающими однослойные везикулы (SUV), крупные однослойные
везикулы (LUV), гигантские однослойные везикулы (GUV), олигослойные везикулы (OLV),
многослойные везикулы (MLV), мультивезикулярные липосомы (MVL) и их смесь или
комбинацию. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант
15 реализации.

Способ согласно настоящему изобретению можно реализовать с применением
пустых липосом или его можно реализовать с применением липосом, инкапсулирующих
активный фармацевтический ингредиент (АФИ). Каждый возможный выбор представляет
собой отдельный вариант реализации. Поскольку маркер согласно принципам настоящего
20 изобретения не поглощается липосомами, присутствие активного фармацевтического
ингредиента, инкапсулированного внутри липосом, не препятствует определению
захваченного объема. Благодаря корреляции между захваченным объемом и концентрацией
активного фармацевтического ингредиента, инкапсулированного внутри липосом, можно
обеспечить определение концентрации АФИ. Соответственно, определение захваченного
25 объема липосом позволяет оценить концентрацию инкапсулированного в них активного
фармацевтического ингредиента. Таким образом, настоящее изобретение также относится
к способу определения концентрации активного фармацевтического ингредиента,
инкапсулированного во множество липосом, в липосомальной композиции, включающему
определение захваченного объема и/или захваченного водного объема множества липосом,
30 инкапсулирующих активный фармацевтический ингредиент, согласно способам,
описанным в настоящем документе.

В некоторых аспектах и вариантах реализации в способе согласно настоящему
изобретению используют липосомальную композицию, содержащую жидкую среду и
множество липосом с заданной концентрацией липидов, обычно выраженной в массовых

единицах. В контексте настоящего описания термин «липосомальная композиция» относится к композиции, содержащей множество липосом, суспендированных или диспергированных в подходящей жидкой среде, например, в водной среде, такой как буфер. При ссылке на липосомальную композицию следует понимать, что она включает ссылку на часть указанной композиции, отобранную для получения информации о захваченном объеме всей композиции. Как правило, концентрация липидов в липосомальной композиции составляет от примерно 50 мМ до примерно 200 мМ, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Примеры диапазонов концентраций, включенных в объем настоящего изобретения, составляют от примерно 50 мМ до примерно 150 мМ, от примерно 50 мМ до примерно 100 мМ и от примерно 100 мМ до примерно 200 мМ, включая каждое значение в пределах указанных диапазонов. Согласно принципам настоящего изобретения, концентрация липидов в липосомальной композиции позволяет определять объем, занимаемый липидной мембраной липосомы в композиции. Объем липидов можно рассчитать путем деления массы липидов на их плотность. Как правило, плотность липидов, образующих липосомную мембрану, можно измерить с помощью подходящего плотномера (например, плотномера Anton Paar). Альтернативно, плотность можно получить из эталонного образца или рассчитать согласно различными моделями.

В определенных аспектах и вариантах реализации в композицию также добавляют маркер с молекулярной массой, равной или превышающей 1 кДа. Согласно принципами настоящего изобретения маркер представляет собой соединение, которое не поглощается липосомами и не взаимодействует с липосомальной мембраной, являясь, таким образом, неспособным к проникновению в липосомы. Согласно некоторым вариантам реализации маркер представляет собой полярную молекулу, которая предпочтительно растворима в воде. Маркеры в пределах объема настоящего изобретения включают соединения, содержащие обнаруживаемые фрагменты, индуцирующие сигнал, который может быть измерен и количественно определен с помощью известных методов, таких как спектральные измерения. Подходящие маркеры включают, но не ограничиваются ими: радиоактивные агенты, хромофоры, флуоресцентные соединения, фосфоресцентные соединения, магнитоактивные соединения и кластеры тяжелых металлов. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Примером маркера является радиоактивный маркер, который содержит радиоактивные изотопы, испускающие излучение в виде сигнала, который может быть измерен. Дополнительным примерным маркером является флуоресцентное соединение, излучающее свет при определенной длине волны во время воздействия излучения от внешнего источника, при этом указанный

излучаемый свет можно использовать в качестве сигнала, который может быть измерен. Как известно в данной области техники, сигнал, индуцированный маркером, можно измерять, например, с применением различных детекторов и мониторов. Методы, которые можно использовать для измерения сигнала, включают, но не ограничиваются ими, обнаружение излучения, калориметрию, флуоресценцию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС), газовую хроматографию (ГХ), масс-спектрометрию в сочетании с ГХ (ГХ-МС), инфракрасную спектроскопию, спектроскопию комбинационного рассеяния, ЯМР, колориметрию, спектроскопию в видимой и ультрафиолетовой областях спектра и их комбинации. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

Согласно принципам настоящего изобретения маркеры содержат соединения с молекулярной массой, составляющей по меньшей мере 1 кДа, предпочтительно по меньшей мере 2 кДа. Как правило, молекулярная масса маркера составляет от 1 кДа до 1000 кДа, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Примеры молекулярной массы маркера включают, но не ограничиваются ими, 1 кДа, 2 кДа, 3 кДа, 4 кДа, 5 кДа, 6 кДа, 7 кДа, 8 кДа, 9 кДа, 10 кДа, 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа, 50 кДа, 55 кДа, 60 кДа, 65 кДа, 70 кДа, 75 кДа, 80 кДа, 85 кДа, 90 кДа, 95 кДа, 100 кДа, 150 кДа, 200 кДа, 250 кДа, 300 кДа, 350 кДа, 400 кДа, 450 кДа, 500 кДа, 550 кДа, 600 кДа, 650 кДа, 700 кДа, 750 кДа, 800 кДа, 850 кДа, 900 кДа, 950 кДа, или 1000 кДа. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

В некоторых аспектах и вариантах реализации маркеры содержат полисахариды, в том числе, но не ограничиваясь ими, инулин, меченный флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), декстран, меченный FITC, и их производные. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. В других аспектах и вариантах реализации маркеры содержат углеводы, полипептиды или синтетические полимеры, такие как, но не ограничиваясь ими, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, пероксидаза хрена (HRP) и т.п. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Хотя молекулярная масса маркеров в пределах объема настоящего изобретения обычно составляет не менее 1 кДа, следует понимать, что маркеры с молекулярной массой менее 1 кДа, которые не проникают в липосомы или не встраиваются в липидную мембрану или не связываются с ней, также рассматриваются с точки зрения обеспечения точного измерения захваченного объема

согласно принципами настоящего изобретения. Такие маркеры включают, но не ограничиваются ими: ди-, три- и олигосахариды, такие как сахароза и т.п.

В некоторых предпочтительных в настоящее время аспектах и вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению применяют радиоактивные маркеры.

5 Примеры радиоактивных маркеров в пределах объема настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими: ^{14}C -карбоксил-инулин, ^{125}I -поливинилпирролидон и радиоактивные углеводы. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Поскольку радиоактивный маркер, такой как ^{14}C -карбокси-инулин, не взаимодействует с липосомами, его можно добавлять в концентрациях от примерно 0,1
10 мкКюри (мкКи)/мл до примерно 10 мкКи/мл, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Примеры диапазонов концентраций, включенных в объем настоящего изобретения, составляют от примерно 0,1 мкКи/мл до примерно 5 мкКи/мл, от примерно 0,5 мкКи/мл до примерно 5 мкКи/мл и от примерно 0,5 мкКи/мл до примерно 3 мкКи/мл, включая каждое значение в пределах указанных диапазонов.

15 Согласно принципами, предложенными в настоящем документе, указанный маркер недоступен для внутрелипосомального объема. Таким образом, смешивание его с липосомальной композицией приводит к повышению его концентрации во внелипосомальной среде. В некоторых аспектах и вариантах реализации способ, предложенный в настоящем изобретении, включает измерение сигнала, индуцированного
20 маркером в липосомальной композиции. Например, при применении радиоактивного маркера указанный способ включает измерение радиоактивности/массы (количество распадов в минуту (DPM)/г) всей липосомной композиции. Поскольку плотность применяемых фосфолипидов очень близка к 1 (менее 1,05), для таких липосом радиоактивность/масса является по существу взаимозаменяемой с
25 радиоактивностью/объемом (DPM/мл). Путем определения (DPM/мл) всей липосомной дисперсии, $(\text{DPM}/\text{мл})_{\text{общ}}$, определяют объем липосомальной композиции.

Измерение радиоактивности можно выполнять способом, известным в данной области техники, например, с применением подходящего жидкостного сцинтилляционного счетчика, такого как сцинтилляционный счетчик Packard 1900 TR, жидкостного
30 сцинтилляционного счетчика Packard Tri-Carb и т. п.

