



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 130 771** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **A 61 K 9/127**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98110285/14, 01.06.1998  
(46) Дата публикации: 27.05.1999  
(56) Ссылки: 1. RU 2085192 C1, 27.07.97. 2. RU, 2104691 C1, 20.02.98. 3. GB 1575343 A, 17.09.80. 4. DE 19639811 A1, 02.04.98.  
(98) Адрес для переписки:  
193313, Санкт-Петербург, ул.Подвойского,  
д.14, корп.1, кв.741, Кузнецову В.А.

(71) Заявитель:  
Автушенко Сергей Сергеевич  
(72) Изобретатель: Автушенко С.С.  
(73) Патентообладатель:  
Автушенко Сергей Сергеевич

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

(57) Реферат:  
Изобретение относится к области прикладной биотехнологии. Липосомальные препараты получают путем смешивания в емкости биологически активного вещества, фосфолипидов, растворителя и порошкообразного наполнителя и после достижения однородности массы растворитель при перемешивании отгоняют в условиях пониженного давления. Предлагаемый способ значительно упрощает и удешевляет приготовление липосомальных препаратов, обеспечивает высокий процент включения в липосомы биологически активных веществ. 1 з.п. ф-лы, 11 табл., 6 ил.



fig. 2

RU 2 130 771 C1

RU 2 130 771 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 130 771** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 9/127**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98110285/14, 01.06.1998

(46) Date of publication: 27.05.1999

(98) Mail address:  
193313, Sankt-Peterburg, ul.Podvojskogo,  
d.14, korp.1, kv.741, Kuznetsovu V.A.

(71) Applicant:  
**Avtushenko Sergej Sergeevich**

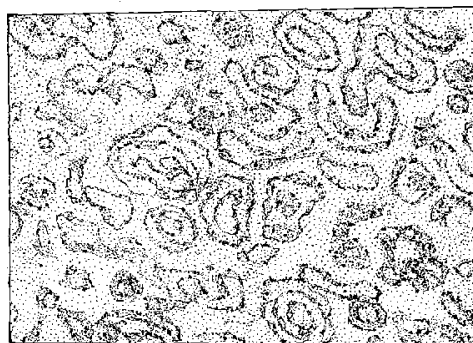
(72) Inventor: **Avtushenko S.S.**

(73) Proprietor:  
**Avtushenko Sergej Sergeevich**

(54) **METHOD OF PREPARING LIPOSOMAL PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: applied biotechnology. SUBSTANCE: preparations are prepared by mixing biologically-active substance, phospholipids, solvent, and powdered filler and, after homogeneity of the mixture is achieved, distilling off solvent at stirring under reduced pressure conditions. EFFECT: essentially simplified and reduced in price procedure, and increased percentage inclusion of biologically active substances into liposomes. 2 cl, 6 dwg, 11 tbl, 7 ex



*фиг. 2*

RU 2 130 771 C 1

RU 2 130 771 C 1

Изобретение относится к области прикладной биотехнологии, а именно к способам получения липосомальных препаратов для лечения и профилактики заболеваний человека и животных.

Известны способы получения липосомальных препаратов путем диспергирования компонентов в растворителе и последующего получения липосом, имеющие различные модификации (Liposomes: a practical approach. Ed. News R.R.C., IRL Press, Oxford, 1989, pp. 1-142).

При физическом диспергировании фосфолипиды высушивают на твердой подложке и затем диспергируют в водной среде, содержащей лекарственные вещества. В этих условиях липиды отслаиваются от подложки и образуют замкнутые многослойные липосомы с включенным во внутренний объем лекарственным веществом. После получения мультислойных везикул получают липосомальные лекарственные препараты с улучшенными свойствами путем их обработки ультразвуком, микроэмульгаторами, замораживанием-оттаиванием, Ca<sup>++</sup>-индуцированным слиянием или иными методами (пат. США N 4927637, кл. А 61 К 37/22, 1990; пат. США N 4883665, кл. А 61 К 37/22, 1990; заявка РСТ N 89/03679, кл. А 61 К 37/22, 1989; пат. Японии N 201117, кл. А 61 К 9/10, 1988; Михайлова С. Фармация, 1988, т. 38, N 6, с. 24-30).

При использовании способа диспергирования с помощью растворителя фосфолипиды растворяют в органическом растворителе, который затем приводят в контакт с водной фазой, содержащей лекарственные препараты, которые должны быть включены в липосомы (Lasic D.D. Les liposomes, La Recherche. 1989. v. 20, N 212, p. 904-913).

При использовании способа детергентной солюбилизации фосфолипиды приводят в контакт с водной фазой через посредник - детергент, который ассоциирован с фосфолипидными молекулами и служит для экранирования гидрофобных частей молекул от воды. При удалении детергента путем диализа или хроматографии происходит образование моноламеллярных липосом (пат. США N 5019394, кл. А 61 К 9/127, 1991).

Недостатком данных способов является: получение водных нестабильных дисперсий липосомальных препаратов, которые должны быть стабилизированы лишь с помощью дополнительных процессов лиофилизации или распылительной сушки, сложность в изготовлении, низкий процент включения биологически активных веществ и лекарств в липосомы, что исключает возможность получения препаратов в промышленных объемах.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату к заявляемому способу является способ получения липосомальных лекарственных препаратов путем приготовления раствора лекарственного средства (ЛС) в смеси воды, этилового спирта, поверхностно-активного вещества (ПАВ), липидов и введении в него многоступенчато при интенсивном перемешивании буферного раствора. В ходе процесса образуется дисперсия липосом, содержащих ЛС, в водно-спиртовом растворе

липосом, содержащих ЛС (Евр. пат. N 0158441, кл. А 61 К 9/50, 1985).

