



(51) МПК

*A61K 47/42* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*A61K 31/337* (2006.01)  
*A61K 31/05* (2006.01)  
*A61K 9/14* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*B82B 1/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2009110382/15, 20.03.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.12.2003

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 09.12.2002 US 60/432,317;  
 03.12.2003 US 60/526,544;  
 04.12.2003 US 60/526,773;  
 05.12.2003 US 60/527,177

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
 из которой данная заявка выделена:  
 2005121569 09.12.2002

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2010 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: US 5916596 A, 29.06.1999. RU 2169010  
 C2, 20.06.2001. RU 2157213 C2, 10.10.2000. RU  
 2127606 C1, 20.03.1999

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, стр.3, ООО  
 "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

**ДЕСАЙ Нейл П (US),**  
**Янг Эндрю (US),**  
**СИ Шерри Сяопэй (US),**  
**ДЕ Тапас (US),**  
**ТРИУ Вуонг (US),**  
**СООН-ШИОНГ Патрик (US),**  
**БИЛЗ ГРИМ Бриджит (US),**  
**ЯО Цян (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**АБРАКСИС БАЙОСАЙЕНС, ЭлЭлСи (US)****(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки фармацевтического агента к очагу заболевания. Композиция содержит не растворимый в воде фармацевтический агент, представляющий собой паклитаксел, и фармацевтически приемлемый носитель, представляющий собой альбумин, предпочтительно, альбумин сыворотки человека. Отношение (мас./мас.) альбумина к паклитакселу

составляет 9:1. Фармацевтическая композиция содержит наночастицы, включающие паклитаксел и альбумин, где наночастицы имеют размер менее чем 200 нм. Введение фармацевтической композиции по изобретению обеспечивает улучшенные характеристики транспорта паклитаксела к очагу заболевания и уменьшение нежелательных побочных эффектов. 2 н. и 22 з.п. ф-лы, 5 табл., 51 пр.



(51) Int. Cl.

*A61K 47/42* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*A61K 31/337* (2006.01)  
*A61K 31/05* (2006.01)  
*A61K 9/14* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*B82B 1/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009110382/15, 20.03.2009**(24) Effective date for property rights:  
**09.12.2003**

Priority:

(30) Convention priority:

**09.12.2002 US 60/432,317;**  
**03.12.2003 US 60/526,544;**  
**04.12.2003 US 60/526,773;**  
**05.12.2003 US 60/527,177**

Number and date of priority of the initial application,  
 from which the given application is allocated:  
**2005121569 09.12.2002**

(43) Application published: **27.09.2010** Bull. № 27(45) Date of publication: **20.07.2014** Bull. № 20

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO**  
**"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",**  
**pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**DESAJ Nejl P (US),**  
**Jang Ehndrju (US),**  
**SI Sherri Sjaopehj (US),**  
**DE Tapas (US),**  
**TRIU Vuong (US),**  
**SOON-ShIONG Patrik (US),**  
**BILZ GRIM Bridzhit (US),**  
**JaO Tsjan (US)**

(73) Proprietor(s):

**ABRAKSIS BAJOSAJENS, EhlEhlSi (US)**

**(54) COMPOSITIONS AND METHODS OF DELIVERY OF PHARMACOLOGICAL AGENTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to a pharmaceutical composition for the delivery of a pharmaceutical agent to a focus of a disease. The composition contains a water-insoluble pharmaceutical agent which is paclitaxel, a pharmaceutically acceptable carrier which is albumin, preferentially human serum albumin. The relation (wt/wt) of albumin to paclitaxel makes 9:1. The phar-

maceutical composition contains nanoparticles containing paclitaxel and albumin wherein the nanoparticles have a size of less than 200 nm.

EFFECT: administering the pharmaceutical composition according to the invention provides enhanced characteristics of the delivery of paclitaxel to the site of the disease and reduced adverse side effects.

24 cl, 5 tbl, 51 ex

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ПАТЕНТНЫЕ ЗАЯВКИ

По данной патентной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 60/432317, поданной 9 декабря 2002 года, предварительной заявки на выдачу патента США (досье поверенного № 225519),  
 5 поданной 3 декабря 2003 года, предварительной заявки на выдачу патента (досье поверенного № 225549), поданной 4 декабря 2003 года и предварительной заявки на выдачу патента США (досье поверенного № 225585), поданной 5 декабря 2003 года.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

10 Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически активные агенты для парентерального или другого внутреннего применения, которые при введении обладают эффектом уменьшения некоторых нежелательных побочных эффектов при сравнении с доступными препаратами похожих лекарственных средств.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 Хорошо известно, что множество лекарственных (веществ) средств для парентерального применения, особенно лекарственные средства, вводимые внутривенно, вызывают нежелательные побочные эффекты, такие как раздражение вен, флебит,  
 жжение и боль при инъекции, венозный тромбоз, кровоизлияние и другие, связанные с введением, побочные действия. Многие из таких лекарственных средств нерастворимы  
 20 в воде, и, таким образом, их приготавливают с использованием солюбилизующих агентов, поверхностно-активных средств, растворителей и/или эмульгаторов, которые являются раздражающими, аллергенными или токсичными при введении их пациентам (см., например, Briggs et al., *Anesthesia* 37, 1099 (1982) и Waugh et al., *Am. J. Hosp. Pharmacists*, 48, 1520 (1991)). Часто несвязанные лекарственные средства, представленные в  
 25 препарате, вызывают болезненность и раздражение при их введении. Например, у 50% пациентов, которые получали при введении через периферическую вену ифосфамид и винорелбин в качестве первоначальной химиотерапии распространенной немелкоклеточной карциномы легкого, наблюдали флебиты (см., например, Vallejo et al., *Am. J. Clin. Oncol.*, 19 (6), 584-8 (1996)). Кроме того, было показано, что ванкомицин  
 30 вызывает такие побочные действия, как флебит (см., например, Lopes Rocha et al., *Braz. J. Infect. Dis.*, 6 (4), 196-200 (2002)). Применение цисплатина, гемцитабина и SU5416 пациентами с солидными опухолями приводило к появлению побочных реакций, таких как тромбозы глубоких вен и флебит (см., например, Kuenen et al., *J. Clin. Oncol.*, 20 (6), 1657-67 (2002)). В дополнение, пропофол, анестезирующее средство, может вызывать  
 35 болезненность при инъекции, жжение и раздражение вен, особенно при введении в качестве стабилизированной лецитином жировой эмульсии (см., например, Tan et al., *Anesthesia*, 53, 468-76, (1998)). Другие лекарственные средства, которые проявляют побочные действия, связанные с их введением, включают, например, таксол (паклитаксел) (см., например, листок-вкладыш в упаковке таксола для внутривенного  
 40 применения), кордарон (гидрохлорид амиодарона) (см., например, листок-вкладыш в упаковке кордарона для внутривенного применения), тиреоидный гормон Т3 или лиотиронин (коммерчески доступный как триостат), тиотепу, блеомицин и диагностические радиоконтрастные средства.

Другой проблемой, связанной с промышленным производством лекарственных  
 45 средств для инъекций, особенно нерастворимых в воде лекарственных средств, является обеспечение стерильности. Стерильное производство лекарственных эмульсий/дисперсий можно осуществить при полной стерилизации всех компонентов до производства, за которой следует абсолютно асептическая методика на всех стадиях промышленного

производства. Тем не менее, такие способы трудоемки и дороги. В дополнение, окисление лекарственных препаратов под воздействием воздуха во время промышленного производства или хранения может привести, например, к снижению pH, деградации лекарственного средства и обесцвечиванию, тем самым, нарушая устойчивость лекарственного препарата и/или уменьшая срок годности.

Для того чтобы преодолеть проблемы, связанные с относящимися к введению лекарственных препаратов побочными действиями, попытались приготовить альтернативные препараты. По отношению к пропофолу, например, способы для уменьшения болезненности, вызванной введением пропофола, включают увеличение содержания жиров в растворителе (например, длинноцепочечные триглицериды (ЛСТ)), предварительную медикаментозную подготовку, предварительную обработку нестероидными лекарственными средствами, местными анестетиками, опиатами, добавление лидокаина, добавление циклодекстрина и микрофильтрацию (см., например Mayer et al., *Anaesthetist*, 45(11), 1082-4 (1996), Davies, et al. *Anaesthesia*, 57, 557-61 (2002), Doenicke, et al., *Anaesth. Analg.*, 82, 472-4 (1996), Larsen et al., *Anaesthetist*, 50, 842-5 (2001), Lilley et al., *Anaesthesia*, 51, 815-8 (1996), Bielen et al., *Anaesth. Analg.*, 82(5), 920-4 (1996) и Knibbe et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 47 (6), 653-60 (1999)). Данные составы, однако, вызывают другие побочные действия (например, сердечно-сосудистые осложнения) или являются причиной нарушения устойчивости эмульсий с пропофолом.

Для того чтобы преодолеть проблему бактериального загрязнения, были разработаны препараты пропофола с антибактериальными агентами, такими как аналог EDTA (например, эдетат), пентетат или содержащие сульфит агенты, или их готовили при более низком значении pH (см., например, патенты США №№ 5714520, 5731355, 5731356, 6028108, 6100302, 6147122, 6177477, 6399087, 6469069 и предварительную заявку на выдачу патента № WO 99/39696). Несмотря на то, что эдетат и пентетат являются хелаторами ионов металлов, они, однако, имеют возможность оказаться опасными, удаляя важные ионы металлов из системы организма. Более того, добавление сульфитов в составы лекарственных средств является причиной возможных побочных эффектов у детей и у тех людей в общей популяции, у которых имеется аллергия на серу.

Таким образом, остается необходимость в создании композиции и способа, которые уменьшают или удаляют побочные действия, связанные с парентеральным введением или введением *in vivo* лекарственных средств. Также существует необходимость в создании фармацевтической композиции, которая является стерильной и в способах приготовления такой композиции. Дополнительно, существует необходимость в создании фармацевтической композиции и способе, которые снижают или исключают окисление фармацевтических препаратов для предупреждения нарушения устойчивости лекарственного средства.

Данное изобретение относится к таким композициям и способам. Существуют и другие преимущества изобретения, а также дополнительные особенности изобретения будут очевидны из представленного здесь описания изобретения.

#### РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к различным осуществлениям фармацевтических композиций. Одно, некоторые или все свойства различающихся вариантов можно обнаружить в разных осуществлениях и все же они находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения.

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает белок, такой как альбумин, более

предпочтительно, альбумин сыворотки человека, в количестве, эффективном для уменьшения одного или более побочных эффектов при введении фармацевтической композиции человеку, и в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит дефероксамин в количестве, эффективном для подавления роста микроорганизмов в фармацевтической композиции. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает белок, такой как альбумин, в количестве, эффективном для уменьшения одного или более побочных эффектов при введении фармацевтической композиции человеку, и в которой фармацевтически приемлемый носитель включает дефероксамин в количестве, эффективном для ингибирования окисления в фармацевтической композиции.

Изобретение относится к способу уменьшения одного или более побочных эффектов, связанных с введением фармацевтической композиции человеку, включающему (а) введение человеку фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин и дефероксамин. Также изобретение относится к способам подавления роста микроорганизмов или ингибирования окисления, или подавления роста микроорганизмов и окисления в фармацевтической композиции. Данные способы охватывают приготовление фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает дефероксамин в количестве, эффективном для подавления роста микроорганизмов, или в количестве, эффективном для ингибирования окисления в фармацевтической композиции.

Изобретение также относится к способу увеличения транспорта фармацевтического агента к очагу заболевания, который включает введение человеку фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин и в которой соотношение альбумина и фармацевтического агента в фармацевтической композиции составляет приблизительно 18:1 или менее. Далее изобретение относится к способу увеличения связывания фармацевтического агента клеткой *in vitro* или *in vivo*, где способ включает применение к указанным клеткам *in vitro* или *in vivo* фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин и в которой соотношение альбумина и фармацевтического агента в фармацевтической композиции составляет приблизительно 18:1 или менее.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин в количестве, эффективном для увеличения транспорта лекарственного средства к очагу заболевания у человека, и в которой соотношение альбумина и фармацевтического агента составляет приблизительно 18:1 или менее.

Изобретение также относится к способу увеличения транспорта фармацевтического агента к клетке *in vitro* или *in vivo*, посредством объединения указанного агента с белком, где указанный белок связывается с определенным рецептором на клеточной поверхности указанной клетки, где указанное связывание комбинации белка и фармацевтического агента с указанным рецептором обуславливает транспорт, и где соотношение белка и фармацевтического агента составляет приблизительно 18:1 или менее.

#### ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает белок, такой как альбумин, предпочтительно альбумин сыворотки человека, в количестве, эффективном для уменьшения одного или более побочных эффектов при введении фармацевтической композиции человеку, и в которой фармацевтически приемлемый носитель включает дефероксамин в количестве, эффективном для подавления роста микроорганизмов в фармацевтической композиции. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель включает белок, такой как альбумин, в количестве, эффективном для уменьшения одного или более побочных эффектов при введении фармацевтической композиции человеку, и в которой фармацевтически приемлемый носитель включает дефероксамин в количестве, эффективном для ингибирования окисления в фармацевтической композиции.

Любой подходящий фармацевтический агент можно использовать в фармацевтической композиции по изобретению. Подходящие фармацевтические агенты включают, в качестве неограничивающих примеров, противораковые агенты или противоопухолевые средства, агенты, действующие на микротрубочки, иммуносупрессивные агенты, анестезирующие средства, гормоны, агенты для использования при сердечно-сосудистых нарушениях, антиаритмические средства, антибиотики, противогрибковые средства, антигипертензивные средства, противоастматические средства, анальгетики, противовоспалительные агенты, антиартритические агенты и вазоактивные агенты. Изобретение также применимо для множества других классов лекарственных средств. Более определенно, подходящие фармацевтические агенты включают, в качестве неограничивающих примеров, таксаны (например, таксол<sup>®</sup> (паклитаксел) и таксотер<sup>™</sup> (доцетаксел)), эпотилоны, кампотecin, колхицин, амиодарон, тиреоидные гормоны, вазоактивные пептиды (например, вазоактивный интестинальный пептид), амфотерицин, кортикостероиды, пропофол, мелатонин, циклоспорин, рапамицин (сиролимус), такролимус, микофенольные кислоты, ифосфамид, винорелбин, ванкомицин, гемцитабин, SU5416, тиотепу, блеомицин, диагностические радиоcontrastные агенты и их производные. Другие лекарственные средства, которые применимы в композиции по изобретению, описаны, например, в патенте США № 5916596 и в одновременно рассматриваемой заявке на патент США № 09/446783. Предпочтительно, фармацевтический агент представляет собой пропофол, паклитаксел или доцетаксел. Более предпочтительно, фармацевтический агент представляет собой пропофол или паклитаксел. Наиболее предпочтительно, фармацевтический агент представляет собой пропофол.