После определения объема, занимаемого всей липосомальной композицией, жидкую среду отделяют от множества липосом. Отделение жидкой среды от множества липосом можно выполнять способом, известным в данной области техники, например, путем центрифугирования, фильтрации или декантации. Каждый возможный выбор представляет

собой отдельный вариант реализации. Как правило, липосомальную композицию с добавлением маркера центрифугируют для осаждения множества липосом. Согласно принципам настоящего изобретения центрифугирование осуществляют таким образом, чтобы раствор супернатанта был по существу лишен липосом. Как правило, при 5 надлежащем центрифугировании могут осаждаться липосомы размером в диапазоне от примерно 0,3 мкм до примерно 50 мкм, например, от примерно 1 мкм до примерно 40 мкм. В некоторых вариантах реализации, если композиция содержит небольшие липосомы, для достижения полного осаждения следует использовать ультрацентрифугирование. В некоторых аспектах и вариантах реализации центрифугирование липосомальной 10 композиции осуществляют при относительном центробежном ускорении от примерно 10000 до примерно 30000 ($\times g$), включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Примеры относительного центробежного ускорения включают, но не ограничиваются ими, примерно 10000, примерно 11000, примерно 12000, примерно 13000, примерно 14000, примерно 15000, примерно 16000, примерно 17000, примерно 18000, примерно 19000, 15 примерно 20000, примерно 21000, примерно 22000, примерно 23000, примерно 24000, примерно 25000, примерно 26000, примерно 27000, примерно 28000, примерно 29000 или примерно 30000 ($\times g$), при этом каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Хотя центрифугирование можно выполнять при комнатных температурах, в пределах объема настоящего изобретения также предусмотрено 20 центрифугирование при более низких температурах. Как правило, центрифугирование осуществляют в диапазоне температур от примерно 2 °C до примерно 25 °C, включая каждое значение в пределах указанного диапазона. Типичные температуры включают, но не ограничиваются ими, примерно 2 °C, примерно 3 °C, примерно 4 °C, примерно 5 °C, примерно 6 °C, примерно 7 °C, примерно 8 °C, примерно 9 °C, примерно 10 °C, примерно 25 11 °C, примерно 12 °C, примерно 13 °C, примерно 14 °C, примерно 15 °C, примерно 16 °C, примерно 17 °C, примерно 18 °C, примерно 19 °C, примерно 20 °C, примерно 21 °C, примерно 22 °C, примерно 23 °C, примерно 24 °C или примерно 25 °C, при этом каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. Как правило, центрифугирование в течение периода времени в диапазоне от примерно 10 минут до 30 примерно 100 минут при перечисленных выше относительных центробежных ускорениях является достаточным для получения супернатанта, по существу лишенного липосом. Типичные периоды времени для центрифугирования включают, но не ограничиваются ими, примерно 10, примерно 20, примерно 30, примерно 40, примерно 50, примерно 60,

примерно 70, примерно 80, примерно 90 или примерно 100 минут, при этом каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации.

После центрифугирования и по существу полного осаждения липосом супернатант собирают и измеряют сигнал, индуцированный маркером, что, тем самым, позволяет определять объем внелипосомальной среды (супернатант или отделенная жидкая среда плюс свободный объем, присутствующий между осажденными липосомами). Например, при применении радиоактивного маркера измеряют радиоактивность супернатанта $(\text{DPM}/\text{мл})_{\text{суперн}}$. Согласно принципам настоящего изобретения, $(\text{DPM}/\text{мл})_{\text{суперн}}$ представляет собой радиоактивность/мл внелипосомной среды, а именно объем супернатанта и объем промежуточной (захваченной и расположенной между липосомами) внелипосомной среды осадка. Следовательно, в случаях, когда после образования липосом к липосомной дисперсии добавляют радиоактивный индикатор, соотношение между $(\text{DPM}/\text{мл})_{\text{общ}}$ и $(\text{DPM}/\text{мл})_{\text{суперн}}$ используют для определения всего водного объема, находящегося вне липосом ($V_{\text{свобод}}$, уравнение 1).

Далее липосомальный захваченный объем (V_t) определяют путем вычитания объема, находящегося вне липосом, из общего объема дисперсии (уравнение 2). Захваченный водный объем ($V_{\text{таq}}$) рассчитывают путем вычитания объема липидов в липосомах ($V_{\text{липиды}}$) из липосомального захваченного объема (уравнение 3). $V_{\text{липиды}}$ определяют на основании известной массы липидов в липосомах и известной плотности липидов. Отношение V_t или $V_{\text{таq}}$ к липидам, применяемым для получения липосом, характеризует удельный V_t и удельный $V_{\text{таq}}$, соответственно. Указанные объемы представляют собой наиболее релевантные характеристики липосом в липосомной дисперсии. На фигуре 1 приведено изображение пробирки Эппендорфа для испытаний с указанием различных объемов, занимаемых каждым из компонентов (липидом, свободной фазой (нелипосомальный объем, также включающий свободный объем) и внутрилипосомальной водной фазой ($V_{\text{таq}}$)).

$$1. \quad V_{\text{своб}} = V_{\text{суперн}} + V_{\text{промежут}} = \frac{\left(\frac{\text{DPM}}{\text{мл}}\right)_{\text{общ}}}{\left(\frac{\text{DPM}}{\text{мл}}\right)_{\text{верхняя фаза}}}$$

$$2. \quad V_t = V_{\text{общ}} - V_{\text{своб}}$$

$$3. \quad V_{\text{таq}} = V_t - V_{\text{липиды}}$$

Необязательно, сигнал, индуцированный маркером в осадке, содержащем множество липосом и промежуточную среду между липосомами, можно дополнительно измерять и использовать для определения свободного объема между липосомами в осадке.

В объем настоящего изобретения входит применение определенных V_t и $V_{\text{таq}}$, а также удельного V_t и удельного $V_{\text{таq}}$, в качестве показателей качества дисперсии, содержащей

липосомы. Согласно указанным вариантами реализации способы, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно включают сравнение определенного захваченного объема с эталонными значениями захваченного объема и отбраковку указанной липосомальной композиции, если определенный захваченный объем отличается от эталонных значений захваченного объема более чем на плюс или минус 10%. При сравнении определенного захваченного объема с эталонными значениями захваченного объема, его можно сравнивать со стандартным захваченным объемом, который, как известно, является приемлемым для клинического применения. Стандартный захваченный объем может представлять собой точное значение или он может представлять собой диапазон. Например, он может представлять собой абсолютное количество с приемлемым отклонением в процентах, т.е. $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ и т. д. Рассчитанный захваченный объем можно сравнивать с диапазоном стандартного захваченного объема, и, если он выходит за пределы такого диапазона более чем на плюс или минус 10%, липосомальную композицию отбраковывают. Как правило, эталонные значения захваченного объема соответствуют диапазону значений, которые являются приемлемыми согласно установленным требованиям в отношении липосомальной композиции, при этом отбраковка происходит, когда полученная разница соответствует значениям, которые либо ниже более чем на 10% от нижней границы диапазона, либо выше более чем на 10% от верхней границы диапазона. Типичные стандартные захваченные объемы липосомальной композиции могут составлять, например, от примерно 0,1 до примерно 10 мкл/мг липида, от примерно 0,3 до примерно 5 мкл/мг липида или от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида и т.д., включая каждое значение в пределах указанных диапазонов. Стандартный захваченный объем может быть получен с помощью контрольного образца, который можно подвергать измерениям до, во время или после определения захваченного объема липосомальной композиции, контроль качества которой является необходимым. В качестве дополнительной альтернативы, стандартный захваченный объем может представлять собой абсолютное значение, основанное на предыдущих анализах. Если измеренный захваченный объем значительно отличается от стандартных эталонных значений (более чем на $\pm 10\%$), такая разница указывает на нарушение при производстве.

Дополнительно или альтернативно, захваченный объем можно использовать для расчета концентрации АФИ, инкапсулированного внутри липосом. Далее концентрацию АФИ можно использовать для контроля качества липосомальной композиции путем сравнения ее с эталонной концентрацией и для отбраковки указанной липосомальной композиции, если определенная концентрация АФИ отличается от эталонной концентрации

более чем на плюс или минус 10%. Эталонная концентрация АФИ может представлять собой количество, которое, как известно, является приемлемым для оказания терапевтического эффекта у пациентов, подлежащих лечению с помощью указанного АФИ. Эталонная концентрация АФИ может представлять собой точное значение или может представлять собой диапазон. Например, она может представлять собой абсолютное количество с приемлемым отклонением в процентах или диапазон стандартных концентраций АФИ. Если концентрация АФИ в липосомальной композиции, определенная способами, предложенными в настоящем изобретении, выходит за пределы диапазона эталонных концентраций более чем на плюс или минус 10%, липосомальную композицию отбраковывают.

Как указано выше, способы согласно настоящему изобретению преимущественно обеспечивают слепопроизводственное определение захваченного объема. Соответственно, для применения в способах согласно настоящему изобретению можно отобрать только небольшую часть образца, тогда как оставшуюся композицию можно использовать для клинических и других применений. Как правило, для определения захваченного объема отбирают несколько образцов, чтобы свести к минимуму эффекты экспериментального отклонения, неравномерного отбора и/или нерепрезентативного отбора образцов. Таким образом, в пределах объема настоящего изобретения предложено сравнение среднего значения с эталонными значениями.

В объем настоящего изобретения также включена липосомальная композиция, приготовленная для внутрисуставного введения, содержащая жидкую среду; полиоловый агент, регулирующий тоничность; и множество липосом, состоящих по существу из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, которая по существу не содержит активного фармацевтического ингредиента. В контексте настоящего описания в некоторых вариантах реализации термин «по существу не содержит активный фармацевтический ингредиент» относится к липосомальной композиции, содержащей менее терапевтически эффективного количества активного фармацевтического ингредиента, которое известно для применения для смазывания суставов, лечения суставной дисфункции, уменьшения боли в суставах, раздражения и/или износа суставов или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации липосомальная композиция не содержит агента для смазывания, такого как, среди прочего, гликозаминогликан или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир или производное, такое как гиалуроновая кислота или соль или сложный эфир, содержащие гиалуронан. Множество липосом в указанной

липосомальной композиции характеризуется удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида, как определено любым из способов, описанных в настоящем документе, включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

5 Согласно некоторым аспектам и вариантам реализации жидкая среда содержит гистидиновый буфер. Согласно другим аспектам и вариантам реализации полиол представляет собой линейный полиол. Согласно дополнительным аспектам и вариантам реализации полиол представляет собой сахар или сахарный спирт, содержащий по меньшей мере пять гидроксильных групп. Примеры полиолов включают, но не ограничиваются ими:
10 маннит, декстрозу, лактозу, трегалозу и их комбинации. Каждый возможный выбор представляет собой отдельный вариант реализации. В настоящее время предпочтительным является применение в качестве полиола маннита. Согласно различным вариантам реализации массовое соотношение между множеством липосом и полиолом составляет от примерно 6:1 до примерно 2:1, включая все итерации соотношений в пределах указанного
15 диапазона.