Недостатками прототипа являются возможность получения препаратов только с растворимыми в воде ЛС и растворимыми в этиловом спирте липидами, относительно невысокая (около 40%) степень включения ЛС в липосомы, многостадийность процесса, получение в виде конечного продукта неудобной при транспортировке, хранении и применении жидкой лекарственной формы.

Задачей настоящего изобретения является разработка более универсального и технологически простого способа получения липосомальных препаратов, содержащих биологически активные вещества, лекарства и/или антигены, повышение технологичности способа и обеспечение возможности получения различных форм липосомальных лекарственных препаратов (ЛЛП) в промышленных масштабах.

Поставленная задача решается путем смешивания биологически активного вещества (БАВ), фосфолипидов, органического растворителя, способного растворять фосфолипиды, и порошкообразного наполнителя в одной емкости с последующим удалением растворителя в условиях пониженного давления (вакуума) при сохраняющемся постоянном перемешивании. В результате получают сухой порошкообразный препарат биологически активного вещества, при растворении которого в воде или в биологических жидкостях организма образуется липосомальный препарат.

В качестве фосфолипидов могут быть использованы как индивидуальные фосфолипиды, так и их смеси, полученные из растительного, животного или биотехнологического сырья.

В качестве органических растворителей могут быть использованы хлороформ, метанол, этанол, гексан, эфир, бензол и другие растворители, в которых могут растворяться используемые фосфолипиды.

Фосфолипиды и растворитель могут вводиться в смесь в виде раствора фосфолипидов в данном растворителе.

В качестве сухих порошкообразных наполнителей могут быть использованы сахара и/или полисахариды (глюкоза, лактоза, декстраны и т.п.), полиолы (сорбит, ксилит и другие), соли (поваренная соль и другие) и другие порошкообразные вещества.

Состав конкретных смесей определяется экспериментальным путем исходя из особенностей смешиваемых компонентов и заданных характеристик конечного продукта.

Липосомальные препараты, полученные по предлагаемому способу, как показала экспериментальная проверка, пригодны для лечения и профилактики различных заболеваний.

Сущность и промышленная применимость изобретения иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1 (по прототипу).

В емкость поместили 500 мг яичного лецитина, 400 мг этанола, 100 мг водного раствора (500 мг/мл) БАВ - глюкозы и 100 мг ПАВ - спана-80 и перемешали. К полученной композиции добавляли дробно 4 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 7.4 при интенсивном встряхивании в ходе процесса добавления, а

также через 1, 15 и 30 минут после добавления буферного раствора.

Затем к полученной суспензии добавили еще 6 мл вышеуказанного буфера и энергично встряхнули сразу после добавления, а также через 1, 15 и 30 минут после указанной операции. Полученная взвесь липосом показана на фото фиг. 1. Содержание глюкозы в липосомах составило  $35 \pm 5\%$  от исходного.

Пример 2 (по предлагаемому способу).

В емкость при перемешивании поместили 800 мг БАВ - глюкозы, 200 мг яичного лецитина и 700 мг этанола и при перемешивании со скоростью 50 об/мин при  $37^\circ\text{C}$  подвергли смесь в течение часа воздействию вакуума (пониженного до 0,2 ати давления).

Было получено 1.0 г сухого порошка с влажностью 0.8%. Порошок диспергировали в 10 мл дистиллированной воды. Полученная взвесь липосом (фото фиг. 2) содержала в липосомах  $75 \pm 7\%$  глюкозы от исходного количества, что вдвое больше чем при использовании способа-прототипа по степени включения и в 15 раз больше по количеству включенного лекарственного вещества.

Пример 3 (использование гидрофобного БАВ).

В емкость помещали 50 мг бета-каротина, 750 мг сорбита и раствор 200 мг яичного лецитина в 2000 мл хлороформа, тщательно перемешивали и отгоняли растворитель под вакуумом в условиях, описанных в примере 2.

Было получено 1.0 г сухих липосом. Порошок диспергировали в 10 мл воды и с помощью спектрофотометрии определяли содержание бета-каротина в липосомах. Анализ показал совпадение пиков при длинах волн 270 нм (липосомальный пик) и 436 нм (пик бета-каротина), что свидетельствует о полном включении БАВ в липосомы.

При проведении процесса по методике прототипа в полученных липосомах БАВ присутствовало в следовых (менее 1% от исходного) количествах.

Пример 4 (масштабирование процесса получения липосомальных препаратов).

а). Получение липосомального препарата в малом объеме.

Смешали 0.2 г кристаллического бета-каротина, 1.0 г суммарных фосфолипидов из семян подсолнечника, 8.8 г сорбита и 5.0 г хлороформа в герметически закрывающейся емкости объемом  $15 \text{ см}^3$  при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Емкость закрыли и начали откачивать воздух до достижения вакуума 0.1 атм. Сушку проводили при вакуумировании в течение 1 часа при температуре  $37^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании со скоростью 50 об/мин. В результате получили 10.0 г сухого мелкодисперсного порошка с влажностью 0.7%.

б). Получение липосомального препарата в промышленном объеме.