Таксол<sup>®</sup> (паклитаксел) (Bristol-Myers Squibb) активен против карцином яичника, молочной железы, легких, пищевода и головы, и шеи. Однако было показано, что таксол вызывает токсичность, связанную с его введением, а также значительную острую и кумулятивную токсичность, такую как миелосупрессия, нейтропеническая лихорадка, анафилактическая реакция и периферическая невропатия. Поскольку паклитаксел слабо растворим в воде, типично используют кремофор в качестве растворителя, требующего больших объемов вливаний и специальных трубок и фильтров. Кремофор связан с побочными действиями, которые могут оказаться серьезными, включая анафилаксию и другие аллергические реакции, которые могут потребовать предварительной обработки кортикостероидами, антигистаминными средствами и H<sub>2</sub>-блокаторами (см., например,

Gelderblom et al., *Eur. J. Of Cancer*, 37, 1590-1598, (2001)). Таксотер<sup>TM</sup> (доцетаксел) используется при лечении устойчивого к антрациклину рака молочной железы, но также, как ранее было описано, вызывает побочные действия в виде аллергии и отечности, которые могут быть тяжелыми. Эпотилон (и его производные) также типично вводят с кремофором, и, как было показано, он вызывает тяжелую нейтропению, аллергию и невропатию.

Пропофол (2,6-диизопропилфенол) представляет собой гидрофобное нерастворимое в воде масло, которое широко используется в качестве внутривенного анестетика, чтобы вызвать и поддерживать общую анестезию и седативный эффект у людей и животных. Пропофол типично вводят непосредственно в кровоток, и он проходит через гематоэнцефалический барьер. Фармацевтические композиции, содержащие пропофол, должны быть достаточно жирорастворимыми, для того чтобы пройти через данный барьер и оказать угнетающее действие на соответствующие механизмы головного мозга. Максимальная растворимость пропофола в воде составляет  $1,0 \pm 0,02$  мкМ при температуре  $22,5^\circ\text{C}$  (см., например, Tonner et al., *Anesthesiology*, 77, 926-931 (1992)). Как таковой, пропофол в основном приготавливают в качестве эмульсии, содержащей солюбилизующие агенты, поверхностно-активные средства, растворители, или в качестве эмульсии типа масло в воде (см., например, патенты США №№ 6150423, 6326406 и 6362234). Композиции по настоящему изобретению включают, в дополнение к активному фармацевтическому агенту, фармацевтические носители или наполнители. Выбор носителя не является непременно решающим, и в композиции можно использовать любой из носителей, известных в данной области. Выбор носителя предпочтительно частично определяется определенным участком, в который необходимо ввести фармацевтическую композицию, и определенным способом, используемым для введения фармацевтической композиции. Предпочтительно, фармацевтически приемлемый носитель включает белки. Можно использовать любой подходящий белок. Примеры подходящих белков включают, в качестве неограничивающих примеров альбумин, иммуноглобулины, включая сюда IgA, липопротеины, аполипопротеин В, бета-2-макроглобулин, тиреоглобулин и тому подобное. Наиболее предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель содержит альбумин, наиболее предпочтительно альбумин сыворотки человека. Белки, включающие в себя альбумин, подходящие для изобретения, могут быть природными по происхождению или получены синтетически.

Альбумин сыворотки человека (HSA) представляет собой хорошо растворимый глобулярный белок  $M_r$  65К и состоит из 585 аминокислот. HSA присутствует в самом большом количестве в плазме и составляет 70-80% коллоидного осмотического давления плазмы человека. Аминокислотная последовательность HSA содержит в общей сложности 17 дисульфидных мостов, один свободный тиол (Cys 34) и один триптофан (Trp 214). Внутривенное использование растворов HSA предписано для предупреждения и лечения гиповолемического шока (см., например, Tullis, *JAMA*, 237, 355-360, 460-463, (1977) и Houser et al., *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 150, 811-816 (1980)) и совместно с обменным переливанием крови для лечения гипербилирубинемии новорожденных (см., например, Finlayson, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 6, 85-120, (1980)).

Альбумин сыворотки человека (HSA) содержит множество гидрофобных участков связывания (в общей сложности восемь для жирных кислот, эндогенного лиганда HSA) и связывает разнообразный ряд лекарственных средств, особенно нейтральные и отрицательно заряженные гидрофобные соединения (Goodman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill New York (1996)). Наличие двух высоко аффинных

участков связывания предположили в субдоменах IIА и IIIА HSA, которые представляют собой сильно удлинённые гидрофобные карманы с заряженными остатками лизина и аргинина на поверхности, которые функционируют в качестве точек присоединения полярных структурных элементов лиганда (см., например, Fehske et al., *Biochem. Pharmacol.*, 30, 687-92 (1981), Vorum, *Dan. Med. Bull.*, 46, 379-99 (1999), Kragh-Hansen, *Dan. Med. Bull.*, 1441, 131-40 (1990), Curry et al., *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827-35 (1998), Sugio et al., *Protein. Eng.*, 12, 439-46 (1999), He et al., *Nature*, 358, 209-15 (1992) и Carter et al., *Adv. Protein. Chem.*, 45, 153-203 (1994)). Паклитаксел и пропофол, как было показано, связываются с HSA (см., например, Paal et al., *Eur. J. Biochem.*, 268 (7), 2187-91 (2001), Purcell et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1478 (1), 61-8 (2000), Altmayer et al., *Arzneimittelforschung*, 45, 1053-6 (1995) и Garrido et al., *Rev. Esp. Anestesiología. Reanim.*, 41, 308-12 (1994)). Дополнительно было показано, что доцетаксел связывается с белками плазмы человека (см., например, Urien et al., *Invest. New Drugs*, 14 (2), 147-51 (1996)). Таким образом, хотя и не желая привязываться к какой-либо определенной теории, полагают, что включение белков, таких как альбумин, в фармацевтические композиции по изобретению приводит к уменьшению побочных эффектов, связанных с введением фармацевтической композиции, которое является следствием, по крайней мере, частично, связывания альбумина сыворотки человека с каким-либо лекарственным средством, присутствующим в композиции в свободной форме.

Количество альбумина, входящего в состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению, будет меняться в зависимости от активного фармацевтического агента, других наполнителей, способа применения и места намеченного введения. Желательно, чтобы количество альбумина, входящего в состав композиции представляло собой количество, эффективное для уменьшения одного или более побочных эффектов активного фармацевтического агента вследствие введения фармацевтической композиции по изобретению человеку. Типично, фармацевтическую композицию готовят в жидкой форме, и затем добавляют в раствор альбумин. Предпочтительно, фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит приблизительно от 0,1 до приблизительно 25 мас.% (например, приблизительно 0,5 мас.%, приблизительно 5 мас.%, приблизительно 10 мас.%, приблизительно 15 мас.% или приблизительно 20 мас.%) альбумина. Наиболее предпочтительно, фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит приблизительно от 0,5 до приблизительно 5 мас.% альбумина. Фармацевтическую композицию можно дегидратировать, например, лиофилизацией, при сушке распылением, при сушке в кипящем слое, влажной грануляцией и другими подходящими способами, известными в данной области. Когда композицию готовят в твердой форме, такой как при влажной грануляции, при сушке в кипящем слое и другими способами, известными специалистам в данной области, альбумин предпочтительно применяют с активным фармацевтическим агентом и другими наполнителями, если они присутствуют, в качестве раствора. Раствор HSA предпочтительно содержит приблизительно от 0,1 до приблизительно 25 мас.% (приблизительно 0,5 мас.%, приблизительно 5 мас.%, приблизительно 10 мас.%, приблизительно 15 мас.% или приблизительно 20 мас.%) альбумина.

В дополнение к альбумину композиции по настоящему изобретению предпочтительно содержат дефероксамин. Дефероксамин представляет собой натуральный продукт, выделенный из *Streptomyces pilous*, и он способен образовывать комплексы с железом. Мезилат дефероксамина для инъекции согласно требованиям USP, например, одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (США) в качестве хелатообразующего агента для железа, и он доступен для внутримышечного,



подкожного и внутривенного введения. Мезилат дефероксамина, согласно требованиям USP, представляет собой порошок от белого до почти белого цвета. Он свободно растворим в воде, и его молекулярная масса составляет 656,79. Химическим названием мезилата дефероксамина является монометансульфонат (соль) N-[5-[3-[(5-аминопентил) гидроксикарбамоил]пропионамидо]пентил]-3-[[5-((N-гидроксиацетидамидо)пентил) карбамоил]пропионгидроксамовой кислоты, и его структурная формула представляет собой  $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_3SO_3H$ . Как описано в примерах, дефероксамин или его аналоги, производные или соли (например, соли мезилата) подавляют рост микроорганизмов и ингибируют окисление в фармацевтической композиции. Также было показано, что дефероксамин связывается с фенольными соединениями (см., например, Juven et al., *J. Appl. Bacteriol.*, 76 (6), 626-31 (1994)). Паклитаксел, доцетаксел, пропофол и тому подобное, представляют собой либо соединение, похожее на фенольное, либо содержат фенольные или фенильные заместители. Поэтому полагают, что дефероксамин может связаться с лекарственным средством в свободной форме или уменьшить его количество в фармацевтической композиции по изобретению, таким образом, также уменьшая или ослабляя раздражение или болезненность при инъекции.

Количество дефероксамина и его предпочтительной соли, то есть соль мезилата дефероксамина, входящей в состав композиции, зависит от активного фармацевтического агента и других наполнителей. Желательно, чтобы в композиции количество дефероксамина, его соли и его аналогов представляло собой количество, эффективное для подавления роста микроорганизмов и/или ингибирования окисления. Как описано выше, фармацевтическую композицию готовят типично в жидкой форме, и дефероксамин, его соли и его аналоги добавляют затем в раствор. Предпочтительно, фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,5 мас.% (например, приблизительно 0,005 мас.%, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,25 мас.%) дефероксамина, его солей или его аналогов. Более предпочтительно, композиция в жидкой форме содержит похожие количества предпочтительной соли дефероксамина, мезилата дефероксамина. Наиболее предпочтительно, фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит приблизительно 0,1 мас.% мезилата дефероксамина. Когда композицию готовят в твердой форме, как описано выше, такой как при влажной грануляции, при сушке в кипящем слое и при помощи других способов, известных специалистам в данной области, мезилат дефероксамина предпочтительно применяют с активным фармацевтическим агентом и другими наполнителями, если они присутствуют, в качестве раствора. Раствор мезилата дефероксамина предпочтительно содержит от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,5 мас.% (например, приблизительно 0,005 мас.%, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,25 мас.%) дефероксамина.

В соответствии с изобретением, фармацевтическая композиция может содержать другие агенты, наполнители или стабилизаторы для того, чтобы улучшить свойства композиции. Например, чтобы повысить стабильность, увеличивая отрицательный зета-потенциал наночастиц или нанокапель, можно добавить определенные отрицательно заряженные компоненты. Такие отрицательно заряженные компоненты включают в качестве неограничивающих примеров желчные соли желчных кислот, состоящих из гликохолевой кислоты, холевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, таурохолевой кислоты, гликохенодезоксихолевой кислоты, таурохенодезоксихолевой кислоты, литохолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты, дегидрохолевой кислоты и других; фосфолипиды, включающие в себя фосфолипиды на основе лецитина (яичный желток), которые включают следующие фосфатидилхолины:

пальмитоилолеоилфосфатидилхолин, пальмитоиллинолеоилфосфатидилхолин, стеароиллинолеоилфосфатидилхолин, стеароилолеоилфосфатидилхолин, стеароиларахидоилфосфатидилхолин и дипальмитоилфосфатидилхолин. Другие фосфолипиды включают L- $\alpha$ -димиристоилфосфатидилхолин (DMPC),

5 диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), фосфатидилхолин гидрогенизованной сои (HSPC), D- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -ацетил- $\gamma$ -O-гексадецил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -ацетил- $\gamma$ -O-гексадецил, DL- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -ацетил- $\gamma$ -O-гексадецил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -ацетил- $\gamma$ -O-октадецил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -арахидоноил- $\gamma$ -O-гексадецил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -ацетил- $\gamma$ -O- (октад-9-цис-енил), D- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -арахидоноил- $\gamma$ -O-пальмитоил, 3-sn-фосфатидилхолин-2-арахидоноил-1-стеароил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -арахидоноил- $\gamma$ -стеароил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолиндиарахидоил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолиндибегеноил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -(цис-8,11,14-ейкозатриеноил)- $\gamma$ -O-гексадецил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -олеоил- $\gamma$ -миристоил, L- $\alpha$ -фосфатидилхолин- $\beta$ -(пирен-1-ил)деканойл- $\gamma$ -пальмитоил,

15 3-sn-фосфатидил-N,N-диметилэтанолламин-1,2-дипальмитоил, L- $\alpha$ -фосфатидилэтанолламиндигептадеканойл, 3-sn-фосфатидилэтанолламин-1,2-дилауроил, 3-sn-фосфатидилэтанолламин-1,2-димиристоил, 3-sn-фосфатидилэтанолламин-1,2-диолеил, 3-sn-фосфатидилэтанолламин-1,2-дипальмитоил, L- $\alpha$ -фосфатидилэтанолламиндипальмитоил, L- $\alpha$ -фосфатидилэтанолламиндипальмитоил-N-

20 дансил, L- $\alpha$ -фосфатидилэтанолламиндипальмитоил-N,N-диметил, L- $\alpha$ -димиристоилфосфатидилглицерин (соль натрия) (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (соль натрия) (DPPG), дистеароилфосфатидилглицерин (соль натрия) (DSPG), N-(карбонил-метоксиполиэтиленгликоль2000)-1,2,-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламина

25 натрий (MPEG-DSPE), соль натрия дидеканоила-L- $\alpha$ -фосфатидной кислоты, соль натрия дигептадеканойла-L- $\alpha$ -фосфатидной кислоты, соль натрия 1,2-димиристоил-3-sn-фосфатидной кислоты, соль натрия диоктаноил-L- $\alpha$ -фосфатидной кислоты, соль натрия диолеил-L- $\alpha$ -фосфатидной кислоты, соль натрия дипальмитоил-L- $\alpha$ -фосфатидной кислоты, соль натрия димиристоил-L- $\alpha$ -фосфатидил-DL-глицерина, соль натрия диолеил-

30 L- $\alpha$ -фосфатидил-DL-глицерина, аммониевая соль дипальмитоил-L- $\alpha$ -фосфатидил-DL-глицерина, аммониевая соль дистеароил-L- $\alpha$ -фосфатидил-DL-глицерина, аммониевая соль L- $\alpha$ -фосфатидил-DL-глицерин- $\beta$ -олеоил- $\gamma$ -пальмитоила, аммониевая соль L- $\alpha$ -фосфатидилинозитола, натриевая соль L- $\alpha$ -фосфатидилиназитола, натриевая соль L- $\alpha$ -фосфатидил-L-сериндиолеоила, натриевая соль L- $\alpha$ -фосфатидил-L-серина и

35 дипальмитоила. Отрицательно заряженные поверхностно-активные соединения эмульгаторов также подходят в качестве добавок, например, холестерилсульфат натрия и тому подобное.