Настоящее изобретение включает липосомальную композицию, удельный захваченный водный объем которой составляет от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида, как измерено любым из способов, описанных в настоящем документе, при этом указанная липосомальная композиция содержит жидкую среду, полиол и множество
20 липосом, состоящих по существу из комбинации DMPC и DPPC, при этом массовый процент присутствующего DMPC составляет от примерно 1% (масс./масс.) до примерно 10% (масс./масс.), и массовый процент присутствующего DPPC составляет от примерно 2% (масс./масс.) до примерно 12% (масс./масс.), включая каждое значение в пределах указанных диапазонов. Как правило, pH липосомальной композиции лежит в диапазоне от
25 примерно 5 до примерно 8, включая каждое значение в пределах указанного диапазона.

В некоторых аспектах и вариантах реализации множество липосом в указанной липосомальной композиции характеризуется удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1,5 до примерно 3,5 мкл/мг липида или от примерно 2 до примерно 3 мкл/мг липида, включая каждое значение в пределах указанных диапазонов. В
30 других аспектах и вариантах реализации множество липосом в указанной липосомальной композиции характеризуется захваченным водным объемом в диапазоне от примерно 10% до примерно 35% или от примерно 20% до примерно 30%, включая каждое значение в пределах указанных диапазонов.

В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают указание на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, упоминание «липидов» включает множество таких липидов. Следует отметить, что термин «и» или термин «или» обычно используют в его значении, включающем «и/или», если из контекста явно не следует иное. В контексте данного документа подразумевается, что термин «примерно» включает вариации $\pm 10\%$.

Для более полной иллюстрации некоторых вариантов реализации настоящего изобретения приведены следующие примеры. Однако их никоим образом не следует рассматривать как ограничивающие широкий объем настоящего изобретения. Специалист в данной области техники может легко разработать множество вариантов и модификаций принципов, представленных в настоящем документе, без отклонения от объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Сравнительный пример: Определение захваченной водной фазы липосом с применением феррицианида калия в качестве красителя

Захваченный водный объем ($V_{\text{таq}}$) липосомальной композиции, содержащей пустые липосомы, образованные из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, оценивали путем гидратации смеси, содержащей фосфолипиды, с применением раствора, содержащего 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,5 в 4% манните.

Общепринятый способ, применяемый для определения захваченных V_t и $V_{\text{таq}}$, основан на применении красителя, который не взаимодействует с липосомальными мембранами и не проникает в липосомы, такого как феррицианид калия. Применение феррицианида калия для определения V_t осуществляли так, как описано ниже:

Приготавливали стандартный раствор феррицианида калия (0,2 мг/мл) и смешивали с предварительно взвешенным образцом липосомальной композиции (содержащей пустые липосомы, не содержащие лекарственного средства). Для удаления небольших (субмикронных) липосом образец центрифугировали в течение от 10 до 30 минут со скоростью 14000 об/мин. Затем супернатант удаляли и взвешивали. К осадку, содержащему липосомы, добавляли стандартный раствор феррицианида калия в массовом соотношении 1:1 с последующим перемешиванием с применением вихревой мешалки и центрифугированием в течение от 30 до 60 минут со скоростью 14000 об/мин.

Примечательно, что из-за сложности перемешивания использовали длительное вихревое перемешивание, нагрев и обработку ультразвуком. Затем собирали раствор супернатанта. Поглощение феррицианидного красителя определяли с помощью оптической спектрофотометрии при 420 нм и рассчитывали концентрацию феррицианида на основе калибровочной кривой, полученной в тех же условиях (фигура 2).

Также применяли альтернативную процедуру. Приготавливали стандартный раствор феррицианида калия (1,25-50 мг/мл) и добавляли к примерно 1 грамму предварительно взвешенного образца липосомальной дисперсии, содержащей пустые (не содержащие лекарственного средства) липосомы, с последующим перемешиванием с применением вихревой мешалки и центрифугированием в течение от 1 до 3 часов со скоростью 14000 об/мин. Раствор супернатанта собирали и определяли поглощение концентрации феррицианида с помощью оптической спектрофотометрии при 420 нм и 600 нм. Поскольку феррицианид не поглощает свет при 600 нм, любое поглощение при такой длине волны связано с вкладом мутности, обусловленной присутствием малых липосом в супернатанте (Barenholz et al., *Liposome Technology* 1, 1993, 527-616). Поскольку поглощение всей липосомной дисперсии невозможно было определить вследствие очень высокой мутности, для расчета V_t регистрировали поглощение супернатанта при 420 нм относительно эталонной дисперсии того же объема, в которой отсутствовали липосомы. Мутность супернатанта липосомной дисперсии препятствовала получению достоверного значения поглощения при 420 нм, и, следовательно, с помощью данного способа было невозможно определить надежные значения V_t и V_{taq} (OD_{420nm} (оптическая плотность при длине волны 420 нм) супернатанта (без феррицианида) составляла 0,065 по сравнению с 0,049 одного гистидинового буфера на основе маннита).

Полученные результаты (фигура 3) продемонстрировали влияние мутности супернатанта на поглощение при 420 нм. В частности, даже через 2 часа после центрифугирования мутность была относительно высокой, т.е. значения оптической плотности липосом в верхней фазе при 600 нм составляли от 0,055 до 0,063. Поглощение при 600 нм указывало на то, что мутность при 420 нм была гораздо больше. Соответственно, значения V_t , полученные данным способом, являются ошибочными. Таким образом, с помощью указанного подхода невозможно рассчитать V_t для композиции MLV, содержащей фосфолипиды DMPC/DPPC.

Пример 1: Определение захваченного объема и захваченного водного объема липосом с применением ^{14}C -карбокси-инулина

Поэтому был разработан альтернативный подход, не зависящий от поглощения. В качестве индикатора/маркера был выбран ^{14}C -карбокси-инулин, который не взаимодействует с липосомами и/или не проникает в них.

Захваченный водный объем (V_{taq}) липосомальной композиции, содержащей пустые липосомы, образованные из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, оценивали путем гидратации смеси, содержащей фосфолипиды, с применением раствора, содержащего 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,5 в 4% манните, используя ^{14}C -карбокси-инулин в качестве радиоактивного маркера. Определение V_t и V_{taq} и удельных V_t и V_{taq} липосомальной композиции осуществляли с применением двух подходов, основанных на супернатанте и осадке (фигура 4).

Раствор ^{14}C -карбокси-инулина (в воде) добавляли к предварительно взвешенному образцу, содержащему липосомальную композицию. Часть образца (100-200 мг) переносили в предварительно взвешенный сцинтилляционный флакон объемом 20 мл и затем взвешивали. Другую порцию (250-350 мг) переносили в пробирку Эппендорфа и центрифугировали при относительном центробежном ускорении (rcf) 20817 в течение 30 минут при 4 °C (центрифуга 5810 R; Эппендорф, Германия). Водный супернатант собирали и переносили в предварительно взвешенную пробирку Эппендорфа, а затем снова взвешивали. Часть супернатанта в количестве ~100-200 мг переносили в предварительно взвешенный сцинтилляционный флакон и затем взвешивали. Добавляли растворимое вещество и перемешивали раствор в течение ~1 часа при 50 °C для сольubilизации липосом. В каждый флакон добавляли жидкую сцинтилляционную смесь (Opti-Fluor) и хранили флаконы в течение ночи в защищенном от света месте при от 5 до 8°C. Уровень радиоактивности в виде числа распадов в минуту (DPM) определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике бета-частиц (сцинтилляционный счетчик Packard 1900 TR).

Захваченный водный объем (V_{taq}) рассчитывали двумя способами (фигура 4). В первом способе общий захваченный объем (V_t), занимаемый липосомами (V_t , включающий объем липидов плюс захваченный водный объем V_{taq}), рассчитывали из соотношения между DPM/мл супернатанта и DPM/мл всей липосомной дисперсии (до осаждения липосом). Такое соотношение позволяет рассчитывать % общего объема, занимаемого липосомами, от общего количества липосомальной дисперсии. Приведенное выше соотношение можно преобразовать в объем. Затем путем вычитания объема липидов из V_t рассчитывали V_{taq} . V_{taq} рассчитывали согласно приведенным выше уравнениям 1-3, где $V_{\text{своб}}$ представляет собой объем супернатанта плюс объем промежуточной среды; $V_{\text{промежут}}$

представляет собой свободный (нелипосомальный) водный объем между осажденными липосомами после центрифугирования, и $V_{\text{липиды}}$ представляет собой объем липидов, рассчитанный из их массы, деленной на их плотность. $V_{\text{свободн}}$ ($V_{\text{промежут}}$) вычисляли в соответствии с уравнением 1.

5 Для такого определения рассчитывали относительное стандартное отклонение (% ОСО) ($n=5$). Удельный захваченный водный объем ($V_{\text{таq}}$), рассчитанный на основе радиоактивности верхней фазы (супернатанта), составлял $1,9 \pm 0,06$ мкл/мг липида. Удельный захваченный объем (V_t), рассчитанный на основе радиоактивности верхней фазы, составлял $2,9 \pm 0,06$ мкл/мг липида с % ОСО 2,9% (фигура 4).

10

Пример 2: Определение захваченного объема при различных концентрациях липидов

Липосомальный образец разбавляли с помощью 10 мМ изоосмотического гистидинового буфера с рН 6,5 в 4% манните. Удельный захваченный водный объем определяли, как описано в примере 1, на основе соотношения DPM/мл супернатанта и
15 DPM/мл всей липосомной дисперсии. Между общей концентрацией липидов и % захваченного водного объема была обнаружена линейная корреляция. Относительное стандартное отклонение увеличивалось экспоненциально по мере уменьшения концентрации липидов (фигура 5). Удельный $V_{\text{таq}}$ липосомального образца рассчитывали путем его нормализации по массе липидов для определения среднего удельного
20 захваченного водного объема ($n=15$) (мкл захваченного объема/мг липида). Удельный $V_{\text{таq}}$ составлял $2,0 \pm 0,3$ мкл/мг липида (фигура 6). Полученные результаты ясно продемонстрировали, что удельный $V_{\text{таq}}$ (мкл/мг липидов) остается неизменным независимо от общей концентрации липидов для одной и той же липосомальной композиции. Таким образом, способ определения захваченного объема является
25 адекватным и надежным. Тот факт, что удельный захваченный объем не зависит от концентрации липидов (липосом), явно подтверждает отсутствие взаимодействия между ^{14}C -карбокси-инулином и липосомами.