Смешали 0.2 кг кристаллического бета-каротина, 1.0 кг суммарных фосфолипидов из семян подсолнечника, 8.8 кг сорбита и 5.0 кг хлороформа в герметически закрывающейся емкости объемом  $0.5 \text{ м}^3$ , снабженной водяной рубашкой. Емкость закрыли герметично и начали откачивать воздух до достижения

вакуума 0.1 атм. Сушку проводили при вакуумировании в течение 5 часов при температуре  $37^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании со скоростью 50 об/мин. В результате получили 10.0 кг сухого мелкодисперсного порошка с влажностью 0.7%.

По 1.0 г порошка, полученного в малом и промышленных объемах, растворяли в 10 мл дистиллированной воды, оба липосомальных препарата представляли собой взвесь моно- и мультимеллярных липосом (фиг. 3 и 4).

Разделили оба препарата на липосомальную и нелипосомальную фракции с помощью гелипроникающей хроматографии. Детекцию проводили при длинах волн 270 нм (липосомальный пик) и 436 нм (пик бета-каротина). В каждом препарате весь бетакаротин был связан с липосомами, о чем свидетельствует полное совпадение на хроматограммах пика бета-каротина (1) и пика липосом (2) (фиг. 5 и 6).

Определили содержание бета-каротина в сухих препаратах, полученных по методикам а) и б) спектрофотометрическим способом (Бета-каротин кристаллический. ТУ 9353-041-00481134-96). Содержание бета-каротина было одинаковым и составляло  $20 \pm 1$  мг на 1 г липосом в каждом препарате.

Таким образом, при масштабировании процесса получения липосомального препарата бета-каротина в 1000 раз получен препарат бета-каротина, аналогичный препарату бета-каротина, полученному в малых объемах, по влажности, содержанию бета-каротина в сухом препарате и по степени включения бета-каротина в липосомы.

Пример 5 (исследование влияния составов фосфолипидов на качество липосомальных препаратов бета-каротина).

С использованием различных образцов фосфолипидов в условиях примера 3а были получены 4 образца липосомального препарата бета-каротина.

В качестве фосфолипидов препараты содержали:

1. Яичный лецитин (препарата N 1).
2. Лецитин, холестерин и додецилфосфат в молярном соотношении 10:2:1 (препарат N 2).

3. Суммарные фосфолипиды из мозга крупного рогатого скота (препарат N 3).

4. Суммарные фосфолипиды из микроорганизмов *E.coli* штамм M-17 (препарат N 4).

Характеристика полученных препаратов приведена в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что состав фосфолипидов не оказывает влияния на качество липосомальных препаратов бета-каротина, т.е. способ является универсальным и для получения препаратов могут быть использованы отдельные фосфолипиды, искусственные смеси фосфолипидов, суммарные фосфолипиды из сырья различного происхождения.

Пример 5 (влияние концентрации фосфолипидов на качество липосомальных препаратов).

В условиях примера 3а были получены 4 образца липосомального препарата бета-каротина с использованием следующих концентраций фосфолипидов по отношению

к органическому растворителю: 4%, 8%, 16%, 32% (вес/объем). (32% является пределом растворимости суммарных фосфолипидов из семян подсолнечника в хлороформе при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Определяли содержание бета-каротина в полученных сухих препаратах сразу после изготовления и степень включения бета-каротина в липосомы.

Результаты анализов представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 показывают, что при использовании практически любых растворов фосфолипидов в пределах их растворимости в органическом растворителе могут быть получены кондиционные липосомальные препараты.

Пример 6 (влияние природы порошкообразных наполнителей на качество липосомальных препаратов).

По методике примера 3а были получены образцы липосомального препарата бета-каротина с использованием различных порошкообразных наполнителей.

Характеристика полученных препаратов приведена в табл. 3.

Данные табл. 3 показывают возможность получения кондиционных липосомальных препаратов при использовании носителей разной природы.

Пример 7 (исследование эффективности липосомальных препаратов биологически активных веществ, лекарств и антигенов при лечении и профилактике различных заболеваний).

По методике примера 3а были приготовлены липосомальные препараты инсулина (100 ED/r), бета-каротина (20 мг/г), интерферона альфа-2 ( $3.0 \cdot 10^6$  ED/r), интерлейкина 1-бета (1 мг/г), интерлейкина-2 (36 млн ED/r) и инактивированной гриппозной вакцины из штамма вируса гриппа A/Nib-31/93/814 (H3N2) (30 мг/г гемагглютинаина).

Исследовали степень включения указанных лекарственных веществ и вирусов в липосомы. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Данные табл. 4 показывают, что предлагаемый способ обеспечивает высокий процент включения ЛС и антигенов в липосомы.

Лечебную и профилактическую эффективность полученных препаратов изучали на моделях диабета (инсулин), гриппозной инфекции (бета-каротин, интерлейкин 1-бета, гриппозная вакцина), индуцированных опухолей (бета-каротин), инфекционного процесса, вызванного вирусом везикулярного стоматита в культуре клеток человека L-41 (интерферон) и в клинических условиях при лечении токсокозов, вызванных цитостатиками при лечении онкологических больных (бета-каротин).

Результаты исследований представлены в табл. 5-11.