Фармацевтический агент (например, пропофол) можно использовать в отдельности или растворять в несмешивающемся в воде растворителе. Можно использовать широкий

40 диапазон несмешивающихся в воде растворителей, таких как соевое, сафлоровое, хлопковое, кукурузное, подсолнечное, арахисовое, касторовое или оливковое масло. Предпочтительными маслом является растительное масло, из которого соевое масло является наиболее предпочтительным. Соевое масло можно использовать в композиции в диапазоне от 1 до 10 мас.% Предпочтительно, соевое масло присутствует в

45 фармацевтической композиции в количестве приблизительно 3 мас.%

Фармацевтическую композицию по изобретению можно стабилизировать фармацевтически приемлемым поверхностно-активным средством. Используемые здесь термин «поверхностно-активное средство» обозначает поверхностно-активную группу

(группы) амфифильных молекул. Поверхностно-активные средства могут быть анионогенными, катионогенными, неионогенными и цвиттерионными. Любое поверхностно-активное средство можно включить в состав фармацевтической композиции по изобретению. Подходящие поверхностно-активные средства включают

5 неионогенные поверхностно-активные средства, такие как фосфатиды, полиоксиэтиленовые эфиры сорбита и сукцинат токоферилполиэтиленгликоля. Предпочтительными поверхностно-активными средствами являются яичный лецитин, твин 80 и витамин E- $\alpha$ -токоферилполиэтиленгликоля-1000 сукцинат (TPGS). Для препаратов, содержащих соевое масло, яичный лецитин является предпочтительным

10 и составляет не более чем 1,2 мас.% для препарата, содержащего 3% соевого масла, предпочтительно при 1,1 мас.% композиции. Для несодержащих соевое масло препаратов, твин 80 или витамин E-TPGS являются предпочтительными поверхностно-активными средствами. Типично подходит от 0,1 до 1,5 мас.% твин 80 или от 0,5 до 4 мас.% витамина E-TPGS. Предпочтительно используют 1,5 мас.% твин 80 или 1 мас.%

15 витамина E-TPGS. Примеры других подходящих поверхностно-активных средств описаны, например, у Becher, *Emulsions: Theory and Practice*, Robert E. Krieger Publishing, Malabar, Fla. (1965).

Существует большое разнообразие подходящих препаратов фармацевтической композиции по изобретению (см., например, патент США № 5916596). Следующие

20 препараты и способы являются лишь иллюстративными и никоим образом не ограничивающими. Препараты, подходящие для перорального введения, могут состоять из (а) жидких растворов, таких как эффективное количество соединения, растворенного в растворителях, таких как вода, физиологический раствор или апельсиновый сок, (б) капсул, саше или таблеток, каждая из которых содержит предварительно определенное

25 количество активного компонента в качестве твердых частиц или гранул, (с) суспензии в подходящих жидкостях и (d) подходящие эмульсии. Таблеточные формы могут включать в себя один или более наполнителей из лактозы, маннитола, кукурузного крахмала, картофельного крахмала, микрокристаллической целлюлозы, акации, желатина, коллоидного диоксида кремния, кроскармеллозы натрия, талька, стеарата

30 магния, стеариновой кислоты и других наполнителей, красителей, растворителей, буферных средств, увлажняющих агентов, консервантов, ароматизирующих агентов и фармакологически совместимых наполнителей. Формы лекарственных леденцов могут содержать активный компонент в ароматизаторе, обычно сахарозе и акации или трагаканте, а также пастилки, содержащие активный компонент в инертной основе,

35 такой как желатин и глицерин или сахароза и акация, эмульсии, гели и тому подобное, содержащие в дополнение к активному компоненту такие наполнители, которые известны в данной области.

Препараты, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые содержат антиоксиданты,

40 буферы, антимикробные добавки и растворы, которые приводят препараты к изотоническому состоянию с кровью предполагаемого получателя, водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Препараты могут быть представлены в виде стандартной дозы или многократно дозы, запаяны в контейнеры,

45 такие как ампулы и пузырьки, и могут храниться в высушенном сублимацией (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого наполнителя, например, воды для инъекций непосредственно перед использованием. Приготовленные для немедленного приема растворы и суспензии для инъекций можно

приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного ранее типа. Инъекционные препараты являются предпочтительными.

5        Препараты, подходящие для аэрозольного применения, содержат фармацевтическую композицию по изобретению, включающую в себя водные и неводные изотонические стерильные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, антимикробные добавки и растворы, а также и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты сами по себе или в комбинации с другими подходящими компонентами, которые можно приготовить в аэрозольных препаратах, которые будут  
10        вводиться посредством ингаляций. Аэрозольные препараты можно помещать в герметизированные приемлемые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобные. Их также можно приготавливать в качестве фармацевтических средств для препаратов не под давлением, таких как распылитель или пульверизатор.

15        Возможны другие подходящие препараты, например, суппозитории можно получить с использованием многообразных основ, таких как эмульгирующие основы или растворимые в воде основы. Препараты, подходящие для вагинального введения, можно предоставить в качестве pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пенки или аэрозольных составов, содержащих в дополнение к активному компоненту такие носители, которые, как известно в данной области, являются подходящими.

20        В предпочтительном осуществлении изобретения фармацевтическую композицию готовят так, чтобы она имела pH в диапазоне от 4,5 до 9,0 и более предпочтительно pH от 5,0 до 8,0. Фармацевтическую композицию можно также приготовить так, чтобы она была изотонической с кровью, добавляя подходящий модификатор тоничности, такой как глицерин. Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель  
25        предпочтительно также содержит несодержащую пирогены воду или воду для инъекций согласно требованиям USP. Предпочтительно, фармацевтическую композицию по изобретению готовят в качестве стерильного водного препарата, наночастицы, эмульсии типа масло в воде или эмульсии типа вода в масле.

30        Для фармацевтической композиции, содержащей пропофол, по изобретению эмульсию типа масло в воде готовят, растворяя пропофол в одном только несмешивающемся с водой растворителе и готовя водную фазу, содержащую альбумин, дефероксамин, поверхностно-активное средство и другие растворимые в воде компоненты, и смешивая масляную и водную фазу. Первичную эмульсию гомогенизируют при высоком давлении при давлении от 10000 до 25000 фунт/кв.дюйм и подвергают рециркуляции в течение  
35        от 5 до 20 циклов до образования идеальной эмульсии. Предпочтительное давление составляет от 15000 до 20000 фунт/кв.дюйм и более предпочтительно 10000 фунт/кв.дюйм. Первичную эмульсию можно рециркулировать в течение от 7 до 15 циклов и предпочтительно ее рециркулируют в 15 циклах. Альтернативно, можно использовать отдельные пропускания через гомогенизатор.

40        Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать частицы или капли размером менее чем приблизительно 200 нанометров (нм). Например, в случае паклитаксела, доцетаксела, рапамицина, циклоспорина, пропофола и других, средний размер данных дисперсий составляет менее чем 200 нм.

45        Далее, изобретение относится к способу уменьшения одного или более побочных эффектов, связанных с введением фармацевтической композиции человеку. Способ охватывает введение человеку фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит альбумин и дефероксамин. Описания

фармацевтической композиции, фармацевтического агента и фармацевтически приемлемого носителя и их компонентов, изложенных выше в связи с фармацевтической композицией по изобретению, также применимы для тех же самых аспектов способа по изобретению.

5 Доза фармацевтической композиции по изобретению, вводимая человеку, в контексте данного изобретения будет меняться для определенных фармацевтических композиций, способа введения и определенного участка лечения. Доза должна быть достаточной, чтобы вызвать необходимый ответ, такой как терапевтический или профилактический  
10 ответ против определенного заболевания, или когда фармацевтический агент представляет собой анестезирующее средство, такое как пропофол, анестезирующий ответ в необходимый интервал времени.

Несмотря на то, что можно использовать в контексте изобретения любые подходящие способы введения фармацевтической композиции человеку, предпочтительно, фармацевтическую композицию вводят человеку посредством внутривенного введения,  
15 внутриартериального введения, внутрилегочного введения, перорального введения, ингаляции, внутрипузырного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, подкожного введения, внутриглазного введения, подбололочечного введения или чрескожного введения. Например, фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить ингаляцией для лечения патологических состояний дыхательных путей.  
20 Существуют минимальные побочные действия, связанные с ингаляцией фармацевтической композиции по изобретению, так как альбумин является природным компонентом выстилки и выделений дыхательных путей. Композицию по изобретению можно использовать для лечения дыхательных состояний, таких как легочный фиброз, облитерирующий бронхолит, рак легких, бронхоальвеолярная карцинома и тому  
25 подобные.

Способ по изобретению приводит в результате к уменьшению одного или более побочных эффектов, связанных с введением фармацевтической композиции человеку. Такие побочные действия включают, например, миелосупрессию, нейротоксичность, гиперчувствительность, воспаление, раздражение вен, флебит, болезненность,  
30 раздражение кожи и их комбинации. Данные побочные действия, однако, являются исключительно иллюстративными, и другие побочные действия или комбинация побочных эффектов, связанных с различными фармацевтическими агентами можно уменьшить или избежать их, используя новые композиции и способы по настоящему изобретению.

35 Далее изобретение относится к способу подавления роста микроорганизмов в фармацевтической композиции. «Подавление роста микроорганизмов» обозначает либо полное удаление микроорганизмов из фармацевтической композиции, либо уменьшение количества или скорости роста микроорганизмов в фармацевтической композиции. Способ охватывает приготовление фармацевтической композиции,  
40 содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит дефероксамин, его соли, его аналоги и их комбинации в количестве, эффективном для подавления роста микроорганизмов в фармацевтической композиции. Дополнительно, изобретение относится к способу ингибирования окисления в фармацевтической композиции. Данный  
45 способ охватывает приготовления фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит дефероксамин, его соли, его аналоги и их комбинации в количестве, эффективном для ингибирования окисления в

фармацевтической композиции. Описания фармацевтической композиции, фармацевтического агента и фармацевтически приемлемого носителя и их компонентов, изложенных выше в связи с фармацевтической композицией по изобретению, также применимы для тех же самых аспектов способа по изобретению.

5 Количество дефероксамина или его предпочтительной соли, соль мезилат дефероксамина, входящее в состав композиции, будет зависеть от активного фармацевтического агента и других наполнителей. Желательно, чтобы количество дефероксамина, его солей и их аналогов в композиции представляло собой количество, эффективное для подавления роста микроорганизмов и/или ингибирования окисления.  
10 Как описано выше, типично, фармацевтическую композицию готовят в жидкой форме, и дефероксамин, его соли и их аналоги затем добавляют в раствор.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит приблизительно от 0,0001 до приблизительно 0,5 мас.% (например, приблизительно 0,005 мас.%, приблизительно 0,1 или приблизительно 0,25 мас.%) дефероксамина, его солей или их аналогов. Более предпочтительно, композиция в жидкой форме содержит  
15 похожее количество предпочтительной соли дефероксамина, мезилата дефероксамина. Наиболее предпочтительно фармацевтическая композиция в жидкой форме содержит приблизительно от 0,5 мас.% мезилата дефероксамина. Когда композицию готовят в твердой форме, как описано выше, такой как посредством влажной грануляции, сушки  
20 в кипящем слое и другими способами, известными специалистам в данной области, мезилат дефероксамина предпочтительно применяют с активным фармацевтическим агентом и другими наполнителями, если они присутствуют, в качестве раствора. Раствор мезилата дефероксамина предпочтительно содержит приблизительно от 0,0001 до приблизительно 0,5 мас.% (например, приблизительно 0,005 мас.%, приблизительно 0,1  
25 или приблизительно 0,25 мас.%) дефероксамина.

Изобретение также относится к способу увеличения транспорта фармацевтического агента к очагу заболевания, где способ охватывает введение человеку фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит альбумин и в  
30 которой соотношение альбумина и фармацевтического агента в фармацевтической композиции составляет приблизительно 18:1 или менее. Далее, изобретение относится к способу увеличения связывания фармацевтического агента клетками *in vitro* или *in vivo*, в котором способ охватывает введение в указанные клетки *in vitro* или *in vivo* фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтически приемлемый носитель содержит альбумин  
35 и в которой соотношение альбумина и фармацевтического агента в фармацевтической композиции составляет приблизительно 18:1 или менее. Описания фармацевтической композиции, фармацевтического агента, фармацевтически приемлемого носителя, способов введения и их компонентов, изложенных выше в связи с фармацевтической композицией по изобретению, также применимы для тех же самых аспектов способов транспорта и связывания.  
40

В способе увеличения транспорта фармацевтического агента к очагу заболевания или увеличения связывания фармацевтического агента с клеткой фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин, наиболее предпочтительно альбумин сыворотки человека. Не придерживаясь какой-либо определенной теории, полагают, что соотношение белка, например, альбумина сыворотки человека, и фармацевтического агента в фармацевтической композиции влияет на способность фармацевтического агента связывать и переносить фармацевтический агент в клетку. В этом отношении,  
45

более высокое соотношение белка и фармацевтического агента, в основном, связано со слабым клеточным связыванием и переносом фармацевтического агента, которое возможно является результатом конкуренцией за рецепторы на поверхности клетки. Соотношение белка, например, альбумина и активного фармацевтического агента должно быть таким, чтобы значительное количество фармацевтического агента связывалось с ним или переносилось им в клетку. Иллюстративные диапазоны для препаратов лекарственного средства и белка представляют собой соотношения белка и лекарственного средства (мас./мас.) от 0,01:1 до приблизительно 100:1. Более предпочтительно, соотношения находятся в диапазоне от 0,02:1 до приблизительно 40:1. Несмотря на то, что соотношение белка и фармацевтического агента должно быть оптимизировано для различных комбинаций белка и фармацевтического агента, в основном, соотношение белка, например, альбумина и фармацевтического агента составляет приблизительно 18:1 или менее (например, приблизительно 15:1, приблизительно 10:1, приблизительно 5:1 или приблизительно 3:1). Более предпочтительно, соотношение составляет приблизительно от 0,2:1 до приблизительно 12:1. Наиболее предпочтительно, соотношение составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 9:1. Предпочтительно, препарат, главным образом, не содержит кремофор и, наиболее предпочтительно, не содержит кремофор EL<sup>®</sup> (BASF). Кремофор EL<sup>®</sup> является неионным эмульгирующим агентом, который представляет собой простой полиэфир касторового масла и этиленоксида. Как описано выше, кремофор типично используют в качестве растворителя для паклитаксела, и он связан с побочными эффектами, которые могут быть опасны (см., например, Gelderblom et al., *выше*).