Пример 3: Определение захваченного объема при различных концентрациях ^{14}C -карбоксил-инулина

30

Чтобы убедиться, что на определение захваченного водного объема ($V_{\text{таq}}$) не влияет взаимодействие ^{14}C -карбоксил-инулина с липосомами, определяли водный захваченный объем при различных концентрациях ^{14}C -карбоксил-инулина, как описано в примере 1, на основе радиоактивности супернатанта. На фигуре 7 показано, что средний удельный

захваченный водный объем ($n=6$) составлял $2,2\% \pm 0,1$ при ОСО $4,3\%$, что указывает на то, что ^{14}C -карбокси-инулин при добавлении к предварительно полученной липосомной дисперсии не взаимодействует с липосомной мембраной или не проникает в липосомы. Указанный вывод также подтвержден в Schafer et al., American Journal of Physiology-Legacy Content 206, 1964, 985-991.

Пример 4: Определение захваченного объема многослойных везикул (MLVs) по сравнению с большими мультивезикулярными везикулами (LMVVs)

Для обоснования целесообразности применения подхода на основе ^{14}C -инулина для определения V_t и $V_{\text{таq}}$ в качестве надежного показателя качества липосомной дисперсии, было проведено сравнение V_t и $V_{\text{таq}}$ липосомальных композиций, содержащих многослойные везикулы (MLVs) и большие мультивезикулярные везикулы (LMVVs). Липосомальную композицию LMVVs получали из MLVs путем повторяющихся циклов замораживания и оттаивания, как описано в Cohen et al., Journal of Controlled Release 160, 2012, 346-352.

Липосомальную композицию, состоящую из MLVs, получали следующим образом. MLVs из гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина (HSPC) и холестерина в мольном соотношении 2:1 или одного HSPC получали в физиологическом растворе путем смешивания фосфатидилхолина (с/без холестерина) в этаноле при температуре от 65 до 70 °C с последующей его инъекцией в водный раствор (воду или физиологический раствор). Концентрация фосфатидилхолина в липосомальной композиции составляла ~ 75 мМ. Затем для индуцирования превращения MLVs в LMVVs часть композиции подвергали десяти циклам замораживания и размораживания. Известно, что повторные циклы замораживания-размораживания липосом вызывают резкое увеличение захваченного водного объема (Sriwongsitanont et al., The Open Colloid Science Journal, 4, 2010, 1-6; Elorza et al., Journal of microencapsulation, 10(2), 1993, 237-248; Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 817(1), 1985, 193-196). Во время замораживания бислой липосом разрушается и дестабилизируется (MacDonald et al., Liposome Technology, 1, 1993, 209-228), тогда как во время оттаивания открытые гидрофобные ядра сливаются с образованием новых везикул с уменьшенным количеством ламелл (Pick, Archives of biochemistry and biophysics, 212(1), 1981, 186-194).

Липосомы исследовали с точки зрения их распределения по размерам и концентрации фосфатидилхолина. Хотя образцы (с одинаковым липидным составом), содержащие как MLV, так и LMVV, имели одинаковую концентрацию липидов и

аналогичный средний диаметр (хотя и несколько разное распределение по размеру), визуальный осмотр флаконов после центрифугирования показал значительное увеличение объема осадка LMVVs по сравнению с MLVs. Было также обнаружено, что захваченный объем LMVVs (V_t) и особенно захваченный водный объем V_{taq} значительно больше, чем 5 указанные объемы MLVs.

Полученные результаты обобщены в таблице 1 и показаны на фигуре 8.

Таблица 1.

Идентификатор образца	Концентрация липида (мМ)	Средний диаметр (мкм)	V_{taq} (%)	Удельный V_{taq} (мкл захваченного водного объема/мг липида)	V_t (%)	Удельный V_t (мкл захваченного объема/мг липида)	V_{taq}/V_t
MLV HSPC/ХОЛЕСТЕРИН	108	11,4±7,7	14,7 ± 2,8	2,9±0,6	19,8 ± 2,8	3,9±0,6	0,74
LMVV HSPC/ХОЛЕСТЕРИН	108	10,7±5,5	42,5±1,8	8,3±0,4	47,6±1,8	9,3±0,4	0,89
MLV HSPC	76	9,1±6,8	10,1±1,0	1,9±0,2	15,5±1,0	2,9±0,2	0,65
LMVV HSPC	76	9,1±5,4	56,7±0,7	10,5±0,1	62,1±0,7	11,5±0,1	0,91

10 Таким образом, способ согласно настоящему изобретению обеспечивает точное измерение V_t , V_{taq} , удельного V_t и удельного V_{taq} , демонстрируя значительное различие в захваченном объеме MLVs по сравнению с LMVVs. В частности, захваченный объем LMVVs был значительно больше, чем захваченный объем MLVs.

15 *Пример 5: Сравнение захваченного объема, измеренного с применением способа согласно настоящему изобретению и способа с применением ионов кальция в качестве захваченного маркера*

Для дополнительного подтверждения правильности способа определения V_{taq} на основе ^{14}C -инулина применяли способ, позволяющий непосредственно определять 20 захваченный объем путем инкапсуляции маркера внутри водной фазы липосом во время гидратации липидов, и сравнивали со способом согласно настоящему изобретению. В частности, для непосредственного определения V_{taq} MLVs, состоящих из DMPC/DPPC в мольном соотношении 45:55, в качестве водорастворимого мембранно-непроницаемого маркера были выбраны ионы кальция. Липосомы получали путем инъекции смеси липидов 25 в этаноле в водную среду, содержащую 20 мМ ионов кальция (в виде ацетата кальция) в 10

мМ гистидиновом буфере с рН 6,5 в 4% манните (гистидиновом буфере на основе маннита, НМВ). Замену буфера и удаление этанола и неинкапсулированных ионов кальция осуществляли путем повторных циклов осаждения (путем центрифугирования) и повторных процедур промывания липосом с применением того же НМВ без ацетата кальция. Такие повторные циклы осаждения и промывания MLVs выполняли для обеспечения по существу полного удаления внешней среды, содержащей кальций, и замены ее на изоосмотический НМВ. рН и осмоляльность промывочной среды и гидратационной среды, содержащей ацетат кальция, довели до 6,5, 272 и 279 мОсм/кг, соответственно. Внешнюю среду, содержащую ионы кальция, заменяли на среду НМВ путем выполнения 5 последовательных циклов центрифугирования и стадий промывания. Концентрация липидов и осмоляльность конечной липосомальной дисперсии составляли 148 мМ всех РСs (фосфохолины) (105 мг/мл) и 279 мОсм/кг, соответственно. Концентрацию захваченных ионов кальция внутри липосом определяли с применением индуктивно связанной плазмы (ИРС) - оптико-эмиссионной спектрометрии (ICP-OES). Для введения поправки на свободный объем и вычитания его вклада из количества внутрилипосомального кальция свободный объем определяли после получения липосом с применением ¹⁴С-инулина, добавленного к липосомной дисперсии (как описано выше, путем измерения радиоактивности осадка, содержащего множество липосом и промежуточную среду между липосомами). Для сравнения, водный захваченный объем такой же липосомальной композиции также определяли с применением ¹⁴С-инулина в качестве внешнего маркера, как описано в примере 1, на основе соотношения между (DPM/мл)_{суперн} и (DPM/мл)_{общ.}

Концентрацию кальция определяли с применением ICP-OES до и после замены буфера и удаления этанола и ионов кальция из внелипосомальной среды путем выполнения повторных циклов центрифугирования и промывания. Концентрацию остаточного кальция во внешней среде после центрифугирования также определяли в верхней фазе липосом. Вследствие высокой органической нагрузки липосомальные образцы обрабатывали путем кислотного разложения при 200 °С в течение 4 часов, что, как предполагалось, не влияло на определение кальция. Общую концентрацию липидов определяли с помощью модифицированной процедуры Бартлетта (Shmeeda H., et al., *Methods in enzymology*, 367, 2003, 272).

Захваченный водный объем ($V_{\text{таq}}$) рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\frac{\left(\frac{[\text{Кальций}_2] - [\text{Кальций}_e]}{[\text{Липид}_2]} \right)}{\left(\frac{[\text{Кальций}_1]}{[\text{Липид}_1]} \right)} = V_{\text{промежут}} - V_{\text{липид}} - V_{\text{уловленный водный}}$$

где Кальций₁ и Кальций₂ представляют собой общую концентрацию кальция до и после замены буфера, соответственно; Липид₁ и Липид₂ представляют собой общую концентрацию липидов до и после замены буфера, соответственно; Кальций_e представляет собой концентрацию остаточного кальция во внешнем объеме после замены буфера; V_{промежут} представляет собой объем промежуточной жидкости, определенный с помощью ¹⁴C-инулина в осадке; и V_{липиды} рассчитывали на основе известной концентрации липидов при условии, что плотность составляет ~1. Результаты определения концентраций кальция и концентраций липидов в различных образцах приведены в таблице 2.

10

Таблица 2.