Результаты исследования эффективности липосомального препарата инсулина, полученного по предлагаемому способу показали, что полученный препарат обладает хорошей лечебной эффективностью и обеспечивает нормализацию уровня глюкозы в крови животных, больных диабетом, в течение 24 часов после однократного

перорального применения в дозе 2ED на животное. Однократное интраназальное введение липосомального инсулина в дозе 0,2 ED/мышь нормализует уровень глюкозы у животных с диабетом в течение 20 часов после введения. Коммерческий препарат инсулина при пероральном применении в дозах 2ED и 20ED на животное не оказывал действия на снижение уровня глюкозы у экспериментальных животных, больных диабетом.

Липосомальный интерлейкин 1-бета обладает выраженной профилактической эффективностью и при однократном пероральном применении в дозе 100 нг защищает 80-100% животных от летательной гриппозной инфекции. Липосомальный бета-каротин обладает хорошей профилактической эффективностью и при пероральном применении в дозе 0,02 мг в день в течение 5 дней защищает 50-80% животных от смертельного вируса гриппа. Коммерческие нелипосомальные препараты интерлейкина 1-бета и бета-каротина обладают более слабой защитной эффективностью, чем их липосомальные аналоги.

Анализ эффективности иммунизации лабораторных животных липосомальной гриппозной инактивированной вакциной показал, что после пероральной иммунизации мышей вакциной на основе вируса гриппа A/Nib-31/93/814 (H3N2) максимальные титры антител к гомологичному вирусу составляли  $1:42$ . Кроме этого, иммунизация липосомальной вакциной на основе вируса группы A2 (H3N2) приводила к формированию иммунитета и к гетерологичным вирусам группы А (Киев) 3304/84 (H1N1) и A/Ленинград/325/88 (HON1), что свидетельствует о высокой иммуногенности липосомальной вакцины.

Липосомальная гриппозная инактивированная вакцина на основе штамма вируса гриппа A/Nib-31/93/814 (H3N2) обладала выраженной защитой эффективностью и обеспечивала защиту от заражения гетерологичным вирусом гриппа A/PR/8/34/ (HON1).

Результаты профилактического применения липосомального препарата бета-каротина, изготовленного по предлагаемому способу, при индуцированном раке легких у мышей показывают, что профилактическое пероральное применение липосомального бета-каротина обеспечивает уменьшение частоты возникновения злокачественных опухолей, индуцированных канцерогеном уретаном, на 36% и множественности опухолей на 57%, в том числе частоты возникновения и множественности опухолей легких на 37% и 57% и частоты возникновения и множественности прочих опухолей на 21% и 65% соответственно.

Данные по противовирусной активности липосомального препарата интерферона альфа-2 при инфицировании культуры клеток человека L-41 вирусом везикулярного стоматита показывает, что липосомальный интерферон обладает выраженной активностью и инактивирует вирус везикулярного стоматита в культуре клеток в минимальной концентрации 2,4 МЕ интерферона в 1 мл.

Данные клинического изучения эффективности применения липосомального препарата бета-каротина, изготовленного по предлагаемому способу, при лечении осложнений химиотерапии онкологических больных показывают, что применение липосомального бета-каротина в дозе 10 мг три раза в день в течение 30 дней существенно улучшает субъективные и объективные симптомы осложнений комплексной химиотерапии больных раком IV стадии. При применении липосомального бета-каротина наблюдается улучшение аппетита у 56% больных, уменьшение слабости у 28% больных, изменение частоты тошноты и рвоты у 32% больных. Количество лейкоцитов в крови больных, на фоне лечения липосомальным бета-каротином, увеличивается на 50% при умеренной лейкопении и на 44% при выраженной лейкопении. У больных уменьшаются случаи анемии (на 29%) и тромбоцитопении (на 20%). Через 30 дней после применения липосомального бета-каротина больные поправились в среднем на 1.8 кг.

Данные представленные в примерах, показывают, что предлагаемый способ

значительно упрощает и удешевляет приготовление липосомальных препаратов, содержащих различные типы БАВ и других ЛС, обеспечивает высокий процент включения их в липосомы и создает возможность масштабирования процесса в промышленном производстве.

Лекарственные и вакцинные препараты, изготовленные по предлагаемому способу, обладают высокой лечебной и профилактической активностью при различных заболеваниях.

#### Формула изобретения:

1. Способ получения липосомальных препаратов на основе смешивания в емкости биологически активного вещества, фосфолипидов и растворителя, отличающийся тем, что в смесь дополнительно вводят порошкообразный наполнитель и после достижения однородности массы растворитель при перемешивании отгоняют в условиях пониженного давления.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что фосфолипиды и растворитель вводят в емкость в виде раствора.

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Влияние состава фосфолипидов на содержание и степень включения бета-каротина в липосомы

| Препарат бета-каротина | Содержание бета-каротина в сухом порошке (мг/г) | Степень включения бета-каротина в липосомы (%) |
|------------------------|---|--|
| 1                      | 20±2  | 100  |
| 2                      | 20±1  | 100  |
| 3                      | 20±1  | 100  |
| 4                      | 20±1  | 100  |

Таблица 2.

Влияние концентрации фосфолипидов на качество липосомальных препаратов

| Концентрация фосфолипидов в растворителе (% в/об) | Содержание бета-каротина в препарате (мг/г) | Степень включения бета-каротина в липосомы (%) |
|---|---|--|
| 4   | 20±1  | 100  |
| 8   | 20±1  | 100  |
| 16  | 20±1  | 100  |
| 32  | 20±1  | 100  |

Таблица 3

Влияние природы порошкообразных наполнителей на качество липосомальных препаратов

| Наполнитель         | Содержание бета-каротина в препарате (мг/г) | Степень включения бета-каротина в липосомы |
|---------------------|---|--|
| Глюкоза             | 20±2  | 100  |
| Лактоза             | 20±1  | 100  |
| Ксилит              | 20±1  | 100  |
| Маннит              | 20±1  | 100  |
| Декстран Т-20       | 20±1  | 100  |
| Поливинилпирролидон | 20±2  | 100  |
| Поливиниловый спирт | 20±1  | 100  |
| Поваренная соль     | 20±2  | 100  |
| Сорбит              | 20±1  | 100  |

RU 2130771 C1

RU 2130771 C1

Таблица 4.

