

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

015247

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2011.06.30**

(21) Номер заявки: **200802350**

(22) Дата подачи: **2008.12.18**

(51) Int. Cl. *A61K 47/20* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

(31) PCT/SE2007/001127

(32) 2007.12.19

(33) WO

(43) 2009.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРДЕНИЯ ИНВЕСТМЕНТС, ЛТД. (GB)

(56) US-B2-7030158
WO-A-2004/009538
RU-C2-2210364
US-A1-20040048923
WO-A1-02092600

(72) Изобретатель:
Алексов Джулиан, Локот Игорь (SE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к системе доставки лекарства для введения плохо растворимого в воде фармацевтически активного вещества, фармацевтической композиции, которая содержит указанную систему доставки лекарства, и способу получения указанной системы доставки лекарства. Настоящее изобретение также относится к способу контроля размера частиц, и/или формы частиц, и/или распределения частиц по размерам в указанной системе доставки лекарства и к способу увеличения нагрузки лекарством указанных частиц. Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению указанной системы доставки лекарства при получении лекарственного средства для лечения рака.

B1

015247

015247

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к системе доставки лекарства для введения плохо растворимых в воде фармацевтически активных веществ, фармацевтической композиции, включающей указанную систему доставки лекарства, и способу получения указанной системы доставки лекарства. Также настоящее изобретение относится к способу контроля размера частиц, и/или формы частиц, и/или распределения частиц по размерам в указанной системе доставки лекарства и к способу увеличения способности частиц нести лекарство. Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению указанной системы доставки лекарства для производства лекарственного средства для лечения рака.

Предпосылки изобретения

В фармацевтической и других родственных отраслях промышленности существует острая потребность в разработке способов получения препаратов в форме составов для перорального, инъекционного, ингаляционного, глазного и других путей введения на основе промышленно применимых не растворимых в воде или плохо растворимых в воде веществ. Промышленно применимые не растворимые в воде или плохо растворимые в воде вещества включают не растворимые в воде или плохо растворимые в воде биологически применимые соединения, контрастные агенты, фармацевтически применимые соединения, в частности не растворимые в воде или плохо растворимые в воде лекарственные препараты для лечения человека и ветеринарного применения.

При этом отсутствуют какие-либо ограничения, накладываемые на разновидности не растворимых в воде или плохо растворимых в воде веществ, которые можно применять согласно настоящему изобретению. Примеры указанных веществ включают антипиретики, противовоспалительные средства, анальгетики, транквилизаторы, седативные средства, противоопухолевые средства, противомикробные средства, антибиотики, антилипемические средства, противокашлевые/отхаркивающие, миорелаксанты, противоэпилептические средства, противоязвенные средства, антидепрессанты, противоаллергические средства, кардиотоники, противоаритмические средства, сосудорасширяющие средства, гипотензивные/диуретические средства, средства для лечения диабета, туберкулостатические средства, противоревматические средства, стероиды, антагонисты наркотических препаратов, гормоны, жирорастворимые витамины, антикоагулянты, средства для лечения ишемических заболеваний, средства для лечения иммунных заболеваний, средства для лечения болезни Альцгеймера, средства для лечения остеопороза, средства для лечения ангиопоза, средства для лечения ретиноза, средства для лечения окклюзии вены сетчатки, старческой дисковидной дегенерации желтого пятна, средства для лечения спазмов сосудов головного мозга, средства для лечения тромбоза сосудов головного мозга, средства для лечения церебрального инфаркта, средства для лечения непроходимости сосудов головного мозга, средства для лечения кровоизлияния в мозг, средства для лечения субарахноидального кровоизлияния, средства для лечения гипертонической энцефалопатии, средства для лечения преходящего ишемического нарушения мозгового кровообращения, средства для лечения мультиинфарктной деменции, средства для лечения артериосклероза, средства для лечения болезни Гентингтона, средства для лечения нарушений в мозговой ткани, средства для лечения нейропатии оптического нерва, средства для лечения глаукомы, средства для лечения повышенного внутриглазного давления, средства для лечения отслойки сетчатки, средства для лечения артритов, антисептические лекарства, лекарства против септического шока, противоастматические лекарства, средства для лечения учащенного мочеиспускания/недержания, средства для лечения атопического ринита, средства для лечения аллергического ринита, косметические композиции, агрохимические композиции, инсектициды, бактерицидные средства, гербициды, напитки или пищевые композиции, иммунодепрессанты и лекарственные композиции для животных.

Тот факт, что только водорастворимые вещества можно вводить внутривенно, существенно обедняет ассортимент органических молекул, которые можно применять в качестве противоопухолевых лекарств, поскольку многие, если не большинство из них, плохо растворимы в воде.

Включение в указанные вещества полярных функциональных групп не решает указанную проблему, поскольку изменения структуры приводят к потере присущих указанным лекарствам фармакологических свойств.

Разработка систем доставки лекарства, способных обеспечить растворение плохо растворимых соединений в водных растворах, была бы чрезвычайно полезна при попытках реализовать противораковый потенциал огромного числа веществ и могла бы сделать возможным создание новых поколений лекарств.

Паклитаксел и доцетаксел принадлежат к противораковым лекарствам класса таксанов, поскольку эти препараты или их предшественники получают из растений рода *Taxus* (тис). Паклитаксел все еще получают путем выделения из природных источников, тогда как доцетаксел, полусинтетический аналог паклитаксела, синтезируют из 10-дезацетил баккатина. Паклитаксел отличается от доцетаксела ацетилированной гидроксильной группой в положении 10 и бензоильным, а не трет-бутильным остатком в боковой цепи фенилпропионата. Механизм действия таксанов основан на их способности связывать β -субъединицу тубулина, что препятствует деполимеризации микротрубочек, таким образом повреждая делящиеся клетки. Указанную специфичность действия широко применяют в онкологии для лечения различных солидных опухолей, в частности рака яичников, легких, груди, мочевого пузыря, головы и

шеи.

Паклитаксел и доцетаксел обладают плохой пероральной биодоступностью и поэтому внутривенная (в/в) инфузия является для них единственным путем введения. Недостаточная растворимость в воде также делает невозможным использование водных растворов указанных таксанов. Для решения указанной проблемы применяли некоторые носители.

Таксол® основан на способности Кремофора® EL, полиэтиоксилированного касторового масла, растворять паклитаксел в весовом соотношении (вес./вес.) 87:1. Хронологически это первый промышленный таксановый состав, открывший эпоху применения таксанов в онкологии. Однако позже было обнаружено, что Кремофор® является причиной аллергических реакций в процессе инфузии Таксола®, и для минимизации частоты и тяжести указанных реакций общепринятой практикой стала премедикация гистаминовыми блокаторами и глюкокортикоидами, а также непрерывные схемы инфузий.

Во второй системе доставки, называемой Таксотер®, роль носителя играет Полисорбат 80 (известный под торговой маркой Твин® 80), производное полиэтиоксилированного сорбита и олеиновой кислоты. В данном случае весовое соотношение составляет 24:1. Подобно Кремофору® EL Полисорбат 80 представляет собой неионогенный детергент, образованный полиэтиоксилированными цепями, и также может вызывать аллергические реакции.

Абраксан®, третья система доставки, состоит из наночастиц паклитаксела, стабилизированных альбумином сыворотки крови человека в весовом соотношении 9:1, со средним диаметром наночастиц 130 нм. Отсутствие неионогенных поверхностно-активных веществ упрощает лечение, премедикации не требуется, и время инфузий сокращается. С другой стороны, состав Абраксан® обладает меньшей эффективностью, чем Таксол®, поскольку наночастицы Абраксана®, как и другие частицы с размером более 100 нм, являются субстратом для ретикулоэндотелиальной системы. Другим недостатком указанного носителя для доставки лекарства является то, что применяют сывороточный альбумин человека, который выделяют из крови доноров, что всегда несет малый, но определенный риск передачи вирусных заболеваний.

Наконец, было обнаружено, что паклитаксел и доцетаксел могут быть растворены в водных растворах водорастворимых производных ретиноевой кислоты, действующих как анионогенные поверхностно-активные вещества. Уникальность структуры указанных производных дает им возможность растворять паклитаксел и доцетаксел в удивительно низком весовом соотношении 0,5:1.

Иксабепилон (аналог эптоилона В) очень похож на таксаны с точки зрения способа действия и растворимости в водных растворах. Он показан для лечения метастазирующего или локально прогрессирующего рака груди. Состав для в/в введения иксабепилона, иксемпра, разработанный BMS, как и Таксол, основан на Кремофоре EL и таким образом требует премедикации и пролонгированной инфузии для уменьшения аллергических реакций.

Этопозид, аналог токсина подофиллотоксина, представляет собой ингибитор топоизомеразы II и используется для лечения саркомы Юинга, рака легкого, рака яичка, лимфомы и нелимфоцитарной лейкемии. Составы для в/в введения этопозиды основаны на производных ПЭГ, таких как Полисорбат 80 (Твин 80) или Макрогол 300 для растворения недостаточно плохо растворимого в воде активного фармацевтического компонента.

Ретиноиды представляют собой семейство полиизопреноидов, которое включает витамин А (ретинол) и его природные (ретиноевая кислота) и синтетические аналоги (фенретинид, этретинат, тазаротен, бексаротен, адапален). Указанные соединения демонстрируют широкий спектр биологической активности, включая участие в контроле пролиферации клеток, дифференцировке клеток и эмбриональном развитии, что дает возможность применять ретиноиды в качестве противоопухолевых средств для лечения различных видов рака, таких как лейкемия, лимфома, саркома Капоши, рак легких и рак груди. Указанные соединения также применяют для лечения различных заболеваний кожи, таких как псориаз, акне и солнечные ожоги кожи. Ретиноиды обычно представляют собой высоколипофильные соединения, и их применение в виде водных растворов требует применения определенных систем доставки. Однако до сих пор не существует каких-либо промышленно разработанных водорастворимых составов ретиноидов и они доступны исключительно для перорального введения.

Циклоспорин, сиролimus, такролимус и эверолимус представляют собой иммунодепрессанты, которые плохо растворимы в воде. Биодоступность указанных лекарств при пероральном введении составляет всего лишь около 20%. Коммерчески доступные составы указанных иммунодепрессантов основаны исключительно на применении полиэтиоксилированного касторового масла, которое при внутривенном введении вызывает аллергические реакции.