	Кальций (мМ)	Липид (мМ)
Всего до замены буфера	19,27	202
Всего после замены буфера	6,034	148
Верхняя фаза после замены буфера	0,109	не применимо

Захваченный водный объем (V_{таq}), определенный на основании захваченного кальциевого маркера, составлял 24,42% (% от захваченного объема (6,034-0,109)/148×202/19,27)×100% – 7,1% – 10,45%= 24,42%) при удельном захваченном водном объеме (V_{таq}) 2,3 мкл/мг липида и удельном захваченном объеме (V_t) 4 мкл/мг липида. Внешний объем также рассчитывали с применением внешней концентрации кальция перед заменой буфера, которая согласно определению составляла 58%. Оба результата сравнивали с предложенным в настоящем изобретении способом с применением ¹⁴C-инулинового маркера следующим образом: Водный захваченный объем липосом определяли с помощью двух различных подходов: 1 - на основе отношения радиоактивности супернатанта к общей радиоактивности и 2 - на основе радиоактивности осадка (которая представляет собой радиоактивность промежуточной жидкости). При применении обоих подходов были получены аналогичные результаты. Для обоих подходов рассчитывали относительное стандартное отклонение (% ОСО) (n=5). Результаты расчета удельного захваченного водного объема (V_{таq}) и удельного захваченного объема (V_t) приведены в таблице 3.

25

Таблица 3.

	$V_{\text{таq}}$		Удельный $V_{\text{таq}}$		% ОСО (n=5)
	(%)	Коэффициент Стьюдента	мкл/мг липидов	Коэффициент Стьюдента	
Способ на основе ^{14}C-инулина (верхняя фаза)	24,1	0,87	2,3	0,08	3,6
Способ на основе ^{14}C-инулина (осадок)	24,9	0,48	2,4	0,05	1,95

Таким образом, результаты определения захваченного водного объема ($V_{\text{таq}}$) липосом, полученные на основе захваченных ионов кальция (внутри липосом) в качестве маркера, почти идентичны результатам, полученным с применением радиоактивного ^{14}C -инулинового внешнего маркера. Соответственно, применение ^{14}C -инулинового внешнего маркера в липосомной среде для определения V_t и $V_{\text{таq}}$ липосомной дисперсии обеспечивает согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения удобный, простой, чувствительный, надежный, точный и воспроизводимый способ. Указанный способ может быть применен для исследования предварительно полученных липосомальных дисперсий и не требует включения маркера внутрь липосом. Также было показано, что предложенный способ не зависит от мутности супернатанта после осаждения липосом и, следовательно, позволяет преодолевать проблемы, которые часто возникают при применении низкомолекулярного хромофора в качестве маркера для определения внелипосомной среды. Поскольку данный способ позволяет определять как V_t , так и $V_{\text{таq}}$, он является важным показателем свойств липосом и может использоваться для обеспечения качества предварительно полученных липосом.

Хотя были проиллюстрированы и описаны некоторые варианты реализации настоящего изобретения, должно быть ясно, что настоящее изобретение не ограничено вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Многочисленные модификации, изменения, вариации, замены и эквиваленты будут очевидны для специалистов в данной области техники без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, как описано в приведенной ниже формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема ($V_{\text{таq}}$) множества липосом в липосомальной композиции, включающий следующие
5 стадии:

(i) получения липосомальной композиции, содержащей множество липосом с заданной концентрацией липидов, суспендированных или диспергированных в жидкой среде;

(ii) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом
10 указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

(iii) измерения сигнала, индуцированного маркером в указанной липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

(iv) отделения жидкой среды от множества липосом с получением, тем самым,
15 жидкой среды и осадка, содержащего множество липосом и промежуточную среду между липосомами;

(v) измерения сигнала, индуцированного маркером в отделенной жидкой среде, полученной на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять объем жидкой среды и
20 промежуточной среды;

(vi) необязательно измерения сигнала, индуцированного маркером в осадке, содержащем множество липосом и промежуточную среду между липосомами, полученном на стадии (iv), что, тем самым, позволяет определять свободный объем между липосомами в осадке; и

(vii) расчета захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема ($V_{\text{таq}}$) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii) и (v) или на стадиях (iii), (v) и (vi), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

2. Способ по п. 1, в котором определение захваченного объема (V_t) множества
30 липосом в липосомальной композиции включает определение удельного захваченного объема.

3. Способ по п. 1, в котором определение захваченного водного объема множества липосом в липосомальной композиции включает определение удельного захваченного водного объема.

5 4. Способ по п. 1, в котором осуществляют стадию (vi), при этом стадия (vii) включает расчет захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii), (v), (vi), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

10 5. Способ по п. 1, в котором стадию (vi) не осуществляют, при этом стадия (vii) включает расчет захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (iii), (v), и заданной концентрации, обеспеченной на стадии (i).

15 6. Способ по п. 5, в котором стадия (vii) включает расчет соотношения между сигналом, индуцированным маркером в жидкой среде после стадии (iv), и сигналом, индуцированным маркером в липосомальной композиции перед стадией (iv).

20 7. Способ по любому из п.п. 1-6, в котором указанный маркер является водорастворимым.

8. Способ по любому из п.п. 1-7, в котором молекулярная масса указанного маркера составляет не менее примерно 2 кДа.

25 9. Способ по любому из п.п. 1-8, в котором указанный маркер представляет собой радиоактивный маркер.

10. Способ по п. 9, в котором указанный маркер представляет собой ^{14}C -карбокси-инулин.

30 11. Способ по любому из п.п. 1-10, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом, выбранных из группы, состоящей из однослойных везикул (SUV), крупных однослойных везикул (LUV), гигантских

однослойных везикул (GUV), олигослойных везикул (OLV), многослойных везикул (MLV), мультивезикулярных липосом (MVL) и их смеси или комбинации.

5 12. Способ по любому из п.п. 1-11, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом размером в диапазоне от примерно 0,3 мкм до примерно 50 мкм.

10 13. Способ по п. 12, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом размером в диапазоне от примерно 1 мкм до примерно 40 мкм.

14. Способ по любому из п.п. 1-13, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом с концентрацией липидов от примерно 50 мМ до примерно 300 мМ.

15 15. Способ по п. 14, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом с концентрацией липидов от примерно 100 мМ до примерно 200 мМ.

20 16. Способ по любому из п.п. 1-15, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество пустых липосом, по существу не содержащих активный фармацевтический агент.

25 17. Способ по любому из п.п. 1-15, в котором указанная липосомальная композиция содержит множество липосом, инкапсулирующих активный фармацевтический ингредиент.

18. Способ по п. 17, дополнительно включающий определение концентрации активного фармацевтического ингредиента, инкапсулированного посредством множества липосом.

30 19. Способ по любому из п.п. 1-18, в котором на стадии (iv) получают жидкую среду, по существу лишенную липосом.

20. Способ по любому из п.п. 1-19, в котором стадию (iv) осуществляют путем центрифугирования, фильтрации или декантации.

21. Способ по п. 20, в котором стадию (iv) осуществляют путем центрифугирования.

5 22. Способ по п. 21, в котором стадию (iv) осуществляют при относительном центробежном ускорении от примерно 10000 до примерно 30000 ($\times g$).

23. Способ по п. 21 или п. 22, в котором стадию (iv) осуществляют при температуре от примерно 2°C до примерно 25°C.

10 24. Способ по любому из п.п. 21-23, в котором стадию (iv) осуществляют в течение периода времени в диапазоне от примерно 10 минут до примерно 100 минут.

25. Способ контроля качества липосомальной композиции, включающий:

15 (i) определение захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) множества липосом в липосомальной композиции по любому из п.п. 1 - 24;

(ii) сравнение определенного захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}) с эталонными значениями захваченного объема (V_t) и захваченного водного объема (V_{taq}); и

20 (iii) отбраковка указанной липосомальной композиции, если определенный захваченный объем (V_t) и захваченный водный объем (V_{taq}) отличаются от эталонных значений более чем на плюс или минус 10%.

26. Способ контроля качества липосомальной композиции, содержащей активный фармацевтический ингредиент, инкапсулированный во множество липосом, включающий:

(i) определение концентрации активного фармацевтического ингредиента, инкапсулированного во множество липосом, в липосомальной композиции по п. 18;

30 (ii) сравнение определенной концентрации активного фармацевтического ингредиента с эталонной концентрацией активного фармацевтического ингредиента; и

(iii) отбраковка указанной липосомальной композиции, если определенная концентрация активного фармацевтического ингредиента отличается от эталонной концентрации активного фармацевтического ингредиента более чем на плюс или минус 10%.

27. Липосомальная композиция, приготовленная для внутрисуставного введения, содержащая жидкую среду; полиоловый агент, регулирующий тоничность; и множество липосом, состоящих по существу из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в соотношении примерно 45:55, при этом указанная композиция по существу не содержит активный фармацевтический агент, и при этом указанное множество липосом характеризуется удельным захваченным водным объемом, составляющим от примерно 1 до примерно 4 мкл/мг липида, как определено способом, включающим стадии:

(i) добавления маркера к указанной липосомальной композиции, при этом указанный маркер неспособен проникать в липосомы и его молекулярная масса равна или превышает 1 кДа;

(ii) измерения сигнала, индуцированного маркером в указанной липосомальной композиции, что, тем самым, позволяет определять общий объем липосомальной композиции;

(iii) определения объема жидкой среды и промежуточной среды между липосомами, полученной путем отделения жидкой среды от множества липосом, и измерения сигнала, индуцированного маркером в жидкой среде после отделения; и

(iv) расчета захваченного объема (V_l) и захваченного водного объема (V_{laq}) множества липосом на основе объемов, определенных на стадиях (ii) и (iii), и концентрации липидов, образующих липосомы.

28. Липосомальная композиция по п. 27, отличающаяся тем, что стадия (iii) дополнительно включает определение свободного объема между липосомами в осадке путем измерения сигнала, индуцированного маркером в осадке после разделения.

29. Липосомальная композиция по п. 27 или 28, отличающаяся тем, что молекулярная масса указанного маркера составляет не менее примерно 2 кДа.

30. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-29, отличающаяся тем, что указанный маркер является водорастворимым.

31. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-30, отличающаяся тем, что указанный маркер представляет собой радиоактивный маркер.

32. Липосомальная композиция по п. 31, отличающаяся тем, что указанный маркер представляет собой ¹⁴С-карбокси-инулин.

5 33. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-32, отличающаяся тем, что отделение жидкой среды от множества липосом осуществляют путем центрифугирования.

34. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-33, отличающаяся тем, что множество липосом выбрано из группы, состоящей из однослойных везикул (SUV),
10 крупных однослойных везикул (LUV), гигантских однослойных везикул (GUV), олигослойных везикул (OLV), многослойных везикул (MLV), мультивезикулярных липосом (MVL) и их смеси или комбинации.

35. Липосомальная композиция по п. 34, отличающаяся тем, что указанное
15 множество липосом представляет собой многослойные везикулы (MLV).

36. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-35, отличающаяся тем, что размеры указанного множества липосом составляют от примерно 0,3 мкм до примерно 50
20 мкм.

37. Липосомальная композиция по п. 36, отличающаяся тем, что размеры указанного множества липосом составляют от примерно 1 мкм до примерно 40 мкм.

38. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27 - 37, отличающаяся тем, что
25 концентрация липидов, образующих липосомы, составляет от примерно 50 мМ до примерно 300 мМ.

39. Липосомальная композиция по п. 38, отличающаяся тем, что концентрация
30 липидов, образующих липосомы, составляет от примерно 100 мМ до примерно 200 мМ.

40. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-39, рН которой составляет от примерно 5 до примерно 8.

41. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-40, отличающаяся тем, что жидкая среда представляет собой гистидиновый буфер.

5 42. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-41, отличающаяся тем, что указанный полиол представляет собой линейный полиол.

10 43. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-42, отличающаяся тем, что указанный полиол выбран из группы, состоящей из маннита, декстрозы, лактозы, трегалозы и их комбинаций.

44. Липосомальная композиция по п. 43, отличающаяся тем, что указанный полиол представляет собой маннит.

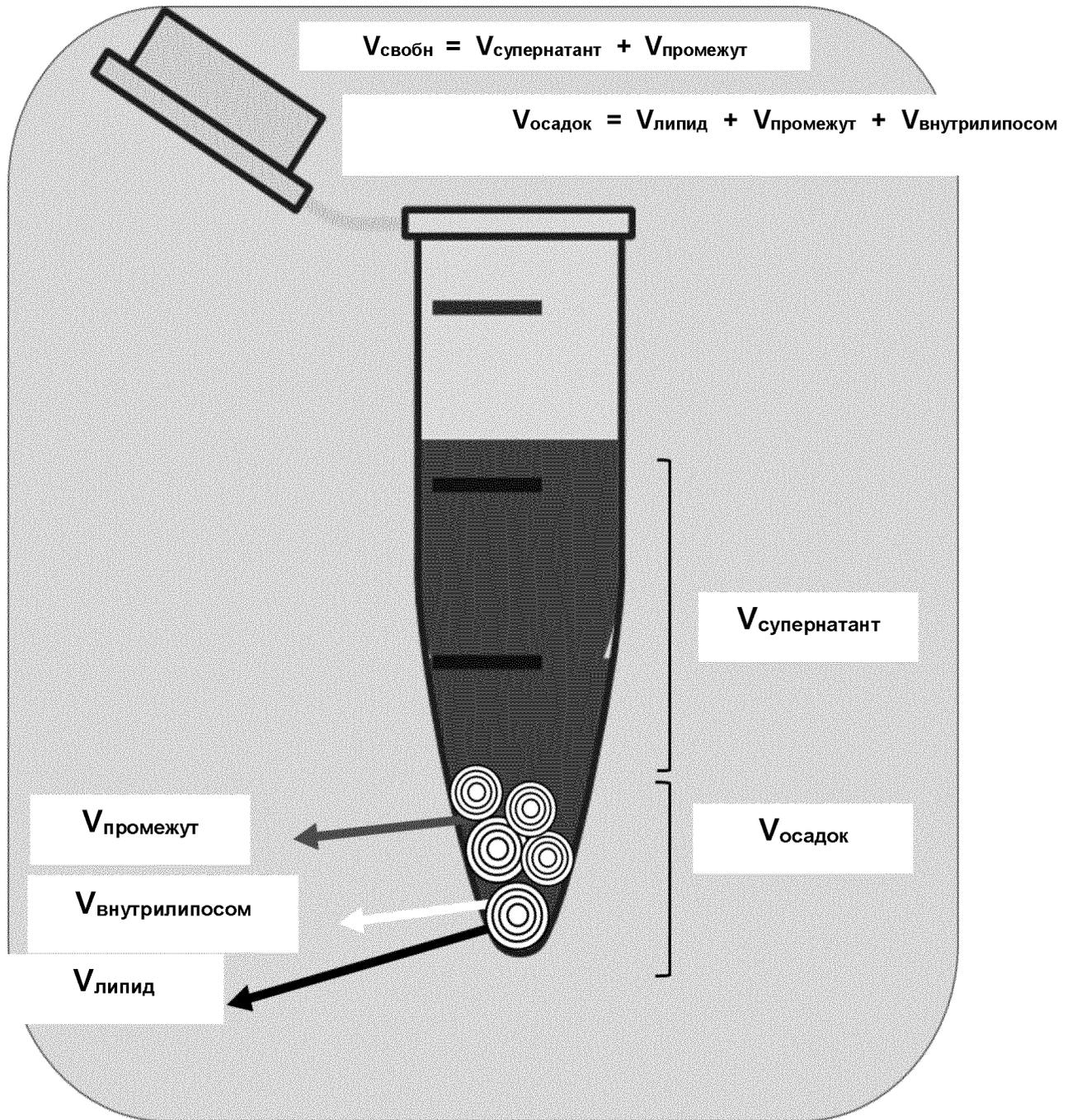
15 45. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27-44, отличающаяся тем, что массовый процент DMPC, присутствующего в композиции, составляет от примерно 1% (масс./масс.) до примерно 10% (масс./масс.), и массовый процент DPPC, присутствующего в композиции, составляет от примерно 2% (масс./масс.) до примерно 12% (масс./масс.).

20 46. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27 - 45, отличающаяся тем, что удельный захваченный водный объем составляет от примерно 1,5 до примерно 3,5 мкл/мг липида.

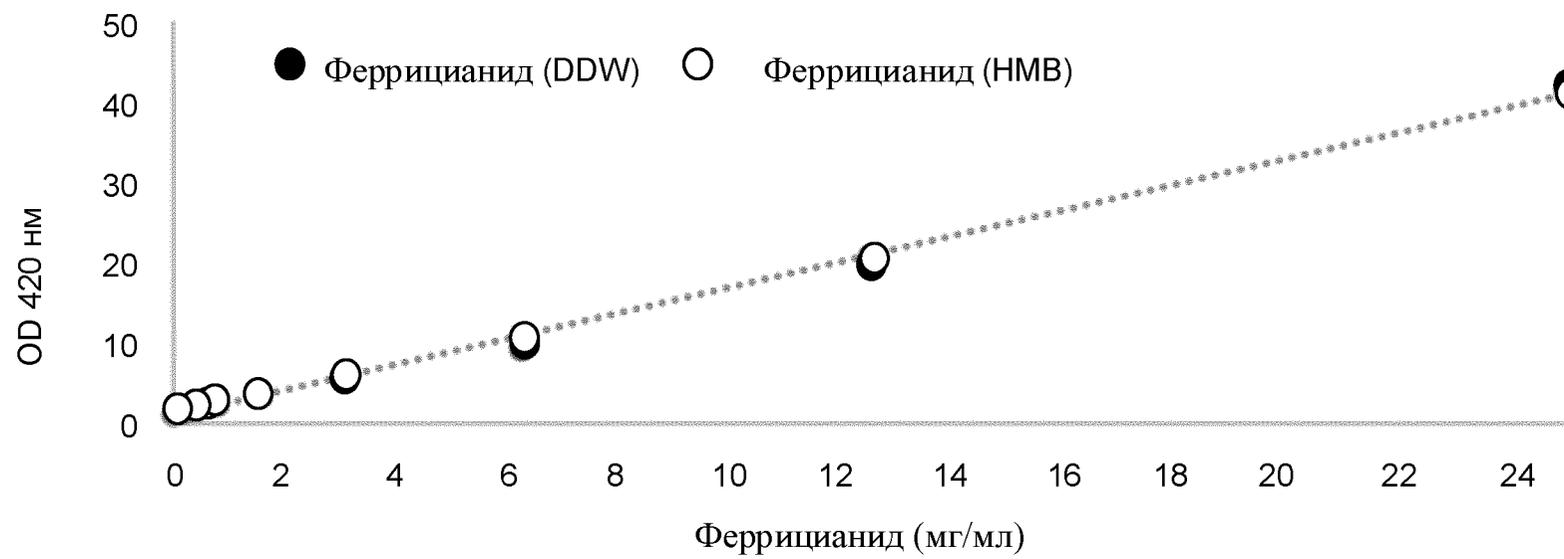
25 47. Липосомальная композиция по п. 46, отличающаяся тем, что удельный захваченный водный объем составляет от примерно 2 до примерно 3 мкл/мг липида.

48. Липосомальная композиция по любому из п.п. 27 - 45, отличающаяся тем, что захваченный водный объем составляет от примерно 10% до примерно 35%.