Степень включения лекарственных веществ и антигенов в липосомы.

| ЛС или антиген        | Степень включения в липосомы, % | Методика определения   |
|-----------------------|---------------------------------|--|
| Инсулин               | 85-95                           | Биологический и химический методы по ВФС-42-2150-95  |
| Интерлейкин-1-бета    | 78-82                           | Иммуноферментный метод по методике Котов А.Ю. и др., Иммунология, 1993,4,с.41-44                           |
| Интерлейкин-2         | 80-85                           | Биологические методы по методике Gillis S. et al. J.Immunol., 1978, 120, p.2027-2032                       |
| Интерферон-альфа-2    | 78-83                           | Биологический метод по методике: Калинин Ю.Т. и др., Ж. Микробиол. Эпидемиолог. Иммунобиол., 1985,10,с.3-7 |
| Бета-каротин          | 100                             | Спектрофотометрический метод по ТУ-9353-041-00481136-96  |
| Антиген вируса гриппа | 65-70                           | Иммуноферментный метод по методике Фримель Г. Иммунологические методы, М., 1987, с. 164-170                |

RU 2130771 C1

RU 2130771 C1



Влияние перорального применения липосомальных препаратов интерлейкина 1-бета и бета-каротина на течение экспериментальной гриппозной инфекции A/Aichi/2/68 (H3N2) у мышей

| Препарат и режим введения.  | Доза вируса (LD <sub>50</sub> ) | Выживаемость (%) |
|---|---------------------------------|------------------|
| Контрольная группа  | 1                               | 50±8             |
|   | 10                              | 10±2             |
| Водорастворимый бета-каротин фирмы Hoffmann La Roche 0,02 мг в день -5 дней | 1                               | 40 ± 8           |
|   | 10                              | 20 ± 7           |
| Липосомальный бета-каротин перорально по 0,02 мг в день - 5дней             | 1                               | 80 ± 9           |
|   | 10                              | 50 ± 6           |
| Липосомальный интерлейкин 1- бета перорально 100 нг однократно              | 1                               | 100 ± 10         |
|   | 10                              | 80 ± 7           |
| Интерлейкин 1-бета перорально 100 нг однократно                             | 1                               | 70 ± 5           |
|   | 10                              | 60 ± 7           |

Таблица 6

Титры сывороточных антител после трехкратной иммунизации мышей липосомальной гриппозной инактивированной вакциной A/Nib -31/93/1814 (H3N2)

| Группа животных                                    | Кол-во животных | Титры антител к указанным вирусам гриппа (обратные величины) через 3 недели после последней вакцинации |       |      |     |      |      |
|--|-----------------|--|-------|------|-----|------|------|
|  |                 | 1*   | 2*    | 3*   | 4*  | 5*   | 6*   |
| Иммунизированные липосомальной гриппозной вакциной | 20              | <10  | 45±28 | 10±4 | <10 | 17±4 | 42±8 |
| Контрольная группа                                 | 20              | <10  | <10   | <10  | <10 | <10  | <10  |

- \* 1 - В/Харбин/7/94; 2-А/Киев/3304/84 (H0N1);  
 3 - А/Ленинград/325/88 (H1N1); 4-А/Ленинград/549/80 (H3N2);  
 5 - А/Киев/301/94 (H3N2); 6-А/Nib - 31/93/814 (H3N2)

Таблица 7

Защитный эффект липосомальной инактивированной гриппозной вакцины A/Nib-31/93/814 (H3N2) при заражении мышей вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1)

| Группа животных                                    | Кол-во животных | Количество мышей из легких которых выделили вирус гриппа после заражения |    | Защитная эффективность (%) |
|--|-----------------|--|----|----------------------------|
|  |                 | абс  | %  |                            |
| Иммунизированные липосомальной гриппозной вакциной | 10              | 0  | 0  | более 70                   |
| Контрольная группа                                 | 11              | 8  | 73 |                            |

Таблица 8

Влияние перорального применения липосомального препарата бета-каротина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей

| Группа животных                                       | Кол-во животных          | Частота, количество и множественность опухолей |                             |                             |
|---|--------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
|   |                          | всех   | легких                      | прочих                      |
| Уретан контрольная группа                             | 59                       | 56 (95%)<br>460<br>7.8±1.33                    | 47 (80%)<br>430<br>7.3±1.4  | 23 (39%)<br>30<br>0.5±0.1   |
| Уретан+ липосомальный бета-каротин                    | 56                       | 33 (59%)<br>186<br>3.3±0.8                     | 24 (43%)<br>176<br>3.1±1.4  | 10 (18%)<br>10<br>0.5±0.1   |
| Эффективность применения липосомального бета-каротина | Частота опухолей         | уменьшение на 36%                              | уменьшение на 36%           | уменьшение на 21%           |
|   | Множественность опухолей | уменьшение на 57%<br>p<0.01                    | уменьшение на 57%<br>p<0.01 | уменьшение на 65%<br>p<0.01 |
|   | Достоверность            |  |                             |                             |