Циклоспорин (Ciclosporin, Cyclosporine, Cyclosporin) представляет собой лекарство-иммунодепрессант, широко применяемое при посталлогенной трансплантации органов для снижения активности иммунной системы пациента и таким образом риска отторжения органа. Он был изучен при трансплантации кожи, сердца, почек, печени, легких, поджелудочной железы, костного мозга и тонкого кишечника. Первоначально выделенный из образца норвежской почвы циклоспорин А, основная форма лекарства, представляет собой циклический нерибосомный пептид из 11 аминокислот (ундекапептид), произво-

димый грибом *Tolypocladium inflatum* Gams и содержащий D-аминокислоты, которые редко встречаются в природе.

Выявление и разработка новых систем доставки лекарств усилились с пониманием того факта, что лекарства в слишком высоких концентрациях являются токсичными и в лучшем случае неактивными в слишком низких концентрациях; однако воздействие на клетки слишком низких концентраций лекарств часто активирует механизмы устойчивости к лекарству. Диапазон концентраций, в котором лекарство вызывает желаемый ответ при отсутствии побочных эффектов, известен как "терапевтическое окно".

Доказано, что пролонгированная инфузия снижает токсичность противораковых средств, но указанный способ введения обладает значительно большими трудностями с практической точки зрения.

Обнаружено, что медленное высвобождение лекарств может быть достигнуто путем использования лекарств, связанных с или включенных в наночастицы различного вида. Указанные частицы могут циркулировать в крови в течение нескольких дней, играя роль "депо". Высвобождение лекарства осуществляется путем диффузии включенного лекарства или при разрушении и распаде частиц. Наиболее популярными типами наночастиц в данной области исследований являются мицеллы и липосомы, поскольку образование указанных наночастиц представляет собой достаточно простой процесс, происходящий определяемый энтропией, т.е. они возникают самопроизвольно и их свойства определяются условиями образования. Размер частиц, применяемый в указанных системах доставки, находится в диапазоне от 8 до 200 нм и даже выше.

Однако с увеличением размера частицы становятся "видимыми" для ретикулоэндотелиальной системы, части иммунной системы, включающей фагоцитарные клетки, локализованные в ретикулярной соединительной ткани лимфатических узлов, печени и селезенки. Степень клиренса с участием ретикулоэндотелиальной системы увеличивается с размером частиц, значительно снижая общее количество лекарства в кровотоке.

Другим интересным открытием в области доставки лекарств является нацеливание лекарства в область воздействия, что могло бы повысить терапевтическую эффективность до предельных уровней. Было обнаружено, что наночастицы весьма полезны в этом отношении. Солидные опухоли патологически отличаются от здоровых тканей по обширному ангиогенезу, а также по сверхпроницаемой и нарушенной структуре сосудистой сети. Другими словами, размер капилляров в опухоли больше, что делает потенциально возможным значительное увеличение пассивного транспорта наночастиц, несущих цитотоксичную нагрузку, в опухоль по сравнению со здоровым эндотелием.

US 2004048923 описывает группу ретиноидов, включая, в числе прочих, натриевую соль метилового эфира N-(полностью-трансретиноил)-N-цистеиновой кислоты и натриевую соль метилового эфира N-(13-цис-ретиноил)-N-цистеиновой кислоты. Установлено, что указанные вещества делают возможным производство новых мицеллярных составов плохо растворимых фармацевтических соединений, подобных паклитакселу и доцетакселу.

WO 02092600 относится к способу получения водорастворимого состава паклитаксела, включающему стадии растворения паклитаксела в первом растворителе, растворении соединения, выбранного из N-(полностью-трансретиноил)-L-цистеиновой кислоты, N-(13-цис-ретиноил)-L-цистеиновой кислоты, N-(полностью-трансретиноил)-L-гомоцистеиновой кислоты, N-(13-цис-ретиноил)-L-гомоцистеиновой кислоты, N-(полностью-трансретиноил)-L-цистеин сульфоновой кислоты и N-(13-цис-ретиноил)-L-цистеин сульфоновой кислоты, во втором растворителе, смешивание аликвот полученных растворов паклитаксела и указанного соединения в выбранном молярном соотношении и выпаривание полученной смеси досуха.

Хотя плохая растворимость фармацевтических соединений позволяет предположить, что они находятся в виде частиц, как US 2004048923, так и WO 02092600 не содержат сведений о размере и морфологии указанных частиц. В частности, отсутствуют признаки или предположения, что они должны находиться в аморфном состоянии или даже что они могут существовать в таком состоянии.

Также совершенно не раскрыт ни один из путей получения частиц в подобном состоянии. Как хорошо известно специалистам в данной области, полиморфизм, включая, возможно, аморфное состояние, для органических веществ в основном не прогнозируем.

Краткое описание изобретения

Создание новой системы доставки лекарства с контролируемым или заранее программируемым высвобождением лекарства, имитирующим пролонгированное введение, было бы крайне желательным.

Одной из задач настоящего изобретения является обеспечение указанной системы доставки лекарства.

Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения относится к системе доставки лекарства для введения по меньшей мере одного фармацевтически активного вещества, имеющего собственную растворимость в воде менее примерно 100 мкг/мл, причем указанное вещество находится в виде частиц с эффективным средним размером частиц менее 100 нм, причем указанные частицы вещества являются, по существу, аморфными; указанные частицы вещества заключены в наночастицы, образованные натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием; и весовое соотношение указанной

натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу находится в диапазоне от 0,5:1 до 20:1.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение будет описано более подробно в последующем описании, примерах и приложенных чертежах, на которых

на фиг. 1 показана зависимость размера частиц от весового соотношения натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты к паклитакселу для различных концентраций паклитаксела в водном растворе хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл;

на фиг. 2 - зависимость размера частиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты и доцетакселом (весовое соотношение 1:1) от концентрации хлорида натрия для различных концентраций доцетаксела;

на фиг. 3 - зависимость размера частиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и паклитакселом (весовое соотношение паклитаксела к метиловому эфиру N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты составляет 1:2) от концентрации хлорида кальция в водном растворе хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл;

на фиг. 4 и 5 - изменения со временем размера частиц и Z-потенциала состава, полученного путем восстановления высушенной замораживанием смеси паклитаксела, натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:0,75:0,75 в водном растворе хлорида натрия (9 мг/мл), хлорида кальция (2 ммоль/л) и хлорида магния (1 ммоль/л);

на фиг. 6 и 7 - изменения со временем размера частиц и Z-потенциала состава, полученного путем восстановления высушенной замораживанием смеси доцетаксела и натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:2 в водном растворе хлорида натрия (9 мг/мл) и хлорида кальция (3 ммоль/л);

на фиг. 8 - сравнительная оценка цитотоксичности составов, образованных смесью доцетаксела с натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:1:1) в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3;

на фиг. 9 - сравнительная оценка цитотоксичности составов, образованных смесью паклитаксела с натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75) в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3;

на фиг. 10 - зависимость размера частиц от весового соотношения натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты к циклоспоринолу А при различных концентрациях циклоспоринолу А в водном растворе хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл.

Описание вариантов реализации настоящего изобретения

Прежде чем приступить к раскрытию и описанию настоящего изобретения, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено конкретными конфигурациями, стадиями процесса и материалами, раскрытыми в настоящем описании, поскольку конфигурации, стадии процесса и материалы можно до некоторой степени варьировать. Также следует понимать, что применяемая в настоящем документе терминология применяется только с целью описания конкретных вариантов реализации и не предназначена служить ограничением, поскольку объем настоящего изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Следует также отметить, что используемые в настоящем описании и в формуле изобретения формы единственного числа включают указания на множественное число, если контекст четко не предписывает иного.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "примерно", определяющий количество компонента в системах доставки лекарства или в композициях согласно настоящему изобретению или применяемый в способах согласно настоящему изобретению, относится к изменению численной величины, которое можно наблюдать, например, при обычных методиках измерения и обращения с жидкостями, применяемыми для приготовления концентратов или применения растворов в реальной действительности; из-за непреднамеренной ошибки в указанных методиках; из-за различий в производстве, источнике или чистоте компонентов, которые применяют для приготовления систем доставки лекарства или композиций, или выполнения способа согласно настоящему изобретению и тому подобное. Термин "примерно" также охватывает количества, отличающиеся из-за различных состояний равновесия для композиции, получающейся из конкретной исходной смеси. Определенная или не определенная термин "примерно" формула изобретения включает эквиваленты приведенным количествам.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "система доставки лекарства" относится к составу или устройству, вводящему лечебное средство(а) в выбранное место(а) организма и/или обеспечивающее своевременное высвобождение лечебного средства(средств).

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "размер частиц" относится к

Z-среднему диаметру, измеренному при помощи динамического рассеяния света с использованием красного лазера с длиной волны 633 нм. "Эффективный средний размер частиц менее примерно 100 нм" означает, что по меньшей мере 90% частиц имеют размер менее чем примерно 100 нм согласно измерениям при помощи вышеупомянутой методики.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "наночастица" относится к микроскопической частице, размер которой измеряется в нанометрах. Наночастицы согласно настоящему изобретению обычно имеют диаметр в диапазоне примерно от 1 до 999 нм и могут включать связанную, инкапсулированную или внедренную биологически активную молекулу.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "растворимость" вещества относится к способности указанного вещества растворяться в определенном растворителе при комнатной температуре, под которой подразумевают температуру между примерно 15°C и примерно 38°C.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, предполагается, что термин "аморфный" указывает на твердую структуру, которая либо является некристаллической, либо состоит из очень маленьких кристаллов, имеющих размер примерно 10 нм или менее.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "цитотоксическое соединение" относится к соединению, которое обладает способностью останавливать рост клеток или убивать клетки.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "цитостатическое соединение" относится к соединению, обладающему способностью приводить клетки, хотя и не обязательно лизированные или убитые, в постоянное непролиферирующее состояние.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "иммунодепрессант" относится к соединению, обладающему способностью ингибировать активность иммунной системы, в частности, для предотвращения отторжения трансплантированного органа и при нарушениях, при которых иммунная система организма атакует его собственные ткани.

Согласно настоящему описанию, если не определено иначе, термин "производное" относится к соединению, полученному из исходной структуры или непосредственно путем химической реакции с участием исходной структуры, или путем "модификации", представляющей собой частичное замещение исходной структуры, или путем разработки и синтеза *de novo*. Производные могут быть синтетическими или могут представлять собой продукты метаболизма в клетке или в ферментативной реакции *in vitro*.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения частицы вещества в системе доставки лекарства согласно настоящему изобретению имеют эффективный средний размер частицы менее 50 нм.