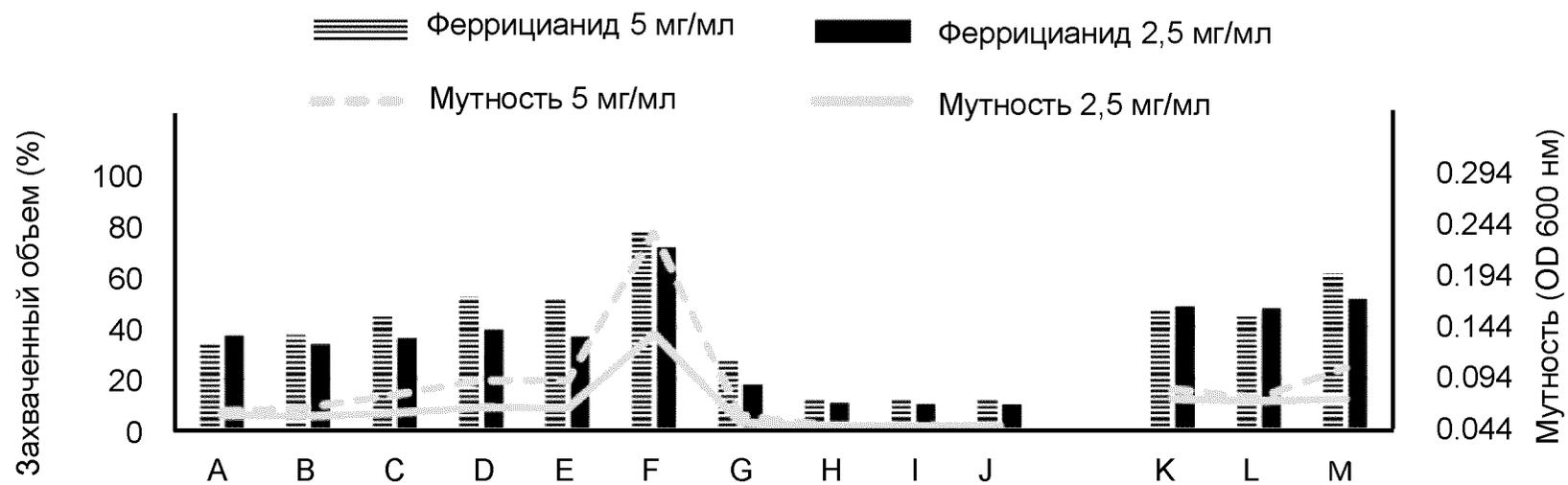
30 49. Липосомальная композиция по п. 48, отличающаяся тем, что захваченный водный объем составляет от примерно 20% до примерно 30%.