Фармацевтический агент может представлять собой любой подходящий описанный здесь фармацевтический агент (например, пропофол, паклитаксел или доцетаксел). Дополнительно, фармацевтический агент может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, наиболее предпочтительно, последовательность ДНК. В этом отношении, фармацевтическую композицию по изобретению можно использовать для транспорта генов в клетку путем опосредованного рецептором кавеолярного/везикулярного транспорта. Для того чтобы переносить последовательности ДНК, такие как гены и другой генетический материал, включая сюда в качестве неограничивающих примеров плазмиды или кДНК, в клетку (например, эндотелиальную клетку или опухолевую клетку), можно получить фармацевтические композиции, содержащие альбумин в комбинации с генетическим материалом. Так как опухолевые клетки и другие клетки в очаге заболевания обладают свойством повышенного захвата белков, генетический материал предпочтительно забирается такими типами клеток и может вводиться в генетический материал клетки для успешного терапевтического эффекта. Использование белков, таких как альбумин сыворотки человека, служит в качестве не относящегося к вирусам вектора для доставки генетического материала без риска возникновения связанных с вирусами заболеваний или побочных эффектов. Например, можно приготовить фармацевтическую композицию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую β-галактозидазу или зеленый флуоресцентный белок (GFP) и альбумин, и осуществить ее контакт с эндотелиальными клетками, полученными из пупочной вены человека или микрососудов легких человека для того, чтобы способствовать введению последовательности нуклеиновой кислоты в эндотелиальные клетки. Вхождение последовательности нуклеиновой кислоты можно определить способами, известными в данной области, такими как, например, флуоресценция или окрашивание.

В способе по изобретению для увеличения транспорта фармацевтического агента к

очагу заболевания, заболевание может представлять собой любое подходящее заболевание или состояние. Предпочтительно, заболевание представляет собой рак, сердечно-сосудистое заболевание или артрит.

В способе по изобретению для увеличения связывания фармацевтического агента клеткой *in vitro* или *in vivo*, фармацевтическую композицию вводят в клетку *in vitro* или *in vivo*. Желательно, чтобы клетка представляла собой клетку животного. Более предпочтительно, клетка представляет собой клетку млекопитающих и, наиболее предпочтительно, клетка представляет собой клетку человека. Фармацевтическую композицию вводят предпочтительно в клетку *in vivo*. Клетка может представлять собой любую подходящую клетку, которая является необходимой мишенью для введения фармацевтической композиции. Например, клетка может находиться в тканях или происходить из тканей пищеварительной системы, включая, например, пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку, анус, печень, желчный пузырь и поджелудочную железу. Клетка также может находиться в тканях или происходить из тканей дыхательной системы, включая сюда, например, гортань, легкие и бронхи. Клетка может находиться в тканях или происходить из тканей, например, шейки матки, тела матки, яичника, влагалища, простаты, яичек и пениса, которые составляют мужскую и женскую половую систему, и мочевого пузыря, почек, почечной лоханки и мочеоточника, которые составляют мочевую систему. Клетка может находиться в тканях или происходить из тканей сердечно-сосудистой системы, включая сюда, например, эндотелиальные клетки и клетки сердечной мышцы. Клетка также может находиться в тканях или происходить из тканей лимфатической системы (например, лимфатические клетки), нервной системы (например, нейроны или глиальные клетки) и эндокринной системы (например, клеток щитовидной железы). Предпочтительно, клетка находится в тканях или происходит из тканей сердечно-сосудистой системы. Наиболее предпочтительно, клетка представляет собой эндотелиальную клетку. В контексте способа по изобретению для увеличения транспорта и связывания фармацевтического агента с клеткой фармацевтическая композиция желательно контактирует более чем с одной клеткой.

В другом аспекте изобретения способ по изобретению для увеличения транспорта и увеличения связывания фармацевтического агента с клеткой можно использовать для лечения опухолевых клеток. Опухолевые клетки проявляют повышенный захват белков, например альбумина и трансферрина, по сравнению с нормальными клетками. Так как опухолевые клетки делятся с большой скоростью, им требуется дополнительные источники питательных средств по сравнению с нормальными клетками. Исследования опухолей с фармацевтической композицией по изобретению, содержащей паклитаксел и альбумин сыворотки человека, показали повышенный захват альбумина с паклитакселом в опухоли. Было обнаружено, что данный захват является следствием ранее неопределенного явления транспорта альбумина с лекарственным средством посредством рецепторов гликопротеина 60 («gp60»), которые являются специфичными для альбумина.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения специфичный для альбумина рецептор gp60 и другие рецепторы транспорта белков, которые представлены на опухолевых клетках, можно использовать в качестве мишеней для подавления роста опухоли. Блокируя рецептор gp60 с использованием антител против рецептора gp60 или соединений больших или небольших молекул, которые связывают, блокируют или инактивируют gp60 и другие рецепторы транспорта белков на опухолевых клетках или опухолевых эндотелиальных клетках, возможно блокировать



транспорт белков к данным клеткам и тем самым уменьшить их скорость роста и вызвать клеточную гибель. Блокирование данного механизма, таким образом, приводит к лечению индивидуума (например, человека) с раком или другим заболеванием.

5 Определенный блокирующий/связывающий белок рецептора осуществляется при помощи скрининга любого количества соединений в отношении выделенного gr60 или других рецепторов, таких как gr16 или gr30, или используя целые клеточные препараты. Дополнительно также можно использовать с данной целью подходящие модели животных, такие как, например, мыши, содержащие «нокаут» мутации генов, кодирующих gr60 или кавеолин-1 или другие белки, которые специфичны для транспорта. Таким образом, способ определения соединений, которые блокируют или связывают gr60, gr16, gr30 или другие белковые рецепторы, находится в объеме данного изобретения.

Дополнительно соединения, которые блокируют или связывают рецептор gr60 или другие рецепторы, можно использовать для лечения некоторых заболеваний, включая сюда рак. В отношении лечения рака, блокирующее или связывающее соединение можно использовать в качестве одного агента или в комбинации с другими стандартными средствами для химиотерапии или химиотерапий. Например, полезно лечить рак обычной химиотерапией или фармацевтическими композициями альбумина с лекарственным средством по изобретению (которые показывают высокую степень накопления в опухолях), сопровождающееся использованием соединений, которые блокируют транспорт белков к опухолевой клетке. Блокирующие соединения можно вводить до или совместно с другими химиотерапевтическими или противораковыми агентами. Таким образом, любые соединения, которые блокируют или связывают рецептор gr60 или другие рецепторы, находятся в объеме настоящего изобретения.

25 Композиции альбумина с лекарственным средством по изобретению, такие как, например, альбумин с паклитакселом, альбумин с доцетакселом, альбумин с эпотилоном, альбумин с камптотецином или альбумин с рапамицином и другие, используют при лечении заболеваний. Полагают, что такие лекарственные композиции эффективны вследствие повышенного опосредованного рецептором транспорта композиции белка с лекарственным средством к необходимому участку, например, опухоли. Не желая привязываться к какой-либо определенной теории, транспорт композиции белка с лекарственным средством при помощи опосредованного рецептором транспорта, приводящего к терапевтическому эффекту, как полагают, является механизмом транспорта, например, композиций альбумина с паклитакселом в опухоли, а также и 35 транспорт альбумина с паклитакселом и альбумина с рапамицином через легкие. На транспорт влияет присутствие gr60, gr16, или gr30 в таких тканях. Соответственно, лекарственные средства и композиции белков с лекарственными средствами, чей транспорт к очагу заболевания, например, воспалению (например, артрит) или опухолям связан с рецепторами gr60, gr16 или gr30 и которые приводят к терапевтическому 40 эффекту, рассматриваются в качестве композиций по настоящему изобретению.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, эндотелиальные клетки можно совместно культивировать с клетками, имеющими определенную функцию. Инкубация эндотелиальных клеток с другими типами клеток, такими как инсулоциты, гепатоциты, нейроэндокринные клетки и другими, учитывает необходимый транспорт компонентов, таких как белки и другие полезные компоненты, в такие клетки. Эндотелиальные клетки обеспечивают транспорт данных компонентов к культивируемым типам клеток для того, чтобы симулировать условия *in vivo*, то есть в тех случаях, когда данные типы клеток нормально находились бы в тесном соседстве

с эндотелиальными клетками и зависели бы от эндотелиальных клеток в отношении транспорта питательных средств, факторов роста, гормональных сигналов и т.д., которые необходимы для их надлежащего функционирования. Ранее было невозможно в достаточной мере культивировать такие различные типы клеток и получать их физиологическое функционирование в тех случаях, когда отсутствовали эндотелиальные клетки. Наличие эндотелиальных клеток в культуре с необходимым типом клеток позволяет осуществлять дифференцирование и надлежащее функционирование инсулоцитов, гепатоцитов или нейроэндокринных тканей *in vitro* или *ex vivo*. Таким образом, было обнаружено, что совместные культуры эндотелиальных клеток с инсулоцитами приводят к получению инсулоцитов с улучшенными физиологическими свойствами, например, способностью секретировать инсулин по сравнению с инсулоцитами, культивированными в отсутствие эндотелиальных клеток. Такие ткани можно затем использовать *ex vivo* или трансплантировать *in vivo* для лечения заболеваний, вызванных потерей соответствующей клеточной функции (например, диабет в случае инсулоцитов, нарушение функции печени в случае гепатоцитов и нейроэндокринные расстройства или обезболивание в случае нейроэндокринных клеток). Клетки, происходящие из других тканей и органов (как описано выше), можно также культивировать совместно с эндотелиальными клетками, чтобы обеспечить такой же эффект. В дополнение совместные культуры можно использовать для введения генетического материала в заданные типы клеток. Наличие альбумина в таких культурах, как обнаружили, является весьма благотворным.

Следующие примеры далее иллюстрируют изобретение, но, конечно же, их не следует толковать в качестве каким-либо образом ограничивающих его объем.

#### ПРИМЕР 1

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей альбумин и паклитаксел. Приготовление композиций паклитаксела с альбумином описано в патентах США №№ 5439686 и 5916596, которые полностью включены сюда в качестве ссылки. В частности, 30 мг паклитаксела растворяли в 3,0 мл метиленхлорида. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (2 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в роторный испаритель, и быстро удаляли метиленхлорид при 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 минут. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц паклитаксела находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток могли легко восстановить до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации.

Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере никоим образом не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью паклитаксела, растворенного в препаратах с кремофором, фармацевтическая композиция по изобретению, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 2

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей амиодарон и альбумин. 30 мг амиодарона растворяли в 3,0 мл метилхлорида. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (1 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в роторный испаритель и быстро удаляли метилхлорид при температуре 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц амиодарона находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавля стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации.

Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, никоим образом не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью амиодарона, растворенного в препаратах с твином, фармацевтическая композиция по изобретению с альбумином проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 3

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей композиции лиотиронина и альбумина. Лиотиронин (или подходящую соль) растворяли в водно-спиртовом растворе или щелочном растворе в концентрации 0,5-50 мг/мл. Спиртовой (или щелочной) раствор добавляли к раствору альбумина (0,1-25%) и перемешивали их. Перемешивание осуществляли на мешалке с малыми сдвиговыми усилиями или на ультразвуковой установке или гомогенизаторе с высокими сдвиговыми усилиями. При низкой концентрации лиотиронина (5-1000 мкг/мл) получали прозрачные растворы. По мере того, как повышали концентрацию, получали стабильную суспензию молочно-белого цвета. Данные растворы или суспензии фильтровали через стерилизующий фильтр. Органические растворители удаляли выпариванием или другим подходящим способом.

#### ПРИМЕР 4

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей рапамицин и альбумин. 30 мг рапамицина растворяли в 2 мл системы хлороформ/этанол. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%). Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при температуре 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавля стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления

оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, никоим образом не являются ограничивающими.

#### ПРИМЕР 5

5 В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей эпотилон В и альбумин. 30 мг эпотилона В растворяли в 2 мл системы хлороформ/этанол. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 мин при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель 10 Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная 15 дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что 20 количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью эпотилона В, растворенного в препаратах с кремофором, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### 25 ПРИМЕР 6

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей димер колхицина и альбумин. 30 мг димера колхицина растворяли в 2 мл системы хлороформ/этанол. Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь 30 гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель 35 при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после 40 восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью димера колхицина, растворенного в твине, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более 45 низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 7

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей доцетаксел и альбумин. 30 мг доцетаксела растворяли в 2 мл системы

хлороформ/этанол. Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 мин при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью доцетаксела, растворенного в системе твин/этанол, который является стандартным растворителем для данного лекарства, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 8

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей доцетаксел и альбумин. 150 мг доцетаксела растворяли в 1 мл системы этилацетат/бутилацетат и 0,5 мл масла, например соевого масла или масла с витамином Е. Использовали другие соотношения растворителей и масел, и данные композиции также рассматриваются как часть данного изобретения. Также необязательно добавляли небольшое количество отрицательно заряженного компонента, например бензойной кислоты (0,001%-0,5%). Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (5 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 мин при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью доцетаксела, растворенного в системе твин/этанол, который является стандартным растворителем для данного лекарства, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 9

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей таксан IDN5390 и альбумин. 150 мг IDN5390 растворяли в 1 мл системы этилацетат/бутилацетат и 0,5 мл масла, например соевого масла или масла с витамином Е. Использовали другие соотношения растворителей и масел, и данные композиции

также рассматриваются в качестве части данного изобретения. Также необязательно добавляли небольшое количество отрицательно заряженного компонента, например бензойной кислоты (0,001%-0,5%). Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (5 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 мин при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсией, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную в результате систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в этом примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью IDN5390, растворенного в твине, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 10

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей таксан IDN5109 и альбумин. 150 мг IDN5109 растворяли в 2 мл системы хлороформ/этанол. Использовали другие соотношения растворителей и масел, и данные композиции также рассматриваются в качестве части данного изобретения. Также необязательно добавляли небольшое количество отрицательно заряженного компонента, например бензойной кислоты (0,001%-0,5%). Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (5 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Для того чтобы получить первичную эмульсию, смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.), и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсией, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей и белков, используемые в данном примере, не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью IDN5109, растворенного в твине, фармацевтическая композиция, содержащая альбумин, проявляла значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 11

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей 10-гидроксикамптотecin (10НС) и альбумин. 30 мг 10-НС растворяли в 2 мл системы DMF/метилхлорид/соевое масло. Раствор затем добавляли к 27,0 мл

раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%). Для того чтобы получить первичную эмульсию, смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) и затем ее переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в Rotavap и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в данном примере, никоим образом не являются ограничивающими.