RU 2130771 C1

RU 2130771 C1

Таблица 9

Эффективность интраназального и перорального применения липосомального препарата инсулина при лечении экспериментального диабета лабораторных животных

| Препарат<br>инсулина            | Метод<br>применения | Доза<br>на мышь<br>(ED) | Уровень глюкозы в крови мышей (mmol) после введения препаратов инсулина |                 |              |                  |                |                |               |                 |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|---|-----------------|--------------|------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
|                                 |                     |                         | Исходный  |                 | Через 3 часа |                  | Через 20 часов |                | Через 24 часа |                 |
|                                 |                     |                         | абс   | %*              | абс          | %*               | абс            | %*             | абс           | %*              |
| Здоровые интактные животные     |                     |                         |   |                 |              |                  |                |                |               |                 |
| -                               | -                   | -                       | 3.85±0.24   | 100±6           | НИ**         | НИ               | НИ             | НИ             | 3.35±0.42     | 87±13           |
| Животные с алloxановым диабетом |                     |                         |   |                 |              |                  |                |                |               |                 |
| Без лечения                     | -                   | -                       | 8.75±0.39   | 100±5<br>227±11 | НИ           | НИ               | НИ             | НИ             | 8.87±0.58     | 101±7<br>230±34 |
| Коммерческий<br>инсулин         | перорально          | 2                       | 8.75±0.39   | 100±5<br>227±11 | 11.4±1.13    | 130±10<br>296±29 | НИ             | НИ             | НИ            | НИ              |
| Коммерческий<br>инсулин         | перорально          | 20                      | 8.75±0.39   | 100±5<br>227±11 | 7.84±0.64    | 90±8<br>204±22   | НИ             | НИ             | НИ            | НИ              |
| Липосомальный<br>инсулин        | перорально          | 2                       | 8.75±0.39   | 100±5<br>227±11 | 4.76±0.22    | 54±2<br>123±5    | 5.12±0.77      | 59±5<br>133±15 | 3.49±0.13     | 40±2<br>91±4    |
| Липосомальный<br>инсулин        | интрана-<br>зально  | 0.2                     | 8.75±0.39   | 100±5<br>227±11 | 3.7±0.43     | 42±5<br>96±11    | 6.18±0.85      | 71±5<br>160±14 | 10.0±0.67     | 114±16<br>270±7 |

\* В знаменателе процент содержания глюкозы по отношению к содержанию глюкозы в крови здоровых интактных животных

\*\* Не исследовали

Таблица 10

Эффективность клинического применения липосомального препарата бета-каротина при лечении осложненной химиотерапии онкологических больных

| Группа больных   | Кол-во больных | Период наблюдения           | Субъективные симптомы  |                         |                                | Объективные симптомы                                     |            |                      |                      | Прибавка в весе (кг) |
|--|----------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|--|------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|  |                |                             | Улучшение аппетита (%) | Уменьшение слабости (%) | Уменьшение тошноты и рвоты (%) | Количество лейкоцитов в крови больных ( $\times 10^9$ л) | Анемия (%) | Тромбоцитопения, (%) | Прибавка в весе (кг) |                      |
|  |                |                             |                        |                         |                                |  |            |                      |                      |                      |
| Рак IV стадии, комплексная химиотерапия  | 21             | до лечения                  | 0                      | 0                       | 0                              | 4,5 (100%)   | 2,3 (100%) | 17 (100%)            | 16 (100%)            | 0                    |
|  |                | через 30 дней после лечения | 0                      | 0                       | 0                              | 3,8 (-16%)   | 1,6 (-31%) | 21 (+24%)            | 21 (+31%)            | 0                    |
| Рак IV стадии, комплексная химиотерапия + липосомальный бета-каротин (10мгх 3 р в день- 30 дней) | 32             | до лечения                  | 0                      | 0                       | 0                              | 4,2 (100%)   | 2,7 (100%) | 28 (100%)            | 25 (100%)            | 0                    |
|  |                | через 30 дней после лечения | 56                     | 28                      | 32                             | 6,3 (+50%)   | 3,9 (+44%) | 20 (-29%)            | 20 (-20%)            | 1,8                  |