Согласно другому варианту реализации частицы вещества в системе доставки лекарства согласно настоящему изобретению имеют эффективный средний размер частицы в диапазоне примерно 5-50 нм.

Согласно другому варианту реализации частицы вещества в системе доставки лекарства согласно настоящему изобретению имеют эффективный средний размер частицы в диапазоне примерно 8-30 нм.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения весовое соотношение натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к фармацевтически активному веществу находится в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 10:1.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения фармацевтически активное вещество представляет собой цитотоксическое или цитостатическое соединение; согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой бис-хлорметилнитрозомочевину (Кармустин); согласно другому аспекту настоящего варианта реализации указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой этопозид; согласно другому аспекту настоящего варианта реализации указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой таксан и согласно более конкретному аспекту указанный таксан выбирают из паклитаксела, доцетаксела и их производных. Согласно другому конкретному аспекту указанного варианта реализации настоящее изобретение относится к описанной системе доставки лекарства для применения при лечении рака.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения фармацевтически активное вещество представляет собой иммунодепрессант; согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации указанный иммунодепрессант выбирают из циклоспорина, сиролимуса, такролимуса и их производных. Согласно другому аспекту указанного варианта реализации настоящее изобретение относится к описанной системе доставки лекарства для применения при посталлогенной трансплантации органа.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и систему доставки лекарства указанного вида. Согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации фармацевтически активное вещество представляет собой цитотоксическое или цитостатическое соединение; согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой бис-хлорметилнитрозомочевину (Кармустин); согласно другому аспекту настоящего варианта реализации указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой этопозид; согласно другому аспекту настоящего варианта реализации указанное соединение представляет собой

таксан, который можно выбирать из паклитаксела, доцетаксела и их производных; согласно другому аспекту указанного варианта реализации настоящего изобретения фармацевтически активное вещество представляет собой иммунодепрессант; согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации указанный иммунодепрессант выбирают из циклоспорина, сиролимуса, такролимуса и их производных. Согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации фармацевтическая композиция может быть обеспечена в виде водного раствора, геля, крема, мази, таблетки, капсулы или мягкого геля.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания для получения описанной системы доставки лекарства.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу получения системы доставки лекарства, включающей наночастицы, образованные натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, имеющим собственную растворимость в воде менее примерно 100 мкг/мл, причем указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее 100 нм; размер указанных наночастиц контролируют для получения эффективного среднего размера частиц менее 100 нм путем установления весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы весовое соотношение находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1. Согласно настоящему изобретению также предложена система доставки лекарства, которая может быть получена согласно указанному способу, а также фармацевтическая композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и описанную систему введения лекарства.

Согласно еще одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу контроля размера частиц, и/или формы частиц, и/или распределения частиц по размеру для наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, имеющим собственную растворимость в воде менее 100 мкг/мл, в процессе получения системы доставки лекарства, причем указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее 100 нм; размер частиц, и/или форма частиц, и/или распределение размеров частиц для указанных наночастиц контролируют путем установления весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы весовое соотношение находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1. Согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации размер наночастиц контролируют таким образом, что он находится в диапазоне примерно 10-100 нм.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу контроля размера частиц для наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, имеющим собственную растворимость в воде менее 100 мкг/мл, в процессе получения системы доставки лекарства, причем указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее 100 нм; причем указанные, по существу, аморфные частицы подвергают воздействию и/или получают в водном растворе, содержащем по меньшей мере одну ионизированную соль, причем указанный водный раствор имеет ионную силу I; и размер указанных наночастиц увеличивают путем увеличения I или уменьшают путем уменьшения I.

Согласно одному из аспектов настоящего варианта реализации фармацевтически активное вещество представляет собой таксан, а указанная по меньшей мере одна ионизированная соль представляет собой хлорид натрия. Указанный аспект применим при приготовлении растворов для в/в инфузий, так как ионы натрия и хлорида представляют собой наиболее широко распространенные ионы в организме человека, а также в организмах многих животных.

Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации ионизированная соль включает поливалентные катионы, такие как, например, двухвалентные катионы. Указанные катионы не только увеличивают ионную силу растворителя в целом, таким образом увеличивая размер частиц, но также стабилизируют образованные частицы.

Применение таксансодержащих частиц, обладающих размером в диапазоне примерно 10-100 нм, значительно улучшает терапевтическую эффективность указанных противораковых соединений путем увеличения времени циркуляции лекарств в крови, снижения их ретикулоэндотелиального выведения и избирательного проникновения в поврежденную сосудистую систему. Помимо преимуществ применения таксанов в виде указанных наночастиц *in vivo*, т.е. медленного высвобождения лекарства и повышенной

проницаемости сосудистой системы опухоли, также было обнаружено, что активность таксановых составов, содержащих указанные наночастицы, более выражена *in vitro* в клеточных линиях различных солидных опухолей. Более того, цитотоксичность указанных составов в значительной степени зависит от размера частиц.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу увеличения способности нести лекарство для наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, имеющим собственную растворимость в воде менее примерно 100 мкг/мл, в процессе получения системы доставки лекарства, путем обеспечения указанного вещества в виде, по существу, аморфных частиц, обладающих эффективным средним размером частиц менее 100 нм; и установления весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы оно находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1.

В каждом из указанных способов согласно настоящему изобретению фармацевтически активное вещество может быть обеспечено в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее примерно 100 нм посредством способа, включающего стадии

растворения указанного вещества в подходящем органическом растворителе для получения органического раствора указанного вещества;

добавления примерно 0,01-3 мол.экв. натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному органическому раствору;

выпаривания органического растворителя из указанного органического раствора с получением остатка, содержащего фармацевтически активное вещество в виде, по существу, аморфных частиц.

Согласно одному из вариантов реализации указанного способа к органическому раствору добавляют 0,1-1 мол.экв. натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания.

Предложенный способ основан на способности натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, а также натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты предотвращать кристаллизацию фармацевтически активного вещества, такого как, например, таксаны.

В процессе выпаривания органического растворителя натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетание совместно кристаллизуются с фармацевтически активным веществом, образуя пленку. Вода, добавленная к указанной пленке, растворяет натриевую соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевую соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетание и дает в результате фармацевтически активное вещество в высокоаморфном виде с чрезвычайно увеличенной площадью поверхности.

Полученный таким образом раствор, по существу, аморфных частиц фармацевтически активного вещества можно применять непосредственно без выделения или очистки для инфузий или для получения высушенных замораживанием продуктов для последующего восстановления.

Альтернативным образом, указанные, по существу, аморфные частицы фармацевтически активного вещества можно получить в сухом виде посредством, например, выпаривания с последующим растворением в водном растворе, содержащем примерно 0,01-50 мол.экв. указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания. Согласно одному из вариантов реализации указанные частицы активного вещества можно растворить в таком растворе, содержащем примерно 0,1-5 мол.экв. натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания. По существу, аморфные частицы можно растворить в растворе натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания в течение нескольких минут.

В качестве другой альтернативы раствор фармацевтически активного вещества в органическом растворителе добавляют к водному раствору натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания, после чего органический растворитель выпаривают, оставляя водный раствор, содержащий фармацевтически активное вещество в аморфном виде.

Указанный способ можно оптимизировать и упростить путем организации поступления органического раствора фармацевтически активного вещества в сосуд для выпаривания, содержащий водный раствор натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания одновременно с выпариванием.

Скорость поступления органического раствора, внутреннее давление в испарительной системе, а также температуру выпаривания можно выбирать таким образом, чтобы концентрация органического раствора не превышала 15%.

Органический растворитель, применяемый в процессе получения фармацевтически активного вещества в виде, по существу, аморфных частиц, может представлять собой спирт, такой как, например, метанол или этанол. Применение метанола, который имеет более низкую температуру кипения по сравнению с этанолом, облегчает выпаривание спиртово-водных смесей.

Однако, поскольку остатки органических растворителей могут меньше подходить для непосредственного применения *in vivo*, органические растворы, по существу, аморфных частиц фармацевтически активного вещества можно, например, высушить замораживанием для удаления органического растворителя, получая, по существу, аморфные частицы фармацевтически активного вещества в виде обычного порошка для хранения и приготовления новых составов.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения также предложены

применение системы доставки лекарства согласно настоящему изобретению для получения лекарства для лечения рака и для способа лечения рака, отличающегося тем, что систему доставки лекарства согласно настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве пациенту, нуждающемуся в указанном лечении;

применение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения лекарства для лечения рака и для способа лечения рака, отличающегося тем, что фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.

применение системы доставки лекарства согласно настоящему изобретению для получения лекарства для применения при посталлогенной трансплантации органа и для способа посталлогенной трансплантации органа, отличающегося тем, что систему доставки лекарства согласно настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве пациенту, нуждающемуся в указанном лечении;

применение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения при посталлогенной трансплантации органа и для способа посталлогенной трансплантации органа, отличающегося тем, что фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.

Водорастворимые таксановые составы, полученные с применением натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания стабильны в течение нескольких часов в широком диапазоне условий образования указанных составов.

Таким образом, настоящее изобретение дает возможность получить водные растворы таксанов, в других обстоятельствах плохо растворимых в воде, наподобие паклитаксела и доцетаксела, для инфузий без какого-либо использования неионогенных поверхностно-активных веществ. Это значительно уменьшает аллергические реакции к инфузионным растворам, сокращает время инфузий и избавляет от необходимости премедикации пациентов против указанных аллергических реакций.

Настоящее изобретение будет более подробно проиллюстрировано в следующих не ограничивающих примерах.

Примеры

Материалы и способы.

Составы, которые содержат фармацевтически активные компоненты совместно с натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием готовили путем восстановления или недавно выпаренных, или высушенных замораживанием остатков активного компонента с производными ретиноил цистеиновой кислоты при помощи указанного раствора для восстановления.

Паклитаксел, циклоспорин А и полностью-трансретиноил цистеиновую кислоту приобретали у Sigma-Aldrich Sweden AB. Доцетаксел приобретали у ScinoPharm Taiwan, Ltd. Иксабепилон приобретали у Chemtronica KB, Sweden. Фенретинид синтезировали в соответствии со стандартной методикой (Cancer Research, 39, 1339-1346, April, 1979). Таксол, Таксотер и Абраксан приобретали в аптеках и восстанавливали в соответствии с указаниями по применению препарата, данными производителем.