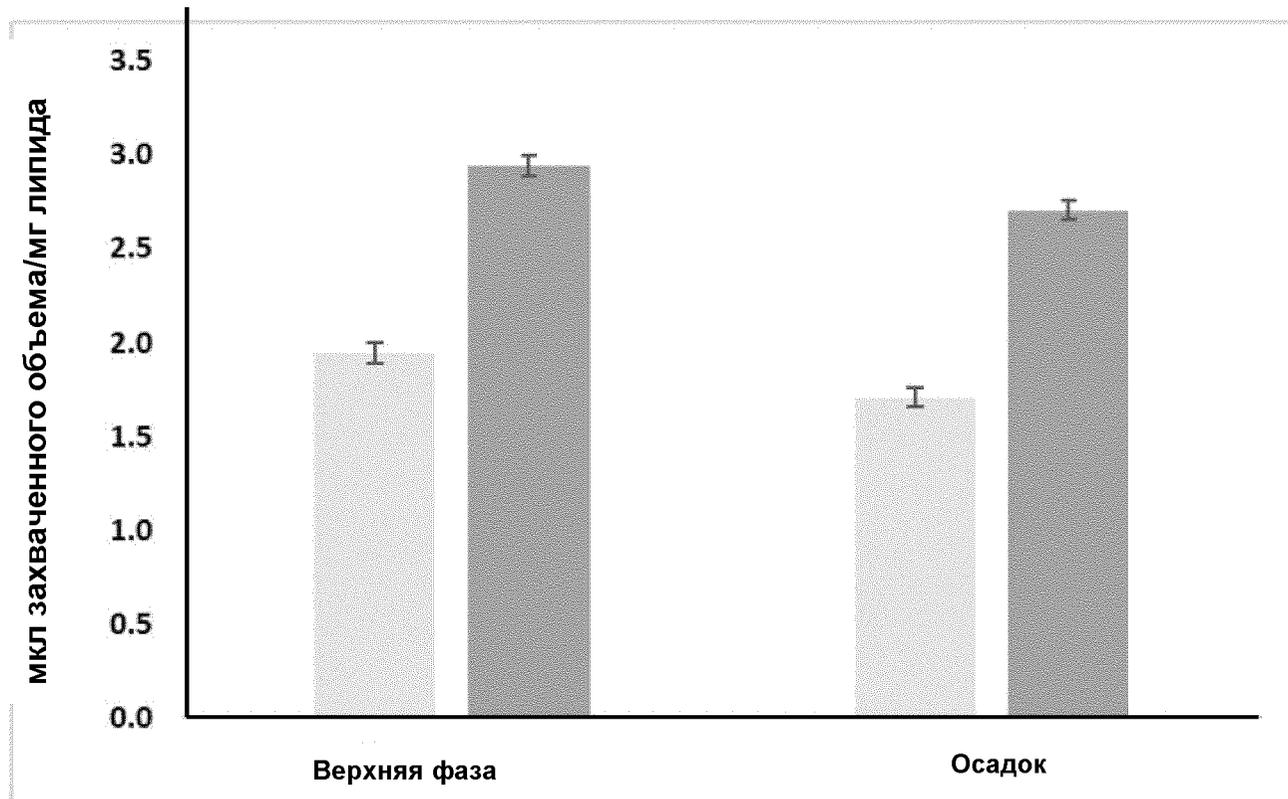
Фигура 1



Фигура 2

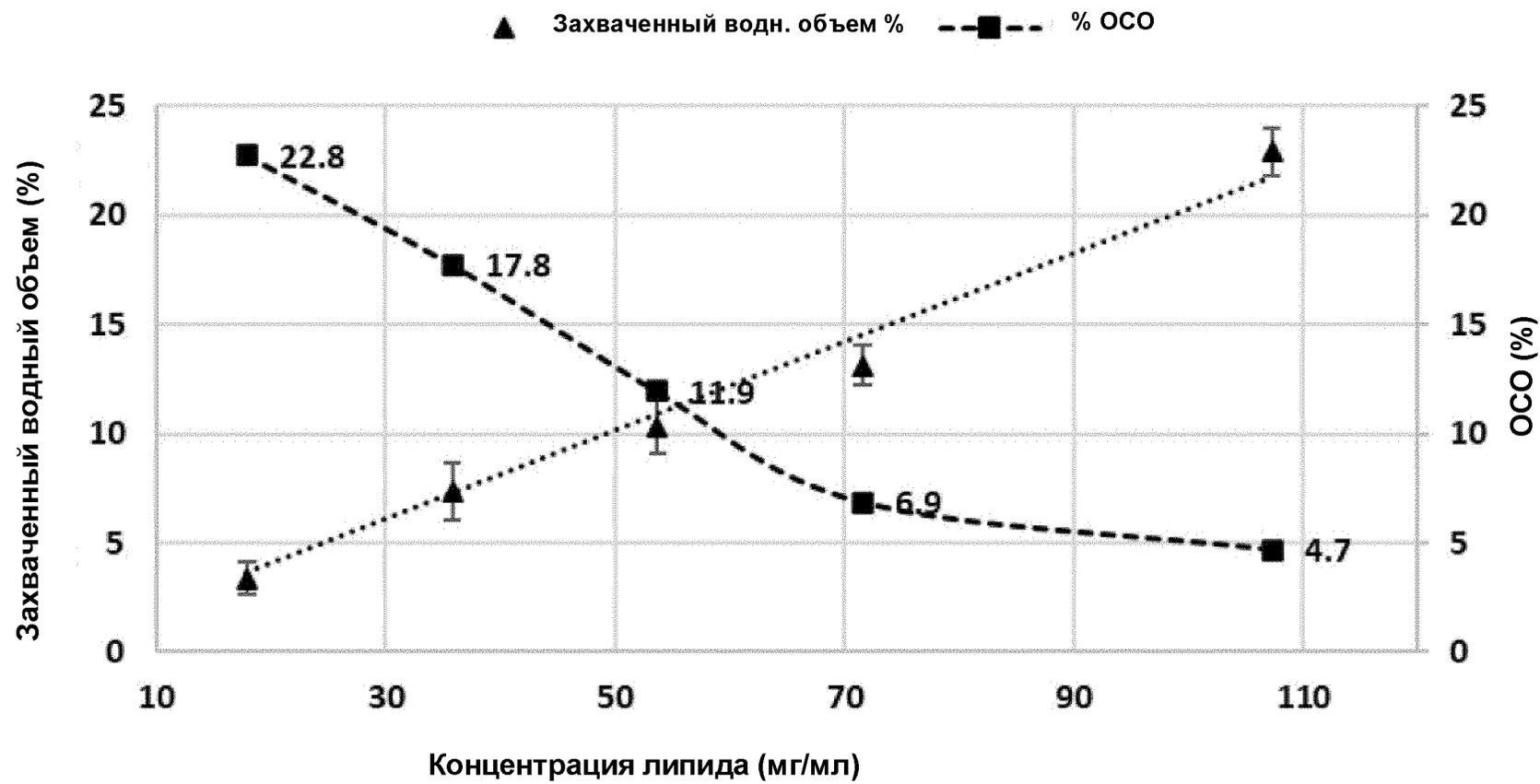


Фигура 3

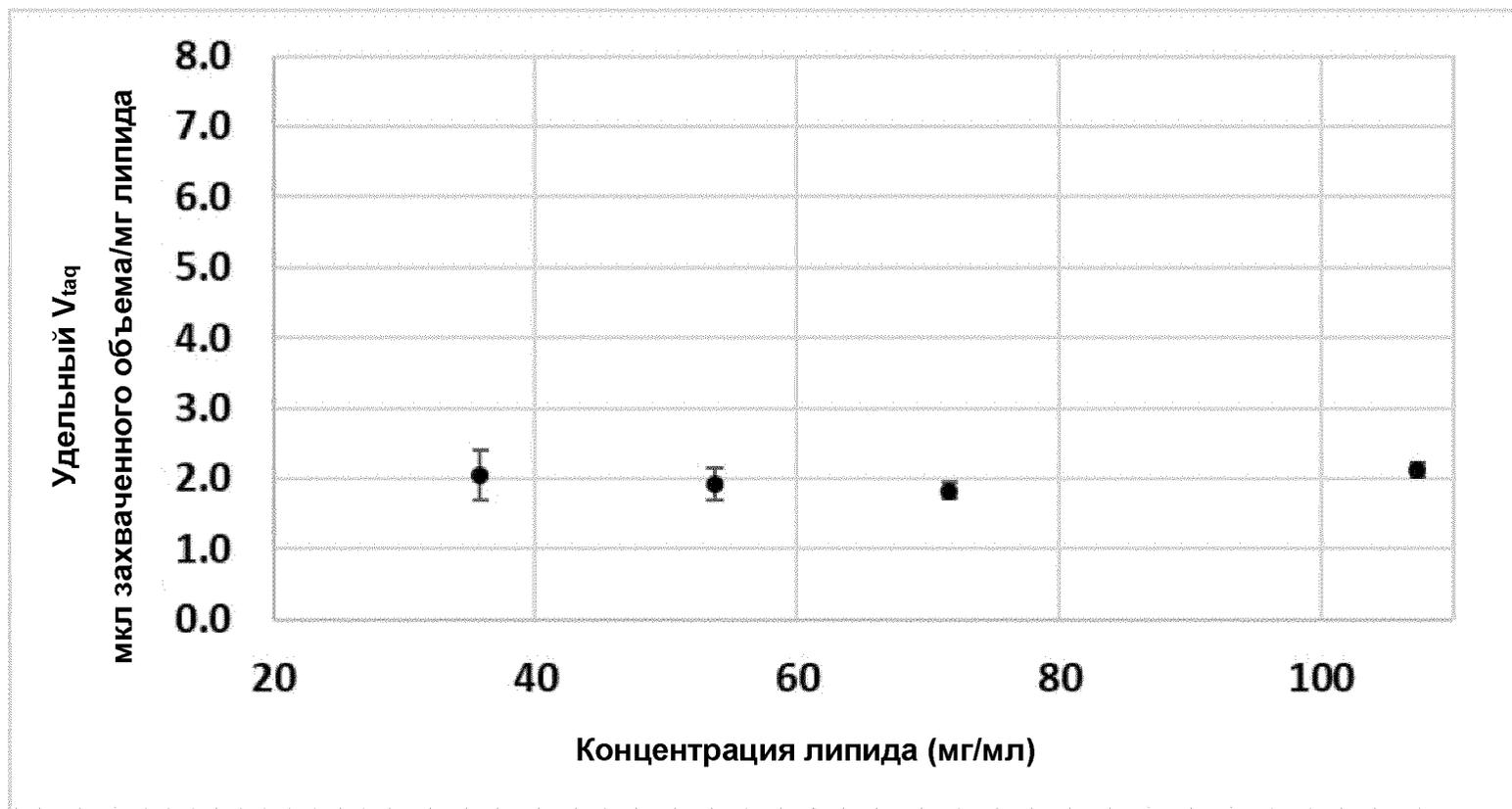


4/8

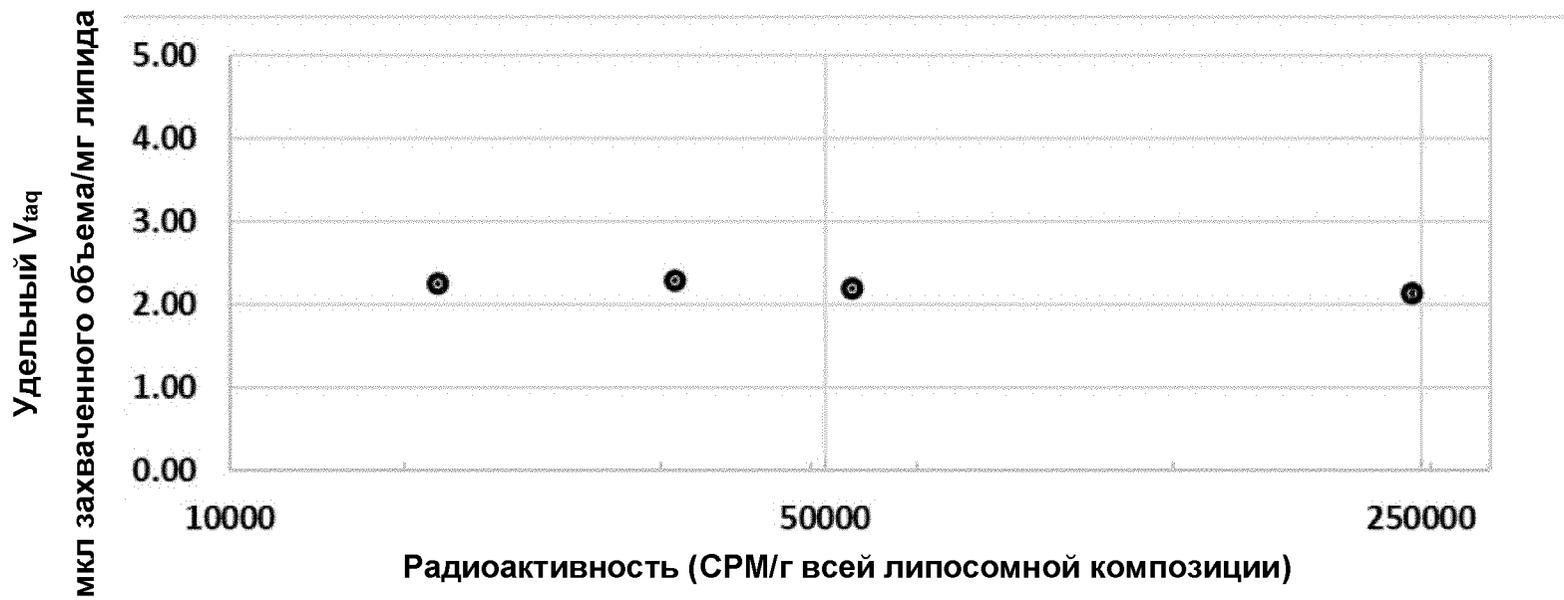
Фигура 4



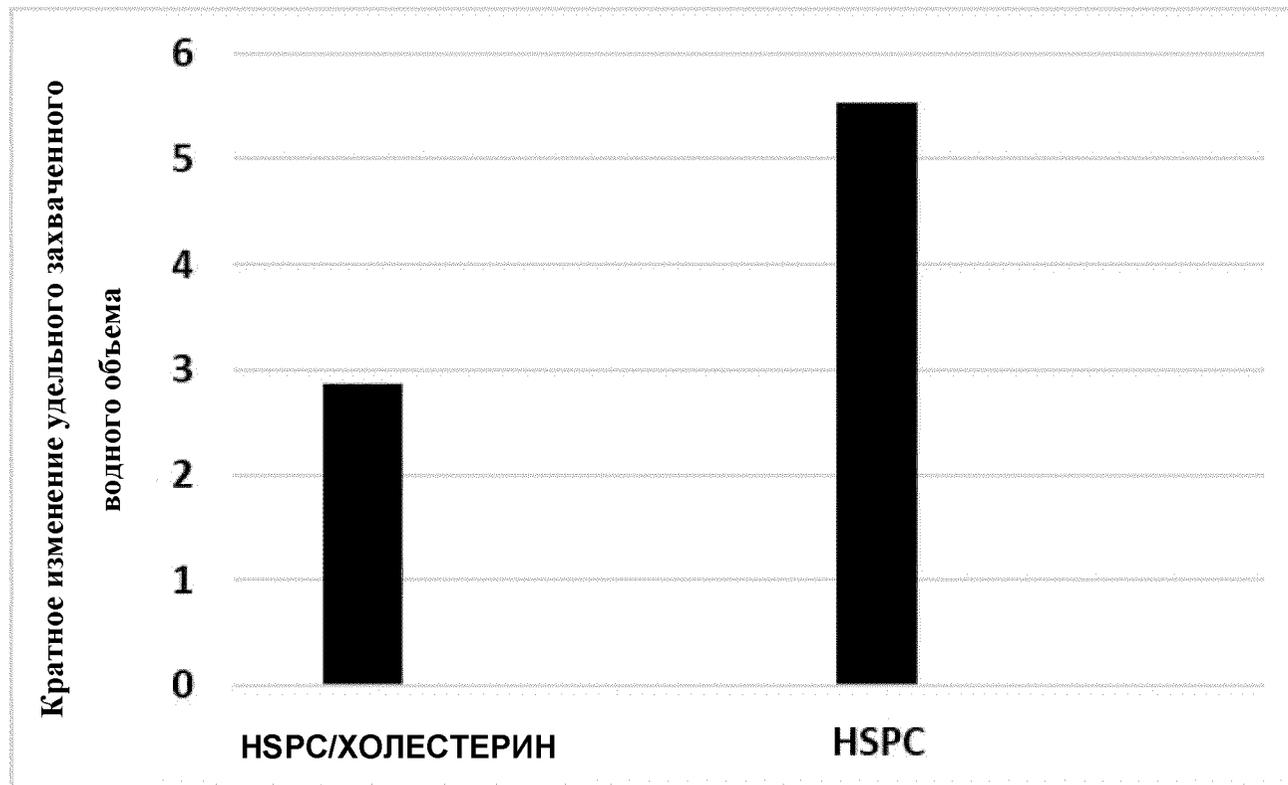
Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8