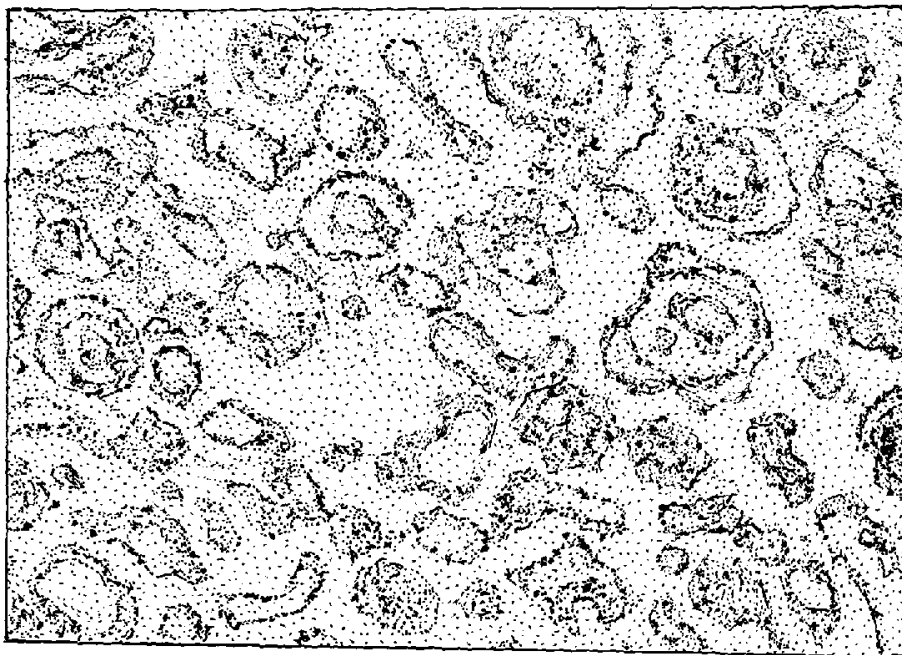
Таблица 11

Противовирусная активность липосомального интерферона альфа-2 при инфицировании культуры клеток человека L-41 вирусом везикулярного стоматита

| Культура клеток L-41  | Размножение вируса везикулярного стоматита (ВВС) при инфицировании культуры клеток человека L-41 при указанных концентрациях липосомального интерферона альфа-2 (МЕ/мл) |      |      |      |     |     |     |     |     |
|---|---|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 153.6   | 76.8 | 38.4 | 19.2 | 9.6 | 4.8 | 2.4 | 1.2 | 0.6 |
| Опытная, зараженная вирусом везикулярного стоматита + липосомальный интерферон альфа-2                  | -*  | -    | -    | -    | -   | -   | -   | +++ | +   |
| Контрольная, зараженная вирусом везикулярного стоматита без введения липосомального интерферона альфа-2 | +   | +    | +    | +    | +   | +   | +   | +   | +   |