Размер частиц в составах измеряли способом динамического рассеяния света с использованием красного лазера (633 нм). Дзета (Z)-потенциал измеряли способом электрофоретического рассеяния света. Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) применяли для определения как размера частиц, так и дзета-потенциала. Для нанесения на график зависимости размера частиц и дзета-потенциала вычисляли средние значения из трех независимых измерений. Величина погрешности по оси Y составляет из +/- стандартное отклонение (CO) измерений.

Для оценки цитотоксичности *in vitro* клетки клеточных линий различных опухолей человека приобретали у American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA): линию клеток аденокарциномы груди человека MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26, Lot 3576799), линию клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 (ATCC-HTB-77, Lot 3038337) и линию мелкоклеточного рака легкого человека A549

(ATCC-CCL-185, Lot 3244171). Клетки MDA-MB-231 культивировали в культуральной среде MEM с 2 mM L-глутамина, 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и антибиотиками. Клетки SKOV-3 культивировали в культуральной среде Мак-Коя 5А, дополненной 1,5 mM L-глутамина, 10% ФБС и антибиотиками. Все среды и добавки приобретали у Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mi., USA). Культивирование всех линий клеток осуществляли в культивационных флаконах BD Falcon™ 25 или 75 см² (Becton Dickinson Labware). Клетки A549 культивировали в культуральной среде Хэма F-12 с 1 mM L-глутамина, 10% ФБС и антибиотиками. Размножение клеток всех линий проводили в культивационных флаконах BD Falcon™ 25 или 75 см².

Исследование цитотоксичности лекарств проводили с использованием культивационных планшетов BD Falcon™ на 96 ячеек для прикрепленных клеток (Becton Dickinson Labware). На указанные планшеты высевали клетки в количестве 8×10^3 клеток/ячейка для MDA-MB-231, 10×10^3 клеток/ячейка для SKOV-3 или 6×10^3 клеток/ячейка для A549 в объеме 200 мкл/ячейка. Как сосуды, так и культивационные планшеты инкубировали для роста клеток при 37°C во влажной атмосфере с 95% воздуха и 5% CO₂.

Культуры клеток в культивационных планшетах оставляли для прикрепления в течение 24 ч инкубирования. В день 1 после высевания в ячейки с культурами добавляли 4 мкл растворов составов, подлежащих исследованию, с различными концентрациями в подходящих растворителях (эксперименты доза-отклик). К контрольным культурам добавляли 4 мкл растворителя в качестве контроля по растворителю. Клетки инкубировали в течение 2-4 последующих дней. В конце периода инкубирования прикрепленные клетки снимали путем трипсинизации и подсчитывали число жизнеспособных клеток при помощи теста на исключение с трипановым синим и гематоцитометра. Все эксперименты проводили по меньшей мере три раза и получали данные как среднее по трем измерениям, каждое повторенное четырежды. Результаты выражали как среднее число клеток \pm CO и различия между контрольными и исследуемыми сериями оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Цитотоксичность лекарства оценивали на основании степени ингибирования роста клеток. Ингибирование роста клеток исследуемыми лекарствами вычисляли как

$$\text{Ингибирование роста клеток \%} = \frac{\text{Контроль} - \text{Исследуемый}}{\text{Контроль}} \times 100$$

В контрольных сериях 4 мкл различных растворителей, применяемых для исследования лекарств, добавляли к культуре в качестве отрицательного контроля по растворителю. Различия между указанными контрольными сериями были незначительными, поэтому для вычислений применяли среднее из отрицательных контролей.

Растворы паклитаксела и доцетаксела, а также их имеющиеся в продаже составы, применяли в качестве положительного контроля. Различия в ингибировании роста указанными лекарствами в различных растворителях были незначительны; поэтому для вычислений использовали среднее из положительных контролей.

Среднюю IC₅₀ \pm CO вычисляли на основании последних трех отдельных экспериментов.

Коэффициенты усиления (КУ) вычисляли путем деления IC₅₀ контрольного лекарства сравнения на IC₅₀ состава согласно настоящему изобретению.

Ионная сила раствора представляет собой функцию от концентрации всех ионов, присутствующих в растворе.

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2$$

где c_B представляет собой концентрацию иона B,

z_B представляет собой число заряда указанного иона, и сумму берут по всем ионам в растворе.

Пример 1. Приготовление аморфного паклитаксела.

12 мл исходного раствора паклитаксела в метаноле ($c = 2,5$ мг/мл) и 2 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретинаоил цистеиновой кислоты ($c = 15$ мг/мл) выпаривали под вакуумом досуха в круглодонном сосуде объемом 50 мл. В сосуд добавляли 15 мл метанола и растворяли остаток. Полученный раствор выпаривали досуха. Пленка, полученная после выпаривания, состояла из смеси аморфного паклитаксела и натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретинаоил цистеиновой кислоты.

Пример 2. Приготовление аморфного доцетаксела.

27 мл исходного раствора доцетаксела в метаноле ($c = 0,5$ мг/мл) и 1 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретинаоил цистеиновой кислоты ($c = 15$ мг/мл) объединяли в круглодонном сосуде объемом 100 мл. Полученный раствор выпаривали под вакуумом досуха, полученный остаток растворяли в 20 мл метанола, после чего снова выпаривали метанол под вакуумом. Пленка, полученная после выпаривания, состояла из смеси аморфного доцетаксела и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретинаоил цистеиновой кислоты.

Пример 3. Растворение аморфного паклитаксела в мицеллярном растворе натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты.

13 мл воды и 2 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты ($c = 15$ мг/мл) добавляли в сосуд, содержащий пленку аморфного паклитаксела, полученную в примере 1. Пленку паклитаксела полностью растворяли при помощи осторожного встряхивания сосуда в течение 10 мин. Полученный раствор был бесцветным и прозрачным. Он содержал растворенный паклитаксел в концентрации 2 мг/мл. Фильтрация раствора через фильтр с отверстиями 0,2 мкм не приводило к какому-либо уменьшению концентрации паклитаксела.

Пример 4. Растворение аморфного доцетаксела в водном растворе натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты.

К аморфному доцетакселу, полученному в примере 2, добавляли 24,4 мл воды и перемешивали полученную смесь при помощи магнитной мешалки в течение 5 мин. К полученной суспензии добавляли 2,6 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты ($c = 15$ мг/мл) и перемешивали смесь в течение 15 мин. Полученный раствор был бесцветным и прозрачным. Он содержал растворенный доцетаксел в концентрации 0,5 мг/мл. Фильтрация раствора через фильтр с отверстиями 0,2 мкм не вызывало какого-либо уменьшения концентрации доцетаксела.

Пример 5. Приготовление водного состава паклитаксела путем поэтапного смешивания водного раствора смеси натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноилцистеиновой кислоты и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты и метанольного раствора паклитаксела.

10 мл метанольного раствора паклитаксела (10 мг/мл) добавляли по каплям в круглодонный сосуд объемом 500 мл, содержащий 120 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты (2,5 мг/мл) и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (2,5 мг/мл) при перемешивании посредством магнитной мешалки. Затем содержимое сосуда выпаривали на роторном испарителе при 90 об/мин и температуре бани 45°C до тех пор, пока внутреннее давление в закрытой вакуумной системе, состоящей из сосуда, испарителя и вакуумного насоса, не падало до 70 мбар. Указанное добавление метанольного раствора паклитаксела, описанное выше, с последующим выпариванием повторяли дважды. Общий объем добавленного метанольного раствора составлял 30 мл. Водный раствор, оставшийся после выпаривания, переносили из сосуда в измерительный цилиндр объемом 250 мл. Сосуд промывали три раза по 5 мл воды, которую также выливали в цилиндр. К объединенному раствору добавляли воду для достижения общего объема 150 мл. Полученный раствор фильтровали через фильтр с отверстиями 0,2 мкм и высушивали замораживанием. Концентрация паклитаксела в полученном составе составляла 2 мг/мл.

Пример 6. Приготовление водного состава доцетаксела путем поэтапного смешивания водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и этанольного раствора доцетаксела.

6 мл раствора доцетаксела (5 мг/мл) в 95% этаноле добавляли по каплям в круглодонный сосуд объемом 500 мл, содержащий 100 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты (3 мг/мл) при перемешивании посредством магнитной мешалки. Основную часть этанола выпаривали на роторном испарителе при 90 об/мин и температуре бани 55°C до тех пор, пока внутреннее давление в закрытой вакуумной системе, состоящей из сосуда, испарителя и вакуумного насоса, не падало до 60 мбар. Указанное добавление этанольного раствора доцетаксела, описанное выше, с последующим выпариванием повторяли дважды. Общий объем добавленного этанольного раствора составлял 30 мл. Водный раствор, оставшийся после выпаривания этанола, переносили из сосуда в измерительный цилиндр объемом 250 мл. Сосуд промывали три раза по 5 мл воды, которую также выливали в цилиндр. К объединенным растворам добавляли воду до достижения общего объема 150 мл. После фильтрации через фильтр с отверстиями 0,2 мкм состав высушивали замораживанием. Концентрация доцетаксела в полученном составе составляла 1 мг/мл.

Пример 7. Приготовление водного состава доцетаксела путем смешивания водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты и этанольного раствора доцетаксела в процессе выпаривания.

Круглодонный сосуд объемом 1000 мл, содержащий 150 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты (3 мг/мл) и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (3 мг/мл) присоединяли к роторному испарителю, снабженному подводной трубкой для подачи спиртовых растворов таксанов таким образом, чтобы подводная трубка не соприкасалась с водным раствором. Выпаривание начинали при температуре бани 45°C и скорости вращения 100 об/мин. Через 1 мин начинали добавление по каплям (60 капель/мин или 3 мл/мин) 80 мл метанольного раствора доцетаксела (5 мг/мл). После окончания указанного добавления продолжали выпаривание в течение 5 мин. Водный раствор, оставшийся после выпаривания метанола, переносили из испарительного сосуда в измерительный цилиндр объемом 250 мл. Сосуд промывали 3 раза по 10 мл воды и промывочные растворы выливали в цилиндр. К объединенным растворам добав-

ляли воду до достижения общего объема 200 мл. После фильтрования через фильтр с отверстиями 0,2 мкм полученный состав высушивали замораживанием. Концентрация доцетаксела в полученном составе составляла 2 мг/мл.