#### 15 ПРИМЕР 12

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей циклоспорин и альбумин. 30 мг циклоспорина растворяли в 3,0 мл метилхлорида. Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (1 мас./об.%). Смесь гомогенизировали в течение 5 мин при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в Rotavap и быстро удаляли метилхлорид при температуре 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 мин. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации.

#### 30 ПРИМЕР 13

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей масло и включающей в себя циклоспорин и альбумин. 30 мг циклоспорина растворяли в 3,0 мл подходящего масла (кунжутного масла, содержащего 10% апельсинового масла). Раствор затем добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (1 мас./об.%). Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией эмульсии, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученная дисперсия содержала типичный средний диаметр частиц в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Дисперсию непосредственно использовали или лиофилизировали в течение 48 часов, необязательно добавляя подходящий криопротектор. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей и белков, используемые в этом примере, никоим образом не являются ограничивающими.

#### 45 ПРИМЕР 14

В данном примере демонстрируется приготовление фармацевтической композиции, содержащей амфотерицин и альбумин. 30 мг амфотерицина растворяли в 3,0 мл системы метилпирролидинон/метилхлорид. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (1 мас./об.%). Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об/мин (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили ее в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркулирующей эмульсией, по крайней мере, в течение 5 циклов. Полученную систему переносили в роторный испаритель и быстро удаляли растворитель при 40°C при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 минут. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц амфотерицина находился в диапазоне между 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 часов. Полученный сгусток могли бы легко восстановить до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей и белков, используемые в этом примере, никоим образом не являются ограничивающими. Добавление других компонентов, таких как липиды, соли желчных кислот и т.д., также приводили к получению подходящих препаратов.

#### ПРИМЕР 15

В данном примере демонстрируются доклиническая фармакокинетика и фармакодинамика фармацевтической композиции, содержащей альбумин и паклитаксел. Несколько доклинических фармакокинетических исследований проводилось на мышах и крысах для того, чтобы оценить возможные преимущества фармацевтических композиций альбумина с паклитакселом над фармацевтическими композициями кремофора с паклитакселом (таксолем). Данные исследования показали: (1) что фармакокинетика альбумина с паклитакселом у крыс имела линейный характер, тогда как фармакокинетика таксола имела нелинейный характер относительно дозы, (2) фармацевтические композиции, содержащие альбумин и паклитаксел, показали более низкие значения AUC и  $C_{max}$  плазмы, указывая на более быстрое распределение композиций альбумина с паклитакселом по тканям по сравнению с таксолем (выделение аналогично), (3) фармацевтические композиции, содержащие альбумин и паклитаксел показали более низкое значение  $C_{max}$ , которое возможно объясняет пониженную токсичность, связанную с максимальными уровнями в крови относительно таксола, (4) время полужизни, показанное фармацевтическими композициями, содержащими альбумин и паклитаксел, было приблизительно в 2 раза выше у крыс и в 4 раза выше у мышей с опухолями относительно таксола и (5) метаболизм паклитаксела в фармацевтических композициях, содержащих альбумин и паклитаксел, был медленнее, чем в фармацевтических композициях таксола. Через 24 часа после инъекции у крыс 44% общей радиоактивности все еще было связано с паклитакселом в случае фармацевтических композиций, содержащих альбумин и паклитаксел, по сравнению только с 22% в случае таксола. Основной эффект указанной выше фармакодинамики, то есть увеличенного внутриклеточного захвата, пролонгированного времени полужизни и замедленного метаболизма, показанных в случае фармацевтических композиций, содержащих альбумин и паклитаксел, приводит к более высокому в 1,7 раз значению AUC опухоли, более высокому в 1,2 раза значению  $C_{max}$  опухоли и более продолжительному в 1,7 раз времени полужизни в опухоли, чем в случае таксола у



мышей с опухолью.

#### ПРИМЕР 16

Данный пример демонстрирует уменьшенные побочные действия и пониженную токсичность, связанную с фармацевтическими композициями, содержащими паклитаксел и альбумин.

Вследствие уникальной природы фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин при отсутствии кремофора, токсичность фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин в значительной степени более низкая, чем таксола. В доклинических исследованиях на мышах и крысах исследование острой токсичности однократной дозы показало, что доза LD<sub>50</sub> приблизительно в 59 раз больше для фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин, чем для таксола. В исследовании токсичности многократной дозы у мышей доза LD<sub>50</sub> была приблизительно в 10 раз больше для фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин, чем для таксола. Далее в исследовании определили степень миелосупрессии у крыс, которых лечили фармацевтическими композициями, содержащими паклитаксел и альбумин, и таксолем. Результаты показали, что при равных дозах фармацевтические композиции, содержащие паклитаксел и альбумин, приводят к гораздо меньшей миелосупрессии у крыс, чем таксол. В исследовании острой токсичности у крыс наблюдали некроз коры головного мозга или тяжелую нейротоксичность у животных, получающих таксол в дозе 9 мг/кг, но данные эффекты отсутствовали у животных, получающих фармацевтическую композицию, содержащую паклитаксел и альбумин в дозе вплоть до 120 мг/кг. Таким образом, наличие альбумина в фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел, приводит к значительному уменьшению побочных эффектов и токсичности по сравнению с общепринятыми композициями, содержащими паклитаксел.

#### ПРИМЕР 17

Данный пример демонстрирует клинические эффекты фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин, у людей.

Клинические исследования свыше 500 больных людей до настоящего времени предоставляют доказательства, поддерживающие факт уменьшения токсичности и побочных эффектов фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин («альбумин с паклитакселом»), по сравнению с композициями, содержащими кремофор и паклитаксел (таксол). В исследовании 19 пациентов на стадии I максимальная допустимая доза альбумина с паклитакселом, которую давали каждые 3 недели, составляла 300 мг/м<sup>2</sup>. Она значительно выше, чем обычно вводимая доза кремофора с паклитакселом, которая составляет 175 мг/м<sup>2</sup>, которую дают один раз каждые 3 недели. Гематологическая токсичность у данных пациентов была средняя без аллергий, со слабыми нейропатиями и без связанных с введением лекарственных средств побочных эффектов, таких как венозное раздражение и т.д.

В другом исследовании 27 пациентов на стадии I максимальная допустимая доза альбумина с паклитакселом, которую давали по еженедельному графику, составляла 125-150 мг/м<sup>2</sup>. Она значительно выше, чем обычно вводимая доза кремофора с паклитакселом, которая составляет 80 мг/м<sup>2</sup>, если ее дают по еженедельному графику. Гематологическая токсичность у данных пациентов была слабая без аллергий, со слабыми нейропатиями и без связанных с введением лекарственных средств побочных эффектов, таких как венозное раздражение и т.д.

В двух исследованиях на стадии II альбумина с паклитакселом, который давали либо по 175, либо по 300 мг/м<sup>2</sup> каждые 3 недели 43 и 63 пациентам, соответственно, гематологическая токсичность была низкой, только у 7% и 24% пациентов ANC < 500/  
5 мм<sup>3</sup> при дозировках 175 мг/м<sup>2</sup> и 300 мг/м<sup>2</sup>, соответственно. Тяжелые нейропатии имели место у 0% и 14% пациентов при дозировках 175 мг/м<sup>2</sup> и 300 мг/м<sup>2</sup>, соответственно. Не было случаев тяжелых аллергий и не было случаев связанных с введением лекарственного средства побочных эффектов, таких как венозное раздражение, болезненность при инъекции и т.д. Данные побочные эффекты были значительно ниже,  
10 чем у исследованных пациентов с таксолем.

В испытаниях на стадии III, сравнивающих композиции альбумина с паклитакселом ABI-007 и таксола (который содержит кремофор с паклитакселом), дозировка ABI-007 была значительно выше (260 мг/м<sup>2</sup> против 175 мг/м<sup>2</sup> таксола), указывая на то, что он  
15 лучше переносим. Композиции альбумина с паклитакселом также демонстрируют значительно сниженную нейтропению по сравнению с кремофором с паклитакселом.

#### ПРИМЕР 18

Данный пример демонстрирует повышенную доклиническую эффективность с использованием фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин.

Исследование цитотоксичности *in vitro*, сравнивающее действие альбумина с  
20 паклитакселом и таксол на шейную плоскоклеточную карциному A431, показало приблизительно 4-кратное увеличение цитотоксической активности для альбумина с паклитакселом со значениями IC<sub>50</sub> 0,0038 и 0,012 мкг/мл для альбумина с паклитакселом и таксола, соответственно.

В пяти различных моделях опухолей ксенотрансплантатов человека у бестимусных  
25 мышей (относящийся к молочной железе MX-1, легким NCI-H522, яичникам SK-OV-3, простате PC-3 и толстой кишке HT-29) MTD или одинаково токсичная доза ABI-007 была выше в 1,5-3,4 раза, чем для таксола и приводила к статистически значимому улучшению в замедлении роста опухоли (p<0,05) во всех опухолях за исключением опухоли легкого (p=0,15).

В модели молочной железы MX 1 сто процентов (100%) животных, которых лечили альбумином с паклитакселом, выживали в течение 103 дней по сравнению с 20-40%  
30 выживших в группах, которые лечили такими же дозами таксола.

#### ПРИМЕР 19

Данный пример демонстрирует повышенную клиническую эффективность с  
35 использованием фармацевтической композиции, содержащей альбумин и паклитаксел, вводимой внутриаартериально.

В исследованиях на стадии I/II внутриаартериального введения фармацевтической композиции, содержащей альбумин и паклитаксел, как описано здесь, у пациентов  
40 регистрировали рак головы и шеи (N=31) и рак анального канала (N=12).

Всевозрастающую дозу 120 -300 мг/м<sup>2</sup>, вводили более 30 минут чрескожным внутриаартериальным вливанием 3-4 нед. Пациенты с раком головы и шеи проявляли степень ответа равную 76% (N=29), тогда как пациенты с раком анального канала проявляли степень ответа равную 64% (N=11).

#### ПРИМЕР 20

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей 3% масло и включающей в себя пропофол и альбумин.

Эмульсию типа масло в воде, содержащую 1% (по массе) пропофола, получали

следующим образом. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Масляную фазу готовили, растворяя яичный лецитин (0,4 мас.%) и пропофол (1 мас.%) в соевом масле (3 мас.%)  
5 приблизительно при 50°C-60°C, и взбалтывали до растворения. Масляную фазу добавляли к водной фазе и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Конечную эмульсию фильтровали (фильтр  
10 на 0,2 мкм) и хранили в азоте. Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): пропофол 0,5-5%; альбумин сыворотки человека 0,5-3%; соевое масло 0,5-3,0%; яичный лецитин 0,12-1,2%; глицерин 2,25%; вода для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли подходящие хелаторы, например, дефероксамин (0,001-0,1%).

#### 15 ПРИМЕР 21

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей 5% масло и включающей пропофол и альбумин.

Эмульсию типа масло в воде, содержащую 1% (по массе) пропофола, получали следующим образом. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин  
20 сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Масляную фазу готовили, растворяя яичный лецитин (0,8 мас.%) и пропофол (1 мас.%) в соевом масле (5 мас.%) приблизительно при 50°C-60°C, и взбалтывали до растворения. Масляную фазу добавляли к водной фазе и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин.  
25 Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсия фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте. Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): пропофол 0,5-5%;  
30 альбумин сыворотки человека 0,5-3%; соевое масло 0,5-10,0%; яичный лецитин 0,12-1,2%; глицерин 2,25%; вода для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли подходящие хелаторы, например, дефероксамин (0,001-0,1%).

#### ПРИМЕР 22

35 Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, включающей пропофол и альбумин и не содержащей масло.

Используя методику, подобную методике, описанной в примере 18, приготовили композиции с пропофолом, содержащие альбумин и твин 80. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%), альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%), твин 80 (1,5 мас.%) и мезилат дефероксамина (0,1 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до  
40 растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Пропофол (1 мас.%) добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсия  
45 фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте. Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): пропофол 0,5-5; альбумин сыворотки человека 0,5-3%; твин 80 0,1-1,5%; мезилат дефероксамина 0,0001-0,1%; глицерин 2,25%; вода для инъекции q.s. до 100; pH 5-8.

### ПРИМЕР 23

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, включающей в себя пропофол, альбумин и витамин E-TPGS, которая не содержит масло.

Используя методику, подобную методике, описанной в примере 19, приготовили композицию с пропофолом, содержащую альбумин и витамин E-TPGS. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%), альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%), витамин E-TPGS (1 мас.%) и мезилат дефероксамина (0,1 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Пропофол (1 мас.%) добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсию фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте. Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): 0,5-5 пропофола; 0,5-3% альбумина сыворотки человека; 0,5-4,0% витамина E-TPGS; необязательно 0,0001-0,1% мезилата дефероксамина; 2,25% глицерина; воду для инъекции q.s. до 100; pH 5-8.

### ПРИМЕР 24

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей пропофол, альбумин, витамин E-TPGS и 1% масла.

Эмульсию, содержащую 1% (по массе) пропофола готовили следующим способом. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Поверхностно-активное средство, например, витамин E-TPGS (0,5%) добавляли в водную фазу. Масляная фаза состояла из пропофола (1 мас.%) и 1% соевого масла. Масляную фазу добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение вплоть до 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсию фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте.

Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): 0,5-5% пропофола; 0,01-3% альбумина сыворотки человека; 0,1-2% витамина E-TPGS; соевого или другого масла (0,1%-5%); 2,25% глицерина; воду для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли дефероксамин (0,001-0,1 мас.%).

### ПРИМЕР 25

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей пропофол, альбумин, витамин E-TPGS, 1% масла и отрицательно заряженный компонент.

Эмульсию, содержащую 1% (по массе) пропофола готовили следующим способом. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Поверхностно-активное средство, например, витамин E-TPGS (0,5%) добавляли в водную фазу. Масляная фаза состояла из пропофола (1 мас.%) и 1% соевого масла. Добавляли небольшое количество отрицательно заряженного компонента (0,001%-1%), например, фосфолипид или соль желчных кислот. Масляную фазу добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин.

Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение вплоть до 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсия фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте.

5 Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): 0,5-5% пропофола; 0,01-3% альбумина сыворотки человека; 0,1-2% витамина Е-TPGS; соевого или другого масла (0,1%-5%); 2,25% глицерина; воду для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли дефероксамин (0,001-0,1 мас.%).

#### 10 ПРИМЕР 26

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей пропофол, альбумин, витамин Е-TPGS, 1% масла и отрицательно заряженный компонент (дезоксихолат натрия).