\* - Вирус везикулярного стоматита не обнаружен

\*\* + Выделен вирус везикулярного стоматита

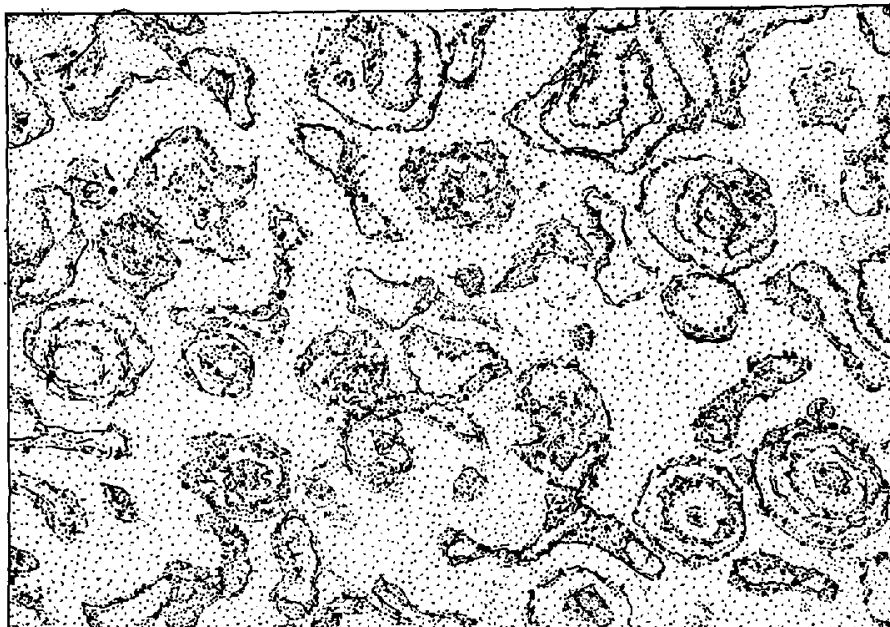


фиг. 1

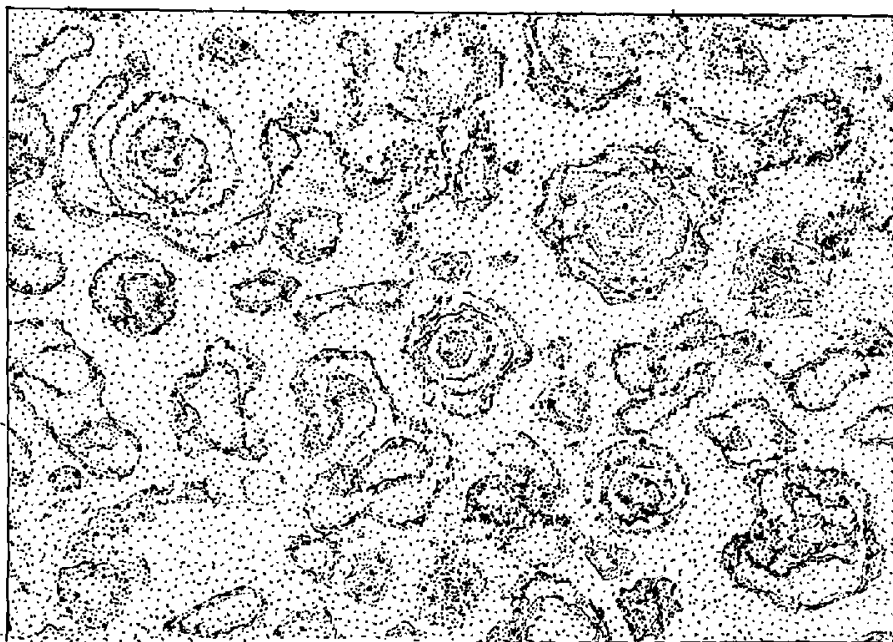
RU 2130771 C1

RU 2130771 C1

RU 2130771 C1

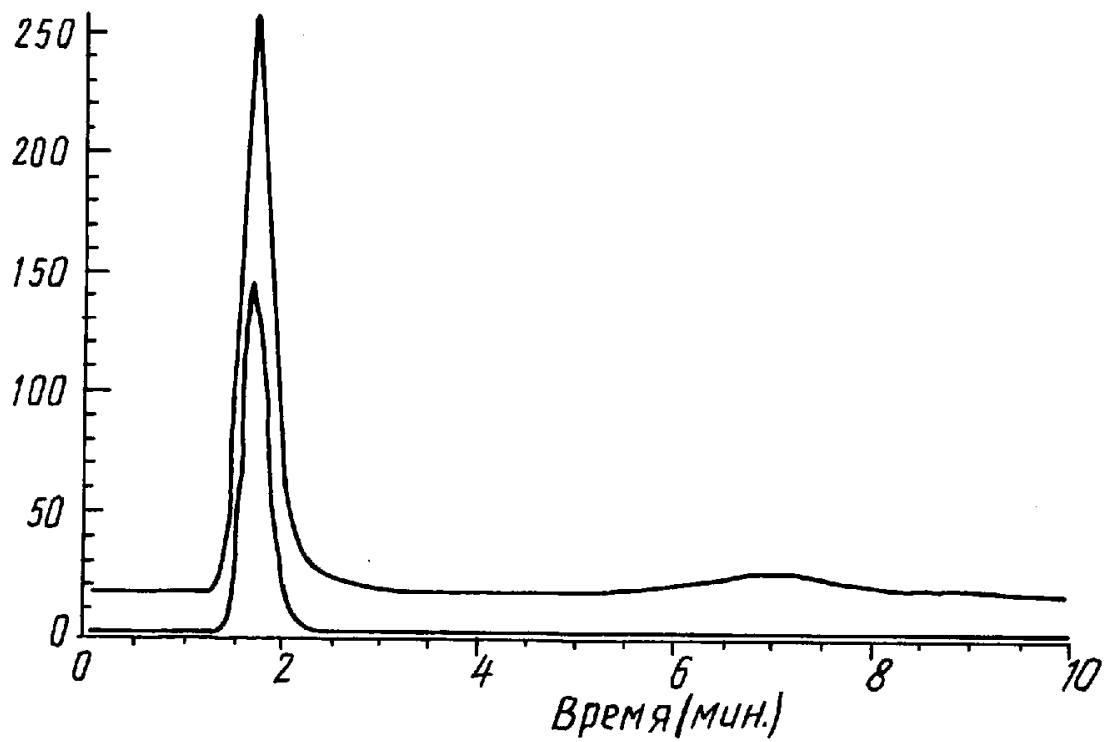


фиг.3

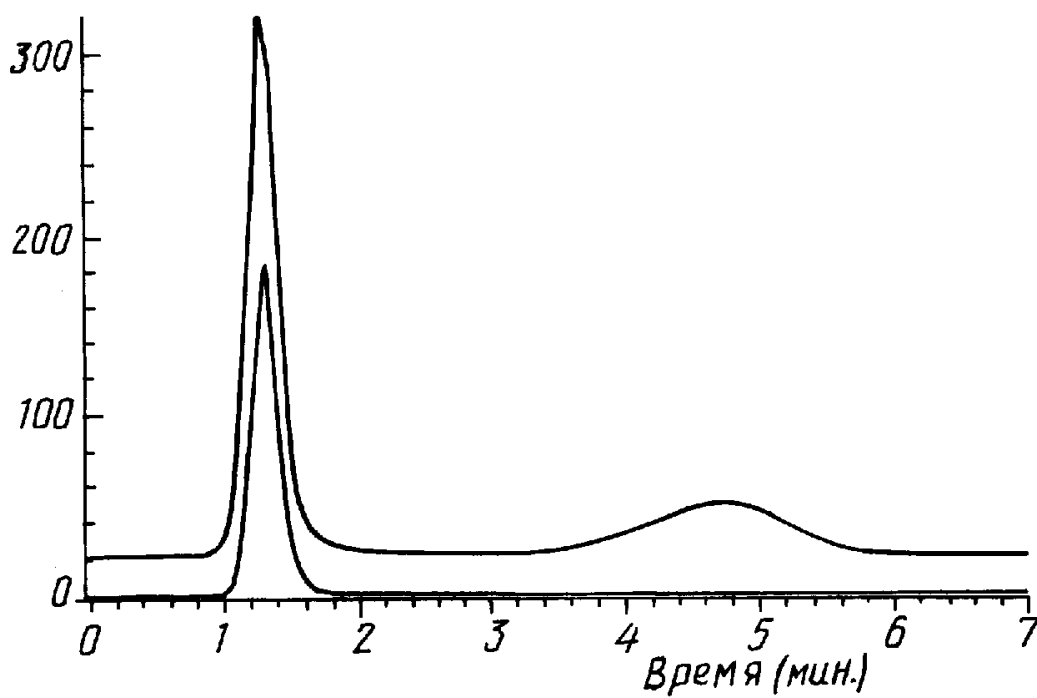


фиг.4

RU 2130771 C1



Фиг.5



Фиг.6

RU 2130771 C1

RU 2130771 C1