Пример 8. Изучение зависимости размера частиц от весового соотношения натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты с паклитакселом в составах, полученных путем восстановления свежеевпаренных остатков натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и паклитаксела водным раствором хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл.

Таблица 1

Весовое соотношение натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и паклитаксела	Концентрация паклитаксела 0,5 мг/мл		Концентрация паклитаксела 1 мг/мл		Концентрация паклитаксела 2 мг/мл		Концентрация паклитаксела 4 мг/мл	
	Средний размер частиц, нм	Станд. откл.	Средний размер частиц, нм	Станд. откл.	Средний размер частиц, нм	Станд. откл.	Средний размер частиц, нм	Станд. откл.
1,1	27,9	2,0	32,2	1,2	35,7	1,3	40,3	1,1
1,2	21,4	0,6	22,0	1,1	23,5	1,2	25,6	0,8
1,5	13,1	0,6	14,8	0,5	14,9	1,0	15,3	0,7
3,0	12,6	0,3	13,3	0,7	13,8	0,4	14,8	0,5
8,0	11,0	0,5	11,5	0,6	12,8	0,4	13,3	0,3

Как показано в табл. 1 и на фиг. 1, размер частиц уменьшается со снижением количества паклитаксела, которое вмещают мицеллы.

Пример 9. Изучение зависимости размера частиц состава доцетаксела от концентрации хлорида натрия.

Растворы готовили путем восстановления высушенного замораживанием порошка, содержащего доцетаксел и натриевую соль метилового эфира N-13-цисретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:1.

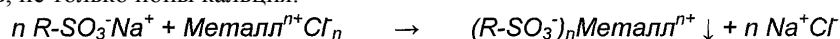
Таблица 2

Концентрация NaCl, мг/мл	Концентрация доцетаксела 0,5 мг/мл		Концентрация доцетаксела 1 мг/мл		Концентрация доцетаксела 2 мг/мл		Концентрация доцетаксела 4 мг/мл	
	Средний размер, нм	Ст. откл.	Средний размер, нм	Ст. откл.	Средний размер, нм	Ст. откл.	Средний размер, нм	Ст. откл.
4	7,2	0,7	6,7	0,6	6,4	0,4	5,9	2,5
8	7,8	0,7	8,2	0,7	9,3	1,4	12,7	1,4
12	12,1	1,0	13,4	0,9	14,6	1,0	40,0	4,9
16	17,0	2,3	29,0	4,2	51,3	3,7	82,7	3,7
20	22,4	1,8	39,3	2,8	72,3	3,7	107,7	6,2
24	28,3	4,6	86,0	4,2	108,3	7,5	144,3	9,9

Как показано в табл. 2 и на фиг. 2, увеличение концентрации хлорида натрия, т.е. ионной силы, делает частицы крупнее.

Пример 10. Превращение натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты в кальциевую соль.

Водные растворы натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты (5 мл, 15 мг/мл) и хлорида кальция (3 мл, 30 мг/мл) смешивали в пробирке объемом 10 мл. Во время смешивания наблюдали выпадение мелкого осадка. Полученный осадок отделяли центрифугированием пробирки при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли и полученный осадок встряхивали в 8 мл воды, после чего проводили новое центрифугирование. После трех дополнительных процедур промывки, как описано выше, надосадочную жидкость фильтровали через фильтр с отверстиями 0,2 мкм с целью удаления возможных крупных агрегатов продукта. Растворимость кальциевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты соответствовала ее концентрации в отфильтрованном растворе и равнялась 0,2 мг/мл согласно измерению описанным выше УФ-способом. Реакцию иллюстрирует приведенная ниже общая схема, включающая хлориды любых поливалентных ионов металлов, не только ионы кальция.



Водорастворимая
натриевая соль
метилового эфира N-
полностью-транс-
ретиноил
цистеиновой кислоты
или метилового
эфира N-цис-
ретиноил
цистеиновой кислоты

Водонерастворимая
соль метилового эфира
N-полностью-транс-
ретиноил цистеиновой
кислоты или
метилового эфира N-
цис-ретиноил
цистеиновой кислоты и
поливалентного
металла

Пример 11. Изучение зависимости размера частиц состава паклитаксела от концентрации хлорида кальция.

Растворы готовили путем восстановления высушенного замораживанием порошка, содержащего паклитаксел, натриевую соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевую соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:1:1. Растворители для восстановления готовили растворением соответствующих количеств дигидрата хлорида кальция в водном растворе хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл.

Таблица 3

Концентрация CaCl_2 , ммоль/л	Концентрация паклитаксела 0,5 мг/мл	Концентрация паклитаксела 1 мг/мл	Концентрация паклитаксела 2 мг/мл			
	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл л	Средний размер частиц, нм	Ст. откл
0	12,7	0,4	16,3	1,1	22,1	0,2
2	23,8	1,7	24,6	0,5	27,3	0,2
4	27,4	0,2	30,1	0,4	32,0	0,1
6	51,0	0,6	55,2	5,1	58,6	1,6

Как показывают табл. 3 и на фиг. 3, размер частиц в составах увеличивается почти линейно с увеличением концентрации CaCl_2 .

Пример 12. Изменение со временем размера частиц и дзета-потенциала состава, полученного путем восстановления высушенной замораживанием смеси паклитаксела, натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:0,75:0,75 водным раствором хлорида натрия (9 мг/мл), хлорида кальция (2 ммоль/л) и хлорида магния (1 ммоль/л).

Таблица 4

Время после восстановления	Концентрация паклитаксела 0,5 мг/мл		Концентрация паклитаксела 1 мг/мл		Концентрация паклитаксела 2 мг/мл	
	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл
0	22,1	0,5	23,5	0,5	25,6	0,8
1	22,7	0,7	24,1	0,8	26,3	0,7
2	23,1	0,5	24,3	0,4	26,2	0,5
4	23	0,4	24,4	0,3	26,6	0,2
8	23,4	0,7	24,0	0,6	27,0	0,4

Таблица 5

Время после восстановления	Концентрация паклитаксела 0,5 мг/мл		Концентрация паклитаксела 1 мг/мл		Концентрация паклитаксела 2 мг/мл	
	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.
0	-24,5	1,3	-28,7	1,2	-29,9	1,1
1	-26,3	1,8	-30,1	1,0	-32,7	0,8
2	-25,2	0,4	-30,4	1,0	-30,6	0,5
4	-27,0	0,5	-29,6	0,6	-31,2	0,3
8	-27,1	0,4	-30,4	0,3	-32,4	0,6

Как следует из табл. 4 и 5 и фиг. 4 и 5, в процессе хранения состава в течение 8 ч не наблюдали каких-либо значительных изменений в значениях размера частиц, а также дзета-потенциала.

Пример 13. Изменение со временем размера частиц и дзета-потенциала состава, полученного путем восстановления высушенной замораживанием смеси доцетаксела и натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты в весовом соотношении 1:2 водным раствором хлорида натрия (9 мг/мл) и хлорида кальция (3 ммоль/л).

Таблица 6

Время после восстановления	Концентрация доцетаксела 0,5 мг/мл		Концентрация доцетаксела 1 мг/мл		Концентрация доцетаксела 2 мг/мл	
	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл
0	11,9	0,3	12,6	0,2	13,1	0,4
1	12,3	0,3	13,2	0,4	13,4	0,2
2	12,4	0,2	13,0	0,2	13,7	0,4
4	12,2	0,4	12,9	0,1	13,4	0,2
8	12,5	0,3	13,2	0,2	13,8	0,2

Таблица 7

Время после восстановления	Концентрация доцетаксела 0,5 мг/мл		Концентрация доцетаксела 1 мг/мл		Концентрация доцетаксела 2 мг/мл	
	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.	Дзета-потенциал, мВ	Ст. откл.
0	-22,2	2,1	-22,6	1,3	-22,8	0,6
1	-23,4	0,9	-22,4	1,2	-24,1	0,8
2	-22,7	0,4	-23,7	0,9	-23,3	0,4
4	-21,9	0,3	-23,1	0,8	-23,1	0,2
8	-21,7	0,6	-23,4	0,6	-23,5	0,5

В табл. 6 и 7 и на фиг. 6 и 7 показано, что в процессе хранения состава в течение 8 ч не наблюдалось каких-либо значительных изменений в значениях размера частиц, а также дзета-потенциала.

Пример 14. Приготовление аморфного циклоспорина А.

50 мл исходного раствора циклоспорина А в метаноле ($c = 1,0$ мг/мл) и 4,2 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты ($c = 12$ мг/мл) выпаривали в вакууме досуха в круглодонном сосуде объемом 100 мл. Добавляли в сосуд 15 мл метанола и растворяли полученный осадок. Полученный раствор выпаривали досуха. Пленка, полученная после выпаривания, состояла из смеси аморфного циклоспорина А и натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты.

Пример 15. Растворение аморфного циклоспорина А в мицеллярном растворе натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты.

45,8 мл воды и 4,2 мл водного раствора натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты ($c = 12$ мг/мл) добавляли в сосуд, содержащий пленку аморфного циклоспорина А, полученную в примере 14. Пленку циклоспорина А полностью растворяли осторожным встряхиванием сосуда в течение 10 мин. Полученный раствор был бесцветным и прозрачным. Он содержал растворенный циклоспорин А в концентрации 1 мг/мл. Фильтрация полученного раствора через фильтр с отверстиями 0,2 мкм не приводило к какому-либо снижению концентрации циклоспорина А.

Пример 16. Изучение зависимости размера частиц от весового соотношения натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты с циклоспорином А в составах, полученных восстановлением свежевыпаренных остатков натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и циклоспорина А водным раствором хлорида натрия с концентрацией 9 мг/мл.

Таблица 8

Весовое соотношение натриевой соли метилового	Концентрация циклоспорина А 0,5 мг/мл		Концентрация циклоспорина А 1 мг/мл		Концентрация циклоспорина А 2 мг/мл		Концентрация циклоспорина А 4 мг/мл	
	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл	Средний размер частиц, нм	Ст. откл
1,3	57,3	1,6	63,2	2,2	69,7	2,0	78,0	3,6
1,4	42,2	1,8	46,9	1,8	50,8	1,8	58,8	2,7
1,6	28,6	1,4	30,9	1,7	32,3	1,1	37,8	2,5
2,0	20,2	1,2	22,1	1,1	25,5	0,6	25,9	0,9
8,0	10,4	0,8	11,5	0,4	11,9	0,5	12,9	0,5

Как показано в табл. 8 и на фиг. 10, размер частиц уменьшается по мере снижения количества циклоспорина А, входящего в состав мицелл.