Эмульсию, содержащую 1% (по массе) пропофола готовили следующим способом. 15 Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Поверхностно-активное средство, например, витамин Е-TPGS (0,5%) добавляли в водную фазу. Масляная фаза состояла из пропофола (1 мас.%) и 1% соевого масла. Добавляли небольшое количество отрицательно заряженного 20 компонента (0,001%-1%), например, дезоксихолат натрия. Масляную фазу добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и подвергали рециркуляции в течение вплоть до 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсия 25 фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте.

Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные диапазоны компонентов (мас.%): 0,5-5% пропофола; 0,01-3% альбумина сыворотки человека; 0,1-2% витамина Е-TPGS; соевого или другого масла (0,1%-5%); 2,25% глицерина; воду для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли дефероксамин 30 (0,001-0,1 мас.%).

#### ПРИМЕР 27

Данный пример демонстрирует приготовление фармацевтической композиции, содержащей пропофол, альбумин, витамин Е-TPGS, 1% масла и отрицательно 35 заряженный компонент (фосфолипиды, соли желчных кислот, полиаминокислоты и т.д.).

Эмульсию, содержащую 1% (по массе) пропофола готовили следующим образом. Водную фазу готовили, добавляя глицерин (2,25 мас.%) и альбумин сыворотки человека (0,5 мас.%) в воду для инъекции, и взбалтывали до растворения. Водную фазу пропускали через фильтр (фильтр на 0,2 мкм). Поверхностно-активное средство, например, витамин 40 Е-TPGS (0,5%) добавляли в водную фазу. Масляная фаза состояла из пропофола (1 мас.%) и 1% соевого масла. Добавляли небольшое количество отрицательно заряженного компонента (0,001%-1%), например, фосфатидилхолин. Масляную фазу добавляли в водную фазу и гомогенизировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Первичную эмульсию гомогенизировали при высоком давлении при 20000 фунт/кв.дюйм и 45 подвергали рециркуляции в течение вплоть до 15 циклов при 5°C. Альтернативно, использовали отдельные пропускания через гомогенизатор. Окончательную эмульсия фильтровали (фильтр на 0,2 мкм) и хранили в азоте.

Полученная фармацевтическая композиция содержала следующие основные

диапазоны компонентов (мас.%): 0,5-5% пропофола; 0,01-3% альбумина сыворотки человека; 0,1-2% витамина Е-TPGS; соевое или другое масло (0,1%-5%); 2,25% глицерина; воду для инъекции q.s. до 100; pH 5-8. Необязательно добавляли дефероксамин (0,001-0,1 мас.%).

#### 5 ПРИМЕР 28

Данный пример демонстрирует связывание пропофола с альбумином.

Связывание пропофола с альбумином определяли следующим образом.

Растворимость пропофола проверяли в воде и в растворе, содержащем альбумин. 250 мкл пропофола добавляли к 10 мл воды или раствору альбумина и взбалтывали в течение 2 часов в синтиллиационном пузырьке. Затем раствор переносили в пробирку для центрифугирования с 15 мл полиэтилена и держали при 40°C в течение 10 приблизительно 16 часов. В образцах воды и растворов альбумина анализировали количество пропофола. Растворимость пропофола в воде, как определили, составила 0,12 мг/мл. Растворимость пропофола в растворах альбумина зависела от концентрации альбумина и увеличивалась до 0,44 мг/мл, если концентрация альбумина составляла 15 2% (20 мг/мл). Растворы ультрафильтровали посредством фильтра с MWCO 30кД и в фильтрах анализировали количество пропофола. Было обнаружено, что для раствора пропофол/вода 61% пропофола можно было восстановить в фильтрате, тогда как для раствора пропофол/альбумин только 14% восстанавливали в фильтрате, что указывает на значительное связывание пропофола с альбумином. Основанное на данных 20 результатах добавление альбумина в фармацевтические композиции, содержащие пропофол, приводит к уменьшению количества несвязанного пропофола вследствие связывания альбумина с пропофолом.

#### ПРИМЕР 29

25 Данный пример демонстрирует уменьшение несвязанного пропофола в фармацевтической композиции при фильтрации/контакте с мембраной.

Как наблюдали в экспериментах, описанных в примере 28, фильтрация или ультрафильтрация фармацевтических композиций, содержащих пропофол, приводила к уменьшению количества несвязанного пропофола. Диприван и фармацевтическая композиция, приготовленная по настоящему изобретению, содержащая альбумин, 30 каждый из которых содержал 1% пропофола (10 мг/мл), ультрафильтровали с использованием мембраны 30 кД. Количество несвязанного пропофола в фильтрате измеряли при помощи ВЭЖХ. Концентрация несвязанного пропофола в фильтрате составляла приблизительно 17 мкг/мл для дипривана, в то время как концентрация 35 несвязанного пропофола в фильтрате для фармацевтической композиции по изобретению составляла приблизительно 7 мкг/мл. Результаты соответствуют эффективному уменьшению несвязанного пропофола, с коэффициентом более чем 2 для фармацевтической композиции, содержащей пропофол и альбумин.

#### ПРИМЕР 30

40 Данный пример демонстрирует введение фармацевтической композиции, содержащей пропофол и альбумин, людям.

Случайное клиническое испытание двойным слепым методом проводили для сравнения нежелательных кожных ощущений от фармацевтической композиции, содержащей пропофол и альбумин, с фармацевтической композицией коммерчески доступного 45 препарата с пропофолом дипривана. Испытания проводили в соответствии с приемлемой клинической практикой, и от индивидуумов было получено согласие на основе полной информации. Взрослые индивидуумы людей обоих полов были пригодны для участия, если они имели очевидно нормальную кожу без повреждений на тыльной стороне рук.

Препараты, изначально хранимые в холодильнике, доводили до комнатной температуры, и 10 мкл препаратов медленно наносили одновременно на тыльную сторону обеих рук индивидуума. Отмечали суммарную реакцию и ощущения на их руках от препаратов. Результаты данного исследования изложены в таблице 1.

5

Порядок проверки у индивидуума	% индивидуумов с ощущениями от АБИ-пропофола		% индивидуумов с ощущениями от дипривана	
	Легкое тепло или жжение или жалящее чувство	Нет ощущений	Легкое тепло или жжение или жалящее чувство	Нет ощущений
1 степень	0	100,0	75	25

10

### ПРИМЕР 31

Данный пример демонстрирует использование дефероксамина в качестве антиоксиданта в фармацевтической композиции, содержащей пропофол.

15

Фармацевтические композиции, включающие пропофол и мезилат дефероксамина и содержащие твин или TPGS, хранили при 4°, 25° или 40°С для того, чтобы исследовать эффект мезилата дефероксамина по предотвращению окисления пропофола. Для данных препаратов измеряли концентрацию пропофола по прошествии длительного времени, чтобы определить антиоксидантную активность дефероксамина. Данные представлены ниже в таблицах 2 и 3 как % эффективности относительно нулевого времени.

20

Температура	1 месяц хранения		
	4°С	25°С	40°С
Контроль	100%	88%	48%
0,01% Def	101%	89%	61%
0,1% Def	103%	89%	64%

25

Температура	1 месяц хранения		
	4°С	25°С	40°С
Контроль	99%	73%	42%
0,01% Def	99%	87%	55%
0,1% Def	99%	85%	58%

30

При данных условиях дефероксамин был эффективен для уменьшения степени окисления пропофола. Эффект был более ярко выражен при более высоких температурах. Никакого значительного окисления не происходило при 4°С. Данное исследование проводили с использованием пробок, которые не являлись инертными или были покрыты тефлоном.

35

### ПРИМЕР 32

Данный пример демонстрирует внутрилегочную доставку фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин (АБИ-007).

40

Цель данного исследования заключалась в определении периода присутствия [<sup>3</sup>H] АБИ-007 в крови и выбранных тканях после интратрахеальной инстилляцией крысам Sprague Dawley.

45

Заданный объем препарата для интратрахеальной дозы, которая вводилась животным, рассчитывали на основе объема дозы 1,5 мл на кг массы тела. Дозирующее устройство состояло из микропульверизатора Penn-Century (модель 1А-1В; Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA; приобретен у DeLong Distributors, Long Branch, NJ), прикрепленного к герметичному впрыскивателю с люэровской насадкой объемом 1 мл. Соответствующий объем дозированного препарата помещали в дозирующее устройство, заполненное

устройство взвешивали и регистрировали его массу. Катетер вводили в трахею анестезированного животного, микропульверизаторную часть дозирующего устройства помещали в трахею через катетер и вводили дозу. После введения дозы пустое дозирующее устройство повторно взвешивали и введенную дозу рассчитывали как разницу масс дозирующего устройства до и после введения дозы. Средняя доза для всех животных составляла  $4,7738 \pm 0,0060$  (CV 1,5059) мг паклитаксела на кг массы тела.

Образцы крови в количестве приблизительно 250 мкл забирали из находящейся в яремной вене канюли у крыс JVC в следующие предварительно определенные моменты времени после введения дозы: 1, 5, 10, 15, 30 и 45 минут (мин) и 1, 4, 8 и 24 часа (ч).

Образцы крови, взятые через 24 часа, а также образцы крови, взятые от умерщвленных животных через 10 мин, 45 мин и 2 ч, забирали посредством пункции сердца анестезированных при умерщвлении. Все образцы крови, анализируемые на общую радиоактивность, распределяли в предварительно взвешенные пробирки для образцов, и эти пробирки для образцов повторно взвешивали, и массу каждого образца рассчитывали вычитанием. В образцах крови, собранных из яремной вены, а также в аликвотах крови по 250 мкл, собранных у животных при умерщвлении, анализировали общее содержание трития.

Для всех крыс, максимальную концентрацию трития в крови наблюдали через 5 мин (0,0833 ч) после введения дозы. Период полувыведения трития, определенного во временном интервале от 4 ч до 24 ч, находился в диапазоне от 19,73 ч до 43,02 ч. Необходимо отметить, что данный интервал включает только три результата обработки данных, которые можно вычислить для изменчивости данного параметра. Величина выраженного очищения крови от трития составляла порядка 0,04 л/ч. Результаты данных экспериментов указаны ниже в таблице 4.

Таблица 4 Некомпаратментный анализ концентрации трития в крови (мг×экв./л) в сравнении с временными профилями у крыс после интра-трахеального вливания [ <sup>3</sup> H]ABI-007	
Параметр	Среднее±SD
$C_{\max}$ (мг×экв./л)	1,615±0,279
$T_{\max}$ (ч)	0,0833±0,0
$t_{1/2\beta}$ (ч)	33,02±1,99
AUClast (мг×экв.×ч/л)	7,051±1,535
Cl/F (л/ч)	0,0442±0,0070
Fa (биодоступность)	1,229±0,268

Среднюю концентрацию в крови радиоактивности, происходящей от [<sup>3</sup>H]ABI-007, после внутривенного введения дозы крысам анализировали как функцию от времени, для того чтобы оценить биодоступность трития, полученного при интратрахеальном введении [<sup>3</sup>H]ABI-007. Данный анализ привел к получению величины AUC за 24 часа (AUClast), составляющей 6,1354 мг×экв.×ч/л. Основанная на таких данных радиоактивность, происходящая из интратрахеального введения дозы [<sup>3</sup>H]ABI-007, является чрезвычайно биодоступной. Данные анализы основаны на общей радиоактивности.

Тритий, происходящий из [<sup>3</sup>H]ABI-007, быстро поглощается после интратрахеального вливания. Среднее поглощение и периоды полувыведения (период полувыведения k01 и период полувыведения k10, соответственно) трития в крови после интратрахеального введения дозы [<sup>3</sup>H]ABI-007 (среднее±SD) составляли  $0,0155 \pm 0,0058$  ч и  $4,738 \pm 0,366$  ч, соответственно. Средний выраженный клиренс трития в крови составлял  $0,1235 \pm 0,0180$



л/ч (см. таблицу 4 выше).

Тритий, происходящий из [<sup>3</sup>H]АВІ-007 после интратрахеального введения, поглощался и распределялся. Динамика концентраций трития в крови хорошо описана двухкомментной моделью со средним поглощением и периодом полувыведения 0,0155 и 4,738 ч, соответственно. Приблизительно 28% введенной дозы находили в легких через 10 мин после интратрахеального введения дозы. Максимум, менее чем 1% от дозы находили в других тканях, за исключением желудочно-кишечного тракта, во все исследуемые моменты времени.

Основанная на результатах предварительно проводимого исследования внутривенной дозы [<sup>3</sup>H]капксол<sup>ТМ</sup> ([<sup>3</sup>H]Сархол<sup>ТМ</sup>), биодоступность трития, происходящего из внутритрахеальной дозы, составляла 1,229±0,268 (среднее значение ± SD) для трех животных в данной группе дозы. Следует отметить, однако, что эта оценка биодоступности основана на суммарной радиоактивности. Неожиданно, что паклитаксел, доставляемый легочным путем с использованием композиций с альбумином по изобретению, быстро становился биодоступным, указывая на превосходный транспорт через легочный эндотелий. Не отмечали никакой токсичности у животных, что было неожиданно, поскольку легочная доставка цитотоксических средств, как известно, вызывать легочную токсичность.

Изрядное количество радиоактивности присутствовало в желудочно-кишечном тракте (включая содержимое) через 24 ч после введения дозы (27% интратрахеальной дозы). Наличие трития в желудочно-кишечном тракте возможно является следствием желчевыделения или клиренса трития из дыхательных путей посредством мукоцилиарного клиренса, являющегося результатом глотания.

### ПРИМЕР 33

В данном примере продемонстрировано исследование распылителей Aerotech II и Pari для легочной доставки фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин.

Исследование проводили с использованием фармацевтической композиции паклитаксела с альбумином АВІ-007 при следующих условиях: комнатная температура (20-23°C), относительная влажность (48-54%), давление окружающей среды (629 мм рт.ст.), подаваемый поток распылителем (10 л/мин для *Aerotech II*; 7 л/мин для *Pari*), суммарный подаваемый поток (28,3 л/мин), перепад давлений в распылителе (23 фунт/дюйм<sup>2</sup> для *Aerotech II*; 32 фунт/дюйм<sup>2</sup> для *Pari*), продолжительность работы (от 15 до 60 секунд), объем образца (1,5 мл), концентрация паклитаксела АВІ-007 (5, 10, 15 и 20 мг/мл).

Оба распылителя Aerotech II и Pari обеспечивают приемлемую общую эффективность (30%-60%) в тех случаях, когда АВІ-007 восстанавливали до концентрации в диапазоне 5-15 мг/мл. Результативность распылителя Pari имела более высокую эффективность распылителя, чем распылитель Aerotech II. Результативность распылителя Pari уменьшалась в некоторой степени при увеличении концентрации АВІ-007. Наблюдала превосходную фракцию тонкодисперсных частиц (74%-96%). Распылитель Aerotech II содержал фракцию тонкодисперсных частиц более высокого порядка, чем распылитель Pari. Фракция тонкодисперсных частиц не зависела от концентрации.