Биологическая оценка.

Примеры 17-21.

Эксперименты *in vitro* показали, что активность таксановых составов в линиях клеток различных солидных опухолей более выражена при использовании наночастиц, предложенных согласно настоящему изобретению. Более того, цитотоксичность указанных составов значительно зависит от размера наночастиц. Более крупный размер наночастиц в системе доставки лекарства согласно настоящему изобретению приводит к уменьшенному переносу таксанов в клетку, что, в свою очередь, ведет к снижению цитотоксичности.

Наивысшая активность наблюдалась, когда размер составлял 25 и 13 нм для растворов паклитаксела и доцетаксела соответственно: эксперименты *in vitro* дают значения коэффициентов усиления (КУ) для указанных составов, равные 41,7 и 31,7, соответственно на третий день воздействия. Контрольные образцы в указанных экспериментах содержали таксаны в этанольном растворе (в отсутствие каких-либо наночастиц).

Другие сравнения *in vitro* таксановых составов согласно настоящему изобретению с имеющимися в продаже таксановыми составами показали, что составы согласно настоящему изобретению обладают более выраженной цитотоксической активностью по отношению к различным линиям культур злокачественных клеток, таких как аденокарцинома груди, аденокарцинома яичника и немелкоклеточный рак легкого.

Пример 17. Сравнительная оценка цитотоксичности составов, образованных доцетакселом и смесью натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты с натриевой солью метилового эфира N-13-цисретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:1:1) в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3.

Высушенный замораживанием порошок, содержащий доцетаксел, натриевую соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевую соль метилового эфира N-13-цисретиноил цистеиновой кислоты растворяли в 70% этаноле или в растворе хлорида натрия (9 мг/мл), содержащем соответствующее количество хлорида кальция. Отбирали образцы полученных таким образом растворов и использовали их для измерения среднего размера частиц.

Таблица 9

Растворитель	Концентрация CaCl_2 , ммоль/л	Размер частиц, нм	День 3 IC_{50}	КУ* день 3	День 4 IC_{50}	КУ* день 4	День IC_{50}	КУ* день 5
70 % EtOH	-	-	$2,0 \cdot 10^{-7}$	-	$7,2 \cdot 10^{-9}$	-	$7,6 \cdot 10^{-10}$	-
Раствор NaCl	0	11,3	$1,2 \cdot 10^{-7}$	1,7	$7,2 \cdot 10^{-9}$	1	$6,5 \cdot 10^{-10}$	1,2
Раствор NaCl	1	12,2	$3,4 \cdot 10^{-8}$	5,9	$5,6 \cdot 10^{-9}$	1,3	$4,2 \cdot 10^{-10}$	1,8
Растворитель	Концентрация CaCl_2 , ммоль/л	Размер частиц, нм	День 3 IC_{50}	КУ* день 3	День 4 IC_{50}	КУ* день 4	День IC_{50}	КУ* день 5
Раствор NaCl	2	13,1	$6,3 \cdot 10^{-9}$	31,7	$2,1 \cdot 10^{-9}$	3,4	$9,4 \cdot 10^{-11}$	8,1
Раствор NaCl	3	14,6	$2,0 \cdot 10^{-8}$	10	$3,4 \cdot 10^{-9}$	2,1	$1,4 \cdot 10^{-10}$	5,4

* Состав с этанолом использовали в качестве положительного контроля для расчета КУ.

Из табл. 9 и на фиг. 8 следует, что состав, содержащий 2 ммоль/л кальция, наиболее активен. Затем с увеличением и уменьшением концентрации кальция цитотоксичность составов снижается.

Пример 18. Сравнительная оценка цитотоксичности составов, образованных паклитакселом и смесью натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты с натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75) в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3.

Высушенный замораживанием порошок, содержащий паклитаксел, натриевую соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевую соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты растворяли в 70% этаноле или в растворе хлорида натрия (9 мг/мл), содержащем соответствующее количество хлорида кальция. Отбирали образцы полученных растворов и использовали их для измерения среднего размера частиц.

Таблица 10

Растворитель	Концентрация CaCl_2 , ммоль/л	Размер частиц, нм	День 3 IC_{50}	КУ* день 3	День 4 IC_{50}	КУ* день 4	День IC_{50}	КУ* день 5
70 % EtOH	-	-	$5,0 \cdot 10^{-6}$	-	$2,1 \cdot 10^{-7}$	-	$6,8 \cdot 10^{-8}$	-
Раствор NaCl	0	17	$3,0 \cdot 10^{-6}$	1,7	$1,3 \cdot 10^{-7}$	1,6	$5,5 \cdot 10^{-8}$	1,2
Раствор NaCl	1	19	$1,7 \cdot 10^{-6}$	2,9	$8,4 \cdot 10^{-8}$	2,5	$9,8 \cdot 10^{-9}$	6,9
Раствор NaCl	2	25	$1,2 \cdot 10^{-7}$	41,7	$2,3 \cdot 10^{-8}$	9,1	$7,2 \cdot 10^{-10}$	94,0
Раствор NaCl	3	29	$2,4 \cdot 10^{-7}$	20,8	$4,3 \cdot 10^{-8}$	4,9	$1,2 \cdot 10^{-8}$	5,7

* Состав с этанолом использовали в качестве положительного контроля для расчета КУ.

Из табл. 10 и на фиг. 9 следует, что состав, содержащий 2 ммоль/л кальция, обладает наибольшей активностью. Затем с увеличением и уменьшением концентрации кальция цитотоксичность составов снижается.

Пример 19. Оценка цитотоксичности состава "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноилцистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноилцистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,5)" по сравнению с Таксолом®, Абраксаном® и чистым паклитакселом в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы груди MDA-MB-231.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка в водном растворе, содержащем хлорид натрия.

(6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Паклитаксел применяли в метанольном растворе. Образцы Таксола® и Абраксана® готовили в соответствии с инструкциями производителей путем разбавления коммерчески доступного концентрата Таксола® (6 мг/мл) раствором хлорида натрия (9 мг/мл) и путем восстановления высушенного замораживанием связанного с альбумином паклитаксела раствором хлорида натрия (9 мг/мл) до концентрации паклитаксела 5 мг/мл. Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления. Коэффициенты усиления вычисляли по сравнению с метанольным раствором паклитаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 11.

Таблица 11

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Паклитаксел	-	$(3,80 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	-	$(3,4 \pm 0,12) \times 10^{-8}$	-
Таксол®	-	$(2,04 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	1,9	$(2,0 \pm 0,10) \times 10^{-8}$	1,7
Абраксан®	130	$(4,2 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	0,9	$(3,4 \pm 0,16) \times 10^{-8}$	1
Паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	24	$(4,2 \pm 0,14) \times 10^{-9}$	4,9	$(3,2 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	10,6

Пример 20.

Оценка цитотоксичности состава "доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноилцистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,5:0,5)" по сравнению с Таксотером® и чистым доцетакселом в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы груди MDA-MB-231.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка водным раствором, содержащим хлорид натрия (6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Доцетаксел применяли в метанольном растворе. Образец Таксотера® готовили в соответствии с инструкциями производителя посредством разбавления коммерчески доступного концентрата (40 мг/мл) вначале раствором этанола до концентрации 10 мг/мл, а затем последующим разбавлением раствором хлорида натрия (9 мг/мл). Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления. Коэффициенты усиления вычисляли по сравнению с метанольным раствором доцетаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 12.

Таблица 12

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	KУ день 3	IC ₅₀ день 4	KУ день 4
Доцетаксел	-	$(1,25 \pm 0,11) \times 10^{-8}$	-	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	-
Таксотер®	-	$(1,08 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	1,2	$(9,60 \pm 0,18) \times 10^{-9}$	1,0
Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	KУ день 3	IC ₅₀ день 4	KУ день 4
Доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	12	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	4,0	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	8,3

Пример 21. Оценка цитотоксичности состава "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75)" по сравнению с Таксолом®, Абраксаном® и чистым паклитакселем в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV-3.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка в водном растворе, содержащем хлорид натрия (6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Паклитаксел использовали в метанольном растворе. Образцы Таксола® и Абраксана® готовили в соответствии с инструкциями производителей разбавлением коммерчески доступного концентрата Таксола® (6 мг/мл) раствором хлорида натрия (9 мг/мл) и посредством восстановления высушенного замораживанием связанного с альбумином паклитаксела раствором хлорида натрия (9 мг/мл) до концентрации паклитаксела 5 мг/мл. Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления.

Коэффициенты усиления вычисляли по сравнению с метанольным раствором паклитаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 13.

Таблица 13

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Паклитаксел	-	$(5,94 \pm 0,21) \times 10^{-7}$	-	$(6,22 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	-
Таксол®	-	$(3,24 \pm 0,16) \times 10^{-7}$	1,8	$(4,20 \pm 0,25) \times 10^{-8}$	1,5
Абраксан®	130	$(6,3 \pm 0,32) \times 10^{-7}$	0,94	$(6,5 \pm 0,30) \times 10^{-8}$	0,96
Паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	24	$(2,05 \pm 0,08) \times 10^{-7}$	2,3	$(2,17 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	2,9

Пример 22. Оценка цитотоксичности состава "доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,5:0,5)" по сравнению с Таксотером® и чистым доцетакселом в культурах линии клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV-3.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка водным раствором, содержащим хлорид натрия (6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Доцетаксел использовали в метанольном растворе. Образец Таксотера® готовили в соответствии с инструкциями производителя путем разбавления коммерчески доступного концентрата (40 мг/мл) вначале этанольным раствором до концентрации 10 мг/мл, а затем последующим разбавлением раствором хлорида натрия (9 мг/мл). Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления. Коэффициенты усиления вычисляли по сравнению с метанольным раствором доцетаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 14.

Таблица 14

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Доцетаксел	-	$(9,07 \pm 0,38) \times 10^{-8}$	-	$(2,85 \pm 0,26) \times 10^{-8}$	-
Таксотер®	-	$(1,18 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	0,8	$(2,03 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	1,4

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	12	$(3,24 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	2,8	$(2,86 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	10,0

Пример 23. Оценка цитотоксичности состава "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноилцистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75)" по сравнению с Таксолом®, Абраксаном® и чистым паклитакселом в культурах линии клеток человеческого немелкоклеточного рака легкого A549.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка водным раствором, содержащим хлорид натрия (6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Паклитаксел использовали в виде метанольного раствора. Образцы Таксола® и Абраксана® готовили в соответствии с инструкциями производителя посредством разбавления коммерчески доступного концентрата Таксола® (6 мг/мл) раствором хлорида натрия (9 мг/мл) и восстановления высушенного замораживанием связанного с альбумином паклитаксела раствором хлорида натрия (9 мг/мл) до концентрации паклитаксела 5 мг/мл. Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления. Коэффициенты усиления вычисляли по сравнению с метанольным раствором паклитаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 15.

Таблица 15

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Паклитаксел	-	$(8,02 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	-	$(5,28 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	-
Таксол®	-	$(6,49 \pm 0,08) \times 10^{-9}$	1,2	$(3,77 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	1,4
Абраксан®	130	$(1,2 \pm 0,06) \times 10^{-8}$	0,67	$(5,2 \pm 0,15) \times 10^{-9}$	1
Паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	24	$(1,61 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	5,0	$(7,02 \pm 0,12) \times 10^{-10}$	7,5

Пример 24. Оценка цитотоксичности состава "доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,5:0,5)" по сравнению с Таксотером и чистым доцетакселом в культурах линии клеток человеческого немелкоклеточного рака легкого A549.

Указанный состав готовили посредством растворения высушенного замораживанием порошка в водном растворе, содержащем хлорид натрия (6 мг/мл), хлорид калия (0,3 мг/мл), хлорид кальция гексагидрат (0,4 мг/мл), лактат натрия (3,1 мг/мл). Доцетаксел использовали в виде метанольного раствора. Образец Таксотера® готовили в соответствии с инструкциями производителя разбавлением коммерчески доступного концентрата (40 мг/мл) вначале этанольным раствором до концентрации 10 мг/мл, а затем последующим разбавлением раствором хлорида натрия (9 мг/мл). Все образцы использовали в течение одного часа после приготовления. Коэффициенты усиления рассчитывали по сравнению с метанольным раствором доцетаксела. Полученные результаты приведены ниже в табл. 16.

Таблица 16

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Доцетаксел	-	$(5,76 \pm 0,26) \times 10^{-9}$	-	$(4,97 \pm 0,27) \times 10^{-9}$	-
Таксотер®	-	$(4,81 \pm 0,34) \times 10^{-9}$	1,2	$(4,63 \pm 0,17) \times 10^{-9}$	1,1

Состав	Размер частиц, нм	IC ₅₀ день 3	КУ день 3	IC ₅₀ день 4	КУ день 4
Доцетаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты	12	$(9,14 \pm 0,47) \times 10^{-10}$	6,3	$(5,35 \pm 0,15) \times 10^{-10}$	7,9

Пример 25. Исследование токсичности состава "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75)" в течение одного месяца на крысах.

Исследуемые составы готовили путем восстановления солевым раствором высушенной замороженной смеси паклитаксела с натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты и натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75). 80 крыс Wistar (BRLHan:Wist@Mol (GALAS)), 40 самцов и 40 самок, разделяли на 4 группы, в каждой по 10 самцов и 10 самок. Исследуемые составы вводили путем внутривенной инъекции один раз в неделю на протяжении 5 недель. Группа 1 получала солевой раствор и являлась контрольной, группа 2 получала 5 мг/кг состава паклитаксела с полиоксиэтилированным касторовым маслом (Таксол®), группа 3 получала 5 мг/кг целевого состава и группа 4 получала 10 мг/кг целевого состава. Первоначально исследование было разработано так, что группа 2 получала бы 10 мг/кг Таксола® в качестве непосредственного сравнения с группой 4, однако по причине смертности дозировку уменьшили до 5 мг/кг, так что непосредственное сравнение с группой 3 было более подходящим. В ходе исследования наблюдалось 8 смертей. Семь крыс, получавших 10 мг/кг Таксола®, умерли вскоре после первой дозы. Пять из указанных крыс заменили запасными и снизили дозировку до 5 мг/кг. Для самок из групп 2, 3 и 4 средние значения параметров эритроцитов (Hb, RBC и HT) были ниже, чем для контрольных. Хотя у самцов подобного не наблюдалось, величины эритроцитарных индексов MCV у самцов группы 2 были повышены. Средние значения лейкоцитов, особенно нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов и, у самцов, моноцитов, у получавших препараты животных были ниже, чем у контрольных. Средние значения билирубина в крови у самцов в группе 4 и у самок в группах 2 и 4 были выше, чем у контрольных. Билирубин у самок в группе 2 (Таксол®) был значительно выше, чем у самок в группе 3. Вес печени у самцов в группах 2 и 4 был значительно ниже, чем у контрольных. Вес тимуса у самцов и самок в группе 2 и у самцов в группе 2 был значительно ниже, чем у контрольных. Относительно высокая встречаемость атрофии лимфоидной ткани от минимальной до легкой степени была отмечена в селезенке, мезентриальном и мандибулярном лимфатических узлах в группе 4. Низкая встречаемость атрофии лимфоидной ткани от минимальной до легкой степени отмечена в селезенке в группах 2 и 3. Встречаемость лимфоидной атрофии селезенки была немного выше у самцов в группе 2. Низкая встречаемость от минимальной до легкой атрофии лимфоидной ткани отмечена в мезентриальных и мандибулярных лимфатических узлах в группе 2. Кортикальный лимфоцитоз от минимального до слегка повышенного отмечен у всех самцов в группе 2. В молочных железах самцов в группах 2 и 4 отмечена более высокая встречаемость минимальной степени многоочаговых секреторных вакуолей/гипоплазии альвеол (multifocal decreased secretory vacuoles/hypoplasia of alveoli) по сравнению с контролем и группой 3. Повышенная встречаемость митотических фигур/апоптотных телец в эпителиальной выстилке молочной железы отмечена приблизительно у половины самцов во всех группах, получавших препараты.

Приведенный пример демонстрирует, что состав наночастиц "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-трансретиноилцистеиновой кислоты-натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты (весовое соотношение = 1:0,75:0,75)" обладает более низкой токсичностью по сравнению с идентичными концентрациями общеупотребительных составов паклитаксела с полиоксиэтилированным касторовым маслом.

Пример 26. Преимущества состава с наночастицами "паклитаксел-натриевая соль метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты натриевая соль метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты" по сравнению с общеупотребительными составами паклитаксела с полиоксиэтилированным касторовым маслом (Таксол®). Основные результаты и выводы обобщены в приведенной ниже табл. 17.

Таблица 17

Сравнение составов паклитаксела (результаты и исходные параметры для целевого состава в соответствии с исследованием по лечению 34 пациентов с гистологически подтвержденным солидным злокачественным опухолевым заболеванием, для которого никакого стандартного лечения не существовало или оно не имело успеха; информация о Таксоле® в соответствии с BMS PI Rev, July, 2007)

	Паклитаксел – натриевая соль метилового эфира N-полностью- <i>транс</i> -ретиноил цистеиновой кислоты – натриевая соль метилового эфира N-13- <i>цис</i> -ретиноил цистеиновой кислоты	Паклитаксел – полиоксиэтилированное касторовое масло
	Паклитаксел – натриевая соль метилового эфира N-полностью- <i>транс</i> -ретиноил цистеиновой кислоты – натриевая соль метилового эфира N-13- <i>цис</i> -ретиноил цистеиновой кислоты	Паклитаксел – полиоксиэтилированное касторовое масло
Уровень дозы/м ²	250	175
Премедикация стероидами, противорвотными и антигистаминными препаратами	Нет	Да
Анафилаксия и аллергические реакции	Нет (без премедикации)	5 % (Все пациенты получали премедикацию)
Время инфузии	1 час	3 часа

Хотя настоящее изобретение описано в отношении определенных вариантов реализации, включая наилучший вариант, в настоящее время известным изобретателям, следует понимать, что различные изменения и модификации, которые были бы очевидны среднему специалисту в данной области, могут быть сделаны, не отклоняясь от объема изобретения, установленного прилагающейся формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система доставки лекарства для введения по меньшей мере одного фармацевтически активного вещества, собственная растворимость в воде которого составляет менее 100 мкг/мл, причем указанное вещество находится в форме частиц с эффективным средним размером указанных частиц менее чем примерно 100 нм, характеризующаяся тем, что частицы вещества являются, по существу, аморфными; частицы вещества заключены в наночастицы, образованные натриевой солью метилового эфира N-полностью-транс-ретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил

цистеиновой кислоты или их сочетанием;

весовое соотношение указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу находится в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1.

2. Система доставки лекарства по п.1, отличающаяся тем, что эффективный средний размер частиц вещества составляет менее примерно 50 нм.

3. Система доставки лекарства по п.1 или 2, отличающаяся тем, что весовое соотношение натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира или N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу находится в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 10:1.

4. Система доставки лекарства по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанное вещество представляет собой цитотоксическое или цитостатическое соединение.

5. Система доставки лекарства по п.4, отличающаяся тем, что указанное цитотоксическое или цитостатическое соединение представляет собой таксан.

6. Система доставки лекарства по п.5, отличающаяся тем, что указанный таксан выбран из паклитаксела, доцетаксела и их производных.

7. Система доставки лекарства по любому из пп.4-6 для применения при лечении рака.

8. Система доставки лекарства по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанное вещество представляет собой иммунодепрессант.

9. Система доставки лекарства по п.8, отличающаяся тем, что указанный иммунодепрессант выбран из циклоспорина, сиролимуса, такролимуса и их производных.

10. Система доставки лекарства по любому из пп.8 и 9 для применения при посталлогенной трансплантации органа.

11. Фармацевтическая композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и систему доставки лекарства по любому из пп.1-10.

12. Фармацевтическая композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и систему доставки лекарства по любому из пп.4-7.

13. Фармацевтическая композиция, включающая фармацевтически приемлемый носитель и систему доставки лекарства по любому из пп.8-10.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-13 в виде водного раствора, геля, крема, мази, таблетки, капсулы или мягкого геля.