Распылитель Pari доставлял 100 мг паклитаксела менее чем за 30 минут с использованием раствора АВІ-007 в концентрации 15 мг/мл. Распылитель Aerotech II доставлял 100 мг паклитаксела приблизительно за 65 мин с использованием раствора АВІ-007 в концентрации либо 10 мг/мл, либо 15 мг/мл. Стабильность показателей работы

проверяли на обоих распылителях Aerotech II и Pari. Концентрация аэрозоля и эффективность обоих распылителей были стабильны, пока лекарственное средство не заканчивалось. При концентрации 15 мг/мл распылитель Pari потреблял лекарственное средство в два раза быстрее, чем распылитель Aerotech II, и выдавал более высокие концентрации аэрозоля, чем концентрации аэрозоля из распылителя Aerotech II.

В заключение, препарат с наночастицами паклитаксела/альбумином (ABI-007) показал превосходную биодоступность у крыс, при введении легочным путем. Не было никаких выраженных признаков ранней токсичности от введенной дозы. Легочную доставку паклитаксела в наночастицах (ABI-007) может осуществить с использованием обычных распылителей.

#### ПРИМЕР 34

В данном примере описана внутрилегочная доставка фармацевтической композиции, содержащей альбумин и рапамицин. Цель данного изучения заключалась в определении легочной абсорбции рапамицина после интратрахеального вливания крысам Sprague-Dawley по сравнению с внутривенным вливанием.

Заданный объем препарата для интратрахеальной дозы, которая вводилась животным, рассчитывали на основе объема дозы 1 мл на кг массы тела.

Интратрахеальное дозирующее устройство состояло из микропульверизатора Penn-Century (модель 1A-1B; Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA; приобретен у DeLong Distributors, Long Branch, NJ), прикрепленного к герметичному впрыскивателю с люэровской насадкой объемом 1 мл. Соответствующий объем дозированного препарата помещали в дозирующее устройство, заполненное устройство взвешивали и регистрировали его массу. Катетер вводили в трахею анестезированного животного, микропульверизаторную часть дозирующего устройства помещали в трахею через катетер и вводили дозу. После введения дозы пустое дозирующее устройство повторно взвешивали и введенную дозу рассчитывали как разницу масс дозирующего устройства до и после введения дозы.

Образцы объемом в количестве 250 мкл забирали из находящейся в яремной вене канюли у крыс в следующие предварительно определенные моменты времени после введения дозы: 1, 5, 10, 15, 30 и 45 минут (мин) и 1, 4, 8 и 24 часа (ч). Все анализируемые образцы крови распределяли в предварительно взвешенные пробирки для образцов, и эти пробирки для образцов повторно взвешивали, и массу каждого образца рассчитывали вычитанием. В собранных образцах крови анализировали общую концентрацию рапамицина с использованием LC/MS/MS.

Неожиданно, результаты не показали значительной разницы в концентрации в крови рапамицина, доставляемого легочным путем в сравнении с внутривенным путем. Биодоступность рапамицина, доставляемого легочным путем, используя фармацевтическую композицию, содержащую альбумин, как рассчитали, составила 109%, указывая на превосходный транспорт через легочный эндотелий.

#### ПРИМЕР 35

Данный пример демонстрирует распределение в ткани альбумина с рапамицином после внутрилегочного введения фармацевтической композиции, содержащей рапамицин и альбумин, приготовленной по настоящему изобретению. Цель данного исследования заключалась в определении легочной абсорбции рапамицина тканью после интратрахеального вливания крысам Sprague-Dawley по сравнению с внутривенным вливанием.

Заданный объем препарата для интратрахеальной дозы, которая вводилась животным, рассчитывали на основе объема дозы 1 мл на кг массы тела. Дозирующее

устройство состояло из микропульверизатора Penn-Century (модель 1A-1B; Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA; приобретен у DeLong Distributors, Long Branch, NJ), прикрепленного к герметичному впрыскивателю с люэровской насадкой объемом 1 мл. Соответствующий объем дозированного препарата помещали в дозирующее устройство, заполненное устройством взвешивали и регистрировали его массу. Катетер вводили в трахею анестезированного животного, микропульверизаторную часть дозирующего устройства помещали в трахею через катетер и вводили дозу. После введения дозы пустое дозирующее устройство повторно взвешивали и введенную дозу рассчитывали как разницу масс дозирующего устройства до и после введения дозы.

Образцы забирали из мозга, легких и печени у трех крыс на группу в моменты времени 10 минут, 45 минут, 2 часа и 24 часа. Образцы собирали и анализировали в них общую концентрацию рапамицина с использованием LC/MS/MS. Результаты указывают на то, что концентрация рапамицина в легочной ткани больше в тех случаях, когда осуществлялась легочная доставка по сравнению с внутривенной доставкой. Однако, общая концентрация рапамицина в мозге меньше в тех случаях, когда осуществлялась интратрахеальная (IT) доставка по сравнению с внутривенной (IV) доставкой. В печени, как оказалось, не было никакого различия в концентрации рапамицина при IT или IV доставки. На основе данных результатов легочная доставка рапамицина может подходить для лечения состояний (то есть, при трансплантации легкого), когда высокая локальная концентрация рапамицина была бы благотворной.

#### ПРИМЕР 36

Данный пример демонстрирует пероральную доставку фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин (ABI-007).

Для определения пероральной биодоступности паклитаксела после перорального принудительного питания крыс использовали меченный тритием ABI-007. После ночного ограничения в пище 5 крысам давали паклитаксел в составе ABI-007 при дозе 5,5 мг/кг (Группа А), и еще 5 крыс (Группа В) предварительно получали циклоспорин (5,0 мг/кг), после чего следовал прием паклитаксела в составе ABI-007 при дозе 5,6 мг/кг. Фармакокинетический анализ образцов крови, полученных через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа проводили после определения радиоактивности в образцах крови окислением. Пероральную биодоступность определяли при сравнении с предварительно полученными данными по внутривенному введению. Результаты указаны ниже в таблице 5.

Таблица 5						
Среднее значение AUC 0-24, C <sub>max</sub> , T <sub>max</sub> и % абсорбции происходящей из <sup>3</sup> H-паклитаксела радиоактивности после перорального введения						
Группа	Лечение	Доза/путь мг/кг	AUC 0-24 (мкг×экв.×ч/мл)	Абсорбция (%)	C <sub>max</sub> (мг/кг) (мкг×экв./мл)	T <sub>max</sub> (ч)
А	ABI-007 в физиологическом растворе	5,5/PO(P)	2,92	44,3	0,245	1
В	ABI-007 в физиологическом растворе с CsA	5/PO(C), 5,6/PO(P)	8,02	121,1	0,565	0,5

Значение AUC 0-24 IV (6,06 мкг×ч./мл) и дозу IV (5,1 мг/кг) использовали для расчета процентной абсорбции (данные, основанные на дозе IV ABI-007).

44% пероральной биодоступности было показано для одного только ABI-007. Данная биодоступность намного больше, чем было показано для других препаратов паклитаксела. Биодоступность увеличивалась до 121%, если животным давали циклоспорин (CsA). Это ожидаемо, поскольку CsA является известным агентом

подавления р-гликопротеинового насоса, который обычно предотвращает абсорбцию таких соединений, как паклитаксел из ЖК тракта. Более чем 100% биодоступность можно объяснить повторной абсорбцией после желчевыделения паклитаксела в ЖК тракт. Другие известные подавляющие или усиливающие абсорбцию агенты также

5 можно использовать для данной цели.

#### ПРИМЕР 37

Данный пример демонстрирует улучшенное проникновение паклитаксела в красные кровяные тельца и опухолевые клетки при введении фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин.

10 Фрагменты опухоли молочной железы человека МХ-1 имплантировали подкожно бестимусным мышам. Фармацевтическую композицию, содержащую паклитаксел и альбумин («паклитаксел с альбумином»), как описано ранее, и таксол приготовили с использованием <sup>3</sup>Н-паклитаксела до определенной активности 25 мкКи/мг паклитаксела. 20 мг/кг меченного изотопом паклитаксела с альбумином или таксола вводили в

15 физиологическом растворе внутривенно, когда объем опухоли увеличивался приблизительно до 500 мм<sup>3</sup>. Плазму, кровь и опухолевую ткань собирали и анализировали в них радиоактивность через 5, 15 и 30 минут и через 1, 3, 8 и 24 часа после введения. Фармакокинетику в опухоли (AUC и константу абсорбции) анализировали с использованием WinNonlin, Pharsight, USA.

20 Паклитаксел с альбумином показал быстрое распределение в красные кровяные тельца (RBC), как показано быстрым снижением соотношения радиоактивности плазма/кровь до менее единицы после внутривенного введения лекарственного средства. Полное распределение в RBC имело место через 1 ч после введения паклитаксела с альбумином. В отличие от этого, распределение паклитаксела, приготовленного в качестве таксола,

25 в RBC было гораздо более медленным и неполным до более чем 8 ч.

Паклитаксел с альбумином показал быстрое распределение в опухолевую ткань с константой абсорбции ( $K_a$ ), которая составила величину в 3,3 раза больше, чем для таксола.  $K_a$  составили 0,43 ч<sup>-1</sup> и 0,13 ч<sup>-1</sup> для паклитаксела с альбумином и таксола,

30 соответственно. Быстрый захват паклитаксела приводил к более высокому значению на 33% опухолевой AUC для паклитаксела с альбумином, чем для таксола. Значения AUC составляли 3632 нКи\*ч/г и 2739 нКи\*ч/г для паклитаксела с альбумином и таксола, соответственно.

#### ПРИМЕР 38

35 Данный пример демонстрирует безопасность фармацевтической композиции, содержащей паклитаксел и альбумин, вводимой мышам.

Бестимусные мыши получали возрастающие дозы паклитаксела с альбумином или таксола ежедневно в течение 5 следующих один за другим дней. Выживаемость откладывали на оси графика против дозы, чтобы определить LD<sub>50</sub>. Выживаемость

40 значительно возрастала для паклитаксела с альбумином по сравнению с таксоллом (p=0,017, ANOVA). LD<sub>50</sub> для паклитаксела с альбумином и таксола, как рассчитали, составляла 47 мг/кг/день и 30 мг/кг/день для схемы один раз в день × 5, соответственно. При уровне дозы 13,4 мг/кг/день и паклитаксел с альбумином и таксол хорошо

45 переносились с 1% смертности (1 смертельный исход из 72 мышей) и 4% (2 смертельных исхода из 47 мышей), соответственно. При уровне дозы 20 мг/кг/день наблюдали 1% смертность для паклитаксела с альбумином (1 смертельный исход из 72 мышей) в сравнении с 17% смертностью для таксола (8 смертельных исхода из 47 мышей) (p=

0,0025). При уровне дозы 30 мг/кг/день наблюдали 4% смертность для паклитаксела с альбумином (3 смертельных исхода из 72 мышей) в сравнении с 49% смертностью для таксола (23 смертельных исхода из 47 мышей) ( $p < 0,0001$ ).

#### ПРИМЕР 39

5 Данный пример демонстрирует новый механизм транспорта паклитаксела через эндотелиальные клетки (ЕС) микрососудов для композиций паклитаксела с альбумином.

Наночастицы и композиции альбумина с паклитакселом могут накапливаться в опухолевой ткани вследствие EPR эффекта, являющегося результатом «прорастания» сосудов в опухоль. Специфичный для альбумина рецептор gp60 (албондин),  
 10 транспортирующий альбумин через ЕС путем транцитоза рецепторов в кавеолы на клеточной поверхности. Данный механизм транцитоза позволяет осуществлять транспорт альбумина с паклитакселом в подлежащее интерстициальное пространство. В отличие от этого, кремофор в таксоле ингибировал связывание паклитаксела с альбумином, значительно уменьшая транспорт паклитаксела в опухоль. Дополнительно,  
 15 рецепторы gp16 и gp30 также вовлекались во внутриклеточный транспорт модифицированных альбуминов, содержащих связанный паклитаксел, приводя к увеличенному связыванию паклитаксела с эндотелиальными клетками с большим противоангиогенным действием по сравнению с таксолом.

#### ПРИМЕР 40

20 Данный пример демонстрирует увеличение эндотелиального транцитоза фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин по сравнению таксолом.

Эндотелиальные клетки микрососудов легких человека (HLMVEC) растили до закрепления в лунке планшета для транцитоза. Фармацевтическую композицию по  
 25 изобретению, содержащую паклитаксел и альбумин или таксол, содержащую флуоресцирующий паклитаксел (флутакс) в концентрации 20 мкг/мл, добавляли в верхнюю часть лунки планшета для транцитоза.

Транспорт паклитаксела посредством транцитоза из верхнего отсека в нижний отсек непрерывно регистрировали с использованием флуориметра. Также использовали  
 30 контроль, содержащий только флутакс без альбумина. Контроль с флутаксом не показал никакого транспорта, подтверждая целостность закрепленного монослоя HLMVEC. Транспорт паклитаксела из композиции альбумина с паклитакселом был значительно быстрее, чем паклитаксела из таксола в присутствии 5% HAS (физиологическая концентрация). Константы скорости транспорта (Kt) для композиции альбумина с  
 35 паклитакселом и таксолом составляли  $1,396 \text{ ч}^{-1}$  и  $0,03 \text{ ч}^{-1}$ , соответственно. Общее количество паклитаксела, транспортированного через монослой было в три раза выше для композиции альбумина с паклитакселом, чем для таксола

#### ПРИМЕР 41

40 Данный пример демонстрирует улучшенное связывание эндотелиальных клеток (ЕС) фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин по сравнению с таксолом.

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) растили на 96-луночном титрационном микропланшете. В одном эксперименте проводили реакцию паклитаксела  
 45 (паклитаксел, меченый флутакс-орегоном зеленым) с HUVES в присутствии увеличивающихся концентраций кремофора EL/EtOH, который является наполнителем для таксола. В другом эксперименте проводили реакцию фармацевтической композиции, содержащей альбумин и флутакс и композиции таксола с флутаксом с HUVES в различных конечных концентрациях. Связывание паклитаксела с клетками

ингибировалось кремофором. Ингибирование проявлялось с  $IC_{50}$  0,02% для кремофора EL/EtOH.

Было показано, что данная концентрация кремофора сохраняется во время химиотерапии таксолем в течение, по крайней мере, 24 часов. Следовательно, это соответствует процессу *in vivo*. При всех анализируемых концентрациях значительные количества паклитаксела из композиции альбумина с паклитакселом связывались с клетками. По сравнению с этим, для таксола наблюдали незначительное связывание или не наблюдали никакого связывания.

#### ПРИМЕР 42

Данный пример демонстрирует улучшенное связывание альбумина фармацевтическими композициями, содержащими паклитаксел и альбумин по сравнению с таксолем.