15. Применение натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания для получения системы доставки лекарства по любому из пп.1-10.

16. Способ получения системы доставки лекарства, включающей наночастицы, образованные натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, собственная растворимость в воде которого составляет менее чем примерно 100 мкг/мл, согласно которому

указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее чем примерно 100 нм;

размер указанных наночастиц контролируют таким образом, чтобы они имели эффективный средний размер частиц менее примерно 100 нм путем регулирования весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы указанное соотношение находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1.

17. Способ контроля размера частиц, и/или формы частиц, и/или распределения частиц по размерам для наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, обладающим собственной растворимостью в воде *per se* не менее чем примерно 100 мкг/мл в процессе производства получения системы доставки лекарства, отличающийся тем, что

указанное вещество представлено в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее чем не более примерно 100 нм;

размер частиц, и/или форму частиц, и/или распределение частиц по размерам для указанных наночастиц контролируют путем регулирования весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы указанное соотношение находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1.

18. Способ контроля размера частиц для наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически актив-

ным веществом, собственная растворимость в воде которого составляет менее чем примерно 100 мкг/мл, в процессе получения системы доставки лекарства, согласно которому

указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее чем примерно 100 нм;

указанные, по существу, аморфные частицы помещают и/или получают в водном растворе, содержащем по меньшей мере одну ионизированную соль, причем указанный водный раствор имеет ионную силу I;

размер частиц для указанных наночастиц увеличивают путем увеличения I или уменьшают путем уменьшения I.

19. Способ увеличения нагрузки лекарством наночастиц, образованных натриевой солью метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой солью метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетанием и по меньшей мере одним фармацевтически активным веществом, собственная растворимость в воде которого составляет менее чем примерно 100 мкг/мл, в процессе получения системы доставки лекарства путем

получения указанного вещества в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее примерно 100 нм;

регулирования весового соотношения указанной натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному веществу таким образом, чтобы указанное соотношение находилось в диапазоне от примерно 0,5:1 до примерно 20:1.

20. Способ по любому из пп.16-19, отличающийся тем, что указанное вещество обеспечивают в виде, по существу, аморфных частиц с эффективным средним размером частиц менее примерно 100 нм, причем указанный способ включает стадии

растворения указанного вещества в подходящем органическом растворителе с получением органического раствора указанного вещества;

добавления примерно 0,01-3 мол.экв. натриевой соли метилового эфира N-полностью-трансретиноил цистеиновой кислоты, натриевой соли метилового эфира N-13-цис-ретиноил цистеиновой кислоты или их сочетания к указанному органическому раствору;

выпаривания указанного органического растворителя из указанного органического раствора с получением остатка, содержащего фармацевтически активное вещество в виде, по существу, аморфных частиц.

21. Система доставки лекарства, полученная согласно способу по п.16 или 20.

22. Фармацевтическая композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и систему доставки лекарства по п.21.

23. Фармацевтическая композиция по п.22 в виде водного раствора, геля, крема, мази, таблетки, капсулы или мягкого геля.

24. Применение системы доставки лекарства по любому из пп.4-7 или 21 для получения лекарственного средства для лечения рака.

25. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в указанном лечении пациенту фармацевтической композиции по п.12 в терапевтически эффективном количестве.

26. Применение фармацевтической композиции по п.12 для получения лекарственного средства для лечения рака.

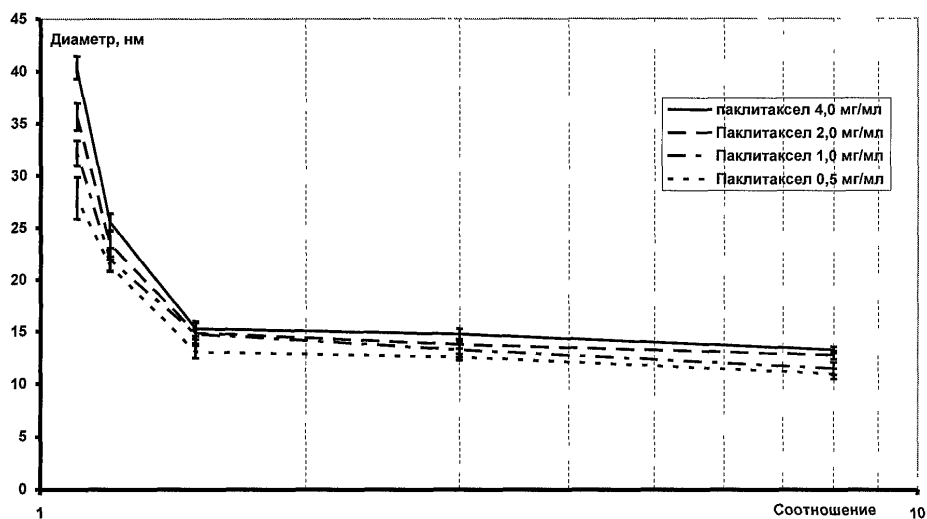
27. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в указанном лечении пациенту системы доставки лекарства по любому из пп.4-7 в терапевтически эффективном количестве.

28. Применение системы доставки лекарства по любому из пп.8-10 или 21 для получения лекарственного средства для применения при посталлогенной трансплантации органа.

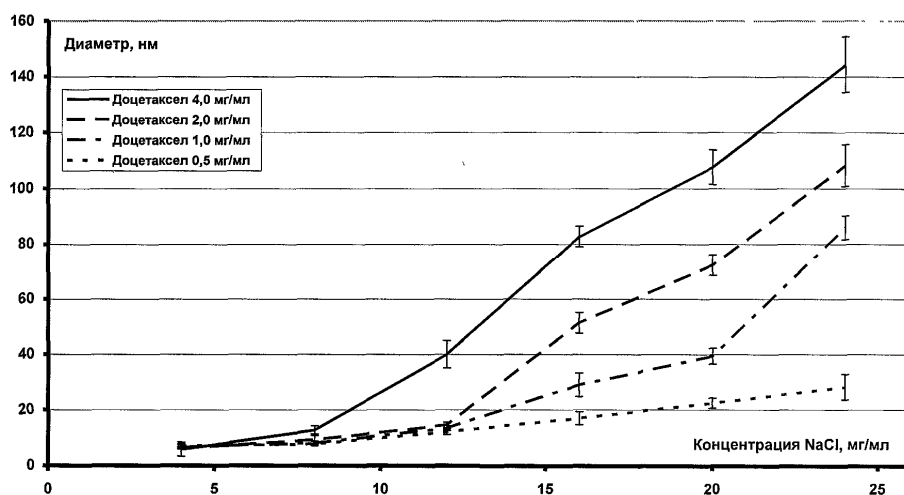
29. Способ посталлогенной трансплантации органа, включающий введение фармацевтической композиции по п.13 в терапевтически эффективном количестве нуждающемуся в указанном лечении пациенту.

30. Применение фармацевтической композиции по п.13 для получения лекарственного средства для применения при посталлогенной трансплантации органа.

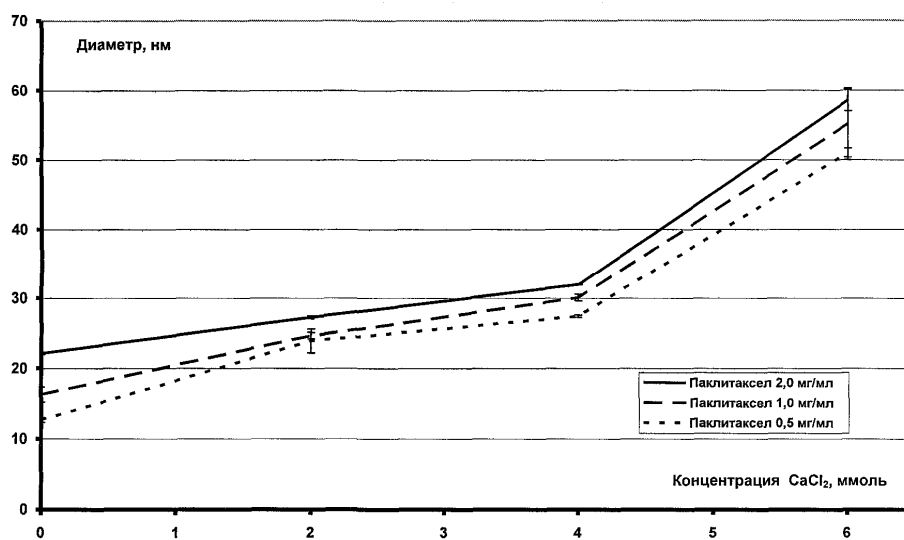
31. Способ посталлогенной трансплантации органа, включающий введение системы доставки лекарства по любому из пп.8-10 в терапевтически эффективном количестве нуждающемуся в указанном лечении пациенту.



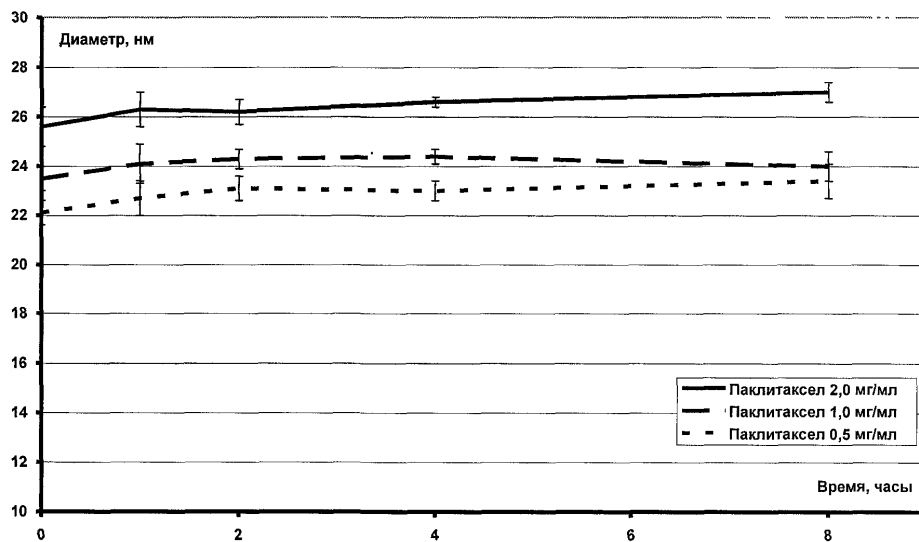
Фиг. 1