Альбумин сыворотки человека (HSA) иммобилизовали на пластиковом планшете для ELISA. Проводили реакцию паклитаксела (паклитаксел, меченый флутакс-орегоном зеленым) с иммобилизованным HSA в присутствии увеличивающихся концентраций кремофора EL/EtOH. В другом эксперименте проводили реакции фармацевтической композиции, содержащей альбумин с паклитакселом и флутаксом и композиции таксола с флутаксом с иммобилизованным HSA в конечной концентрации 20 мг паклитаксела/мл. Связывание паклитаксела с альбумином ингибировалось кремофором.

Ингибирование проявлялось с  $IC_{50}$  0,003% для кремофора EL/EtOH. Данная концентрация кремофора, как было показано, сохраняется во время химиотерапии таксолем в течение, по крайней мере, 24 часов. Следовательно, это соответствует процессу *in vivo*. При соответствующей фармакологической концентрации паклитаксела (20 мкг/мл), значительное количество паклитаксела из композиции альбумина с паклитакселом связывалось с иммобилизованным HSA. По сравнению с этим, не наблюдали никакого связывания для таксола.

#### ПРИМЕР 43

Данный пример демонстрирует увеличенный перенос паклитаксела с альбумином для фармацевтических композиций, содержащих паклитаксел и альбумин по сравнению с таксолем.

Композиции таксола с флутаксом и альбумина с паклитакселом и с флутаксом смешивали либо с 5% HSA в буфере Хенкса или с сывороткой в концентрации 20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 80 мкг/мл. Смеси немедленно разделяли в нативном 3-14% полиакриламидном геле и определяли количество связанного с альбумином паклитаксела при помощи сканирующего флуориметра. Перенос паклитаксела с HSA был более быстрым для композиции альбумина с паклитакселом по сравнению с таксолем.

Больше паклитаксела перемещалось совместно с HAS при электрофорезе, когда либо сыворотку, либо 5% HSA инкубировали с композицией альбумина с паклитакселом и с флутаксом или композицией таксола с флутаксом. Под действием 5% HSA, на 45%, 60% и 33% больше паклитаксела переносилось с HSA для композиции альбумина с паклитакселом и с флутаксом, чем для композиции таксола с флутаксом при 20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 80 мкг/мл, соответственно. Под действием сыворотки человека на 121%, 31% и 83% больше паклитаксела переносилось с HSA для композиции альбумина с паклитакселом и с флутаксом, чем для композиции таксола с флутаксом при 20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 80 мкг/мл, соответственно. Величина  $C_{max}$  для ABI-007 при концентрации 260 мг/м<sup>2</sup> приблизительно составляет 20 мкг/мл, следовательно, этот процесс является

важным процессом *in vivo*.

#### ПРИМЕР 44

В данном примере демонстрируют, что гликопротеиновый рецептор gp60 отвечает за связывание и трансцитоз альбумина с паклитакселом.

5 Композиции флуоресцентно меченного паклитаксела (флутакса) с альбумином взаимодействовали с эндотелиальными клетками микрососудов в культуре. Флуоресцентное окрашивание наблюдали под микроскопом по признаку мерцающих областей, которые, как постулировали, являлись рецептором gp60, связывающим альбумин с паклитакселом. Данные результаты подтверждали с использованием  
10 альбумина, меченного родамином, который располагался совместно с мерцающей флуоресценцией паклитаксела.

#### ПРИМЕР 45

В данном примере демонстрируют, что увеличивающиеся количества альбумина могут конкурировать за связывание паклитаксела.

15 Альбумин иммобилизировали на титрационном микропланшете. Флуоресцентный паклитаксел добавляли в лунки и измеряли связывание паклитаксела с использованием сканирующего флуориметра. Увеличивающиеся количества альбумина добавляли в лунки и измеряли уровень ингибирования связывания паклитаксела с иммобилизованным альбумином. Данные показали, что по мере того, как увеличивали количества  
20 добавляемого альбумина, наблюдали соответствующее уменьшение в связывании. Похожий эффект наблюдали при связывании с эндотелиальными клетками. Такие данные указывает на то, что более высокая концентрация альбумина ингибирует связывание паклитаксела. Таким образом, предпочтительными являются композиции по изобретению, содержащие более низкие количества альбумина.

#### 25 ПРИМЕР 46

В данном примере демонстрируют, что более низкие количества альбумина в фармацевтической композиции по изобретению приводят к получению стабильных композиций.

Для того чтобы исследовать, могут ли более низкие количества альбумина влиять  
30 на стабильность фармацевтической композиции по изобретению, были приготовлены композиции альбумина с паклитаксела с небольшими количествами альбумина. Было обнаружено, что данные композиции также стабильны, как и композиций с более высокими количествами альбумина, при исследовании в течение нескольких месяцев при различных температурах (2-8°C, 25°C и 40°C) эффективности паклитаксела,  
35 образования загрязнения, размера частиц, pH и других типичных параметров стабильности. Таким образом, композиции с более низкими количествами альбумина предпочтительны, так как они могут значительно уменьшить стоимость, а также позволить увеличить связывание с клеткой и транспорт в клетку.

#### ПРИМЕР 47

40 В данном примере демонстрируют фармацевтическую композицию, содержащую альбумин и паклитаксел с высоким соотношением альбумина к паклитакселу.

30 мг паклитаксела растворяли в 3,0 мл метиленхлорида. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (3 мас./об.%) (что соответствует соотношению альбумина и паклитакселу, равному 27). При необходимости добавляли  
45 дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об./мин. (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм, наряду с рециркуляцией

эмульсии в течение, по крайней мере, 5 циклов. Полученную систему переносили в роторный испаритель, и быстро удаляли метиленхлорид при температуре 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 минут. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц паклитаксела находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 ч. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации.

Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в данном примере никоим образом не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью паклитаксела, растворенного в препаратах с кремофором, фармацевтическая композиция по изобретению, содержащая альбумин, показала значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 48

В данном примере демонстрируют фармацевтическую композицию, содержащую альбумин и паклитаксел с низким соотношением альбумина к паклитакселу.

В частности, 300 мг паклитаксела растворяли в 3,0 мл метиленхлорида. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (5 мас./об.%) (что соответствует соотношению альбумина и паклитаксела, равному 4,5). При необходимости добавляли дефероксамин. Смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об./мин. (гомогенизатор Vitris, модель Tempest I.Q.) для того, чтобы получить первичную эмульсию, и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм наряду с рециркуляцией эмульсии в течение, по крайней мере, 5 циклов. Полученную систему переносили в роторный испаритель, и быстро удаляли метиленхлорид при температуре 40°C, при пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 минут. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц паклитаксела находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 ч. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Конечное соотношение альбумин/паклитаксел обеспечивали добавлением требуемого количества альбумина для получения конечного соотношения альбумин/паклитаксел 9:1. Данное соотношение может быть определено методами ВЭЖХ.

Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в данном примере никоим образом не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью паклитаксела, растворенного в препаратах с кремофором, фармацевтическая композиция по изобретению, содержащая альбумин, показала значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 49

В данном примере демонстрируют фармацевтическую композицию, содержащую альбумин и паклитаксел, с промежуточным соотношением альбумина и паклитаксела.

В частности, 135 мг паклитаксела растворяли в 3,0 мл метиленхлорида. Раствор добавляли к 27,0 мл раствора альбумина сыворотки человека (5 мас./об.%). При необходимости добавляли дефероксамин. Для того чтобы получить первичную эмульсию смесь гомогенизировали в течение 5 минут при низких об./мин. (гомогенизатор Vitris,



модель Tempest I.Q.) и затем переносили в гомогенизатор высокого давления (Avestin). Эмульгирование проводили при 9000-40000 фунт/кв.дюйм наряду с рециркуляцией эмульсии в течение, по крайней мере, 5 циклов. Полученную систему переносили в роторный испаритель, и быстро удаляли метиленхлорид при температуре 40°C, при 5 пониженном давлении (30 мм рт.ст.) в течение 20-30 минут. Полученная дисперсия была прозрачной, и типичный средний диаметр полученных частиц паклитаксела находился в диапазоне 50-220 нм (Z-average, Malvern Zetasizer). Далее дисперсию лиофилизировали в течение 48 ч. Полученный сгусток легко восстанавливали до исходной дисперсии, добавляя стерильную воду или физиологический раствор. Размер частицы после 10 восстановления оставался таким же, как и до лиофилизации. Рассчитанное соотношение (мас./мас.) альбумина и паклитаксела в данной композиции по изобретению составляет приблизительно 10.

Следует понимать, что количества, типы и количественные соотношения лекарственного средства, растворителей, белков, используемые в данном примере 15 никоим образом не являются ограничивающими. При сравнении с токсичностью паклитаксела, растворенного в препаратах с кремофором, фармацевтическая композиция по изобретению, содержащая альбумин, показала значительно более низкую токсичность.

#### ПРИМЕР 50

20 Данный пример демонстрирует лечение ревматоидного артрита в моделях животных композицией альбумина с паклитакселом.

Вызванную действием коллагена модель артрита у крысы Louvain использовали для того, чтобы проверить терапевтическое воздействие композиции альбумина с паклитакселом на артрит. Для того чтобы оценить серьезность артрита, контролировали 25 размеры лап экспериментальных животных.

После того, как артриты развились полностью (обычно 9-10 дней после введения коллагена), экспериментальных животных разделяли на две группы, которые внутрибрюшинно получали либо альбумин с паклитакселом 1 мг/кг, даваемый один раз в день (q.o.d), либо альбумин с паклитакселом 0,5 мг/кг + преднизон 0,2 мг/кг, 30 даваемый один раз в день (q.o.d) (комбинированное лечение) по 6 доз, затем одну дозу в неделю в течение трех недель. Размеры лапы измеряли в начале лечения (0 день) и каждый раз, когда вводили лекарственный препарат. Одна группа получала только физиологический раствор в качестве контроля. К концу эксперимента, в группе, получающей альбумин с паклитакселом, достигли уменьшения размера лапы на 42%, 35 в группе комбинированного лечения показано уменьшение размера лапы на 33%, в то время как у контрольной группы наблюдали увеличение размера лапы приблизительно на 20% по сравнению с тем временем, когда начали лечение.

В заключение, композиции альбумина с паклитакселом продемонстрировали терапевтическое действие на артрит. Комбинации альбумина с паклитакселом, вероятно, 40 локализуются в очаге артрического повреждения за счет транспорта при помощи механизма, опосредованного рецептором, подобного gp60.

#### ПРИМЕР 51

Данный пример демонстрирует использование композиций альбумина с паклитакселом для лечения сердечно-сосудистого рестеноза.

45 Стенты, элюирующие паклитаксел, вызывают у животных неполное заживление и, в некоторых случаях, потерю стабильного подавления неоинтимального роста в артериях. В настоящем исследовании проверена эффективность новых композиций альбумина с паклитакселом по изобретению с системной доставкой для уменьшения

рестеноза в стенке.

Восстановленный физиологическим раствором альбумин с паклитакселом анализировали на 38 новозеландских белых кроликах, которым вводили двухсторонние стенты в подвздошные артерии. Дозы альбумина с паклитакселом (доза паклитаксела от 1,0 до 5,0 мг/кг) вводили в качестве внутриартериального вливания в течение 10 минут; контрольные животные получали наполнитель (0,9% физиологический раствор).

В хроническом эксперименте с последующим наблюдением 5,0 мг/кг альбумина с паклитакселом давали при стентировании с или без внутривенной повторной дозой альбумина с паклитакселом 3,5 мг/кг через 28 дней; данные исследования заканчивали через 3 месяца. Через 28 дней, средняя неоинтимальная толщина уменьшалась ( $p \leq 0,02$ ) при дозе паклитаксела с альбумином  $\geq 2,5$  мг/кг с признаками медленного заживления. Эффективность однократной дозы альбумина с паклитакселом 5,0 мг/кг, однако, была потеряна за 90 дней. В отличие от этого, вторая повторная доза альбумина с паклитакселом 3,5 мг/кг, которую давали через 28 дней после стентирования, приводила к стабильному уменьшению неоинтимальной толщины через 90 дней ( $p \leq 0,009$  в сравнении с однократной дозой альбумина с паклитакселом 5,0 мг/кг и контролем) с почти полным неоинтимальным заживлением.

Хотя системное введение альбумина с паклитакселом уменьшает неоинтимальный рост через 28 дней, однократная повторная доза была необходима для стабильной неоинтимальной супрессии. Таким образом, композиция по изобретению подходит для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как рестеноз. Композиция по изобретению, содержащая фармацевтический агент отличный от паклитаксела, например, рапамицин, другие таксаны, эпотилоны и т.д., все подходят для лечения рестеноза в кровяных сосудах или трансплантатов искусственных кровеносных сосудов, таких как сосудов, используемых для артериально-венозного доступа у пациентов, которым необходим гемодиализ.

#### Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, содержащая не растворимый в воде фармацевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в которой фармацевтический агент представляет собой паклитаксел, фармацевтически приемлемый носитель включает альбумин, где отношение (мас./мас.) альбумина к не растворимому в воде фармацевтическому агенту составляет 9:1, при этом фармацевтическая композиция содержит наночастицы, включающие не растворимый в воде фармацевтический агент и альбумин, где наночастицы имеют размер частиц менее чем 200 нм.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, которая является дегидратированной.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, которая является лиофилизированной.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, которая является жидкой.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, которая дополнительно содержит физиологический раствор.

6. Фармацевтическая композиция по п.1, которая является стерильной.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, которая находится в стандартной дозе.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, которая находится в нескольких дозах.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, которая содержится в запаянном контейнере.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, которая дополнительно содержит дефероксамин.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, в которой альбумин представляет собой альбумин сыворотки человека.

12. Фармацевтическая композиция по п.1, в которой паклитаксел присутствует в количестве от 0,1 до 1 мас.%.  
5

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция приготовлена для использования в лечении рака.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где рак представляет собой рак молочной железы.

15. Фармацевтическая композиция по п.13, где рак представляет собой рак легкого.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция предназначена для парентерального введения.

10 17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного введения, внутриартериального введения, внутрилегочного введения, перорального введения, ингаляции, внутрипузырного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, подкожного введения, внутриглазного введения, подбололочечного введения или чрескожного введения.  
15

18. Фармацевтическая композиция по п.17, где фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного введения.

19. Фармацевтическая композиция по п.17, где фармацевтическая композиция предназначена для внутрипузырного введения.

20 20. Фармацевтическая композиция по п.17, где фармацевтическая композиция предназначена для подбололочечного введения.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция предназначена для использования у человека.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где фармацевтическая композиция предназначена для инъекции.  
25

23. Способ доставки нерастворимого в воде фармацевтического средства, представляющего собой паклитаксел, индивидууму, предусматривающий введение индивидууму фармацевтической композиции по любому из пп.1-12.

24. Способ по п.23, где индивидуум имеет рак.  
30

35

40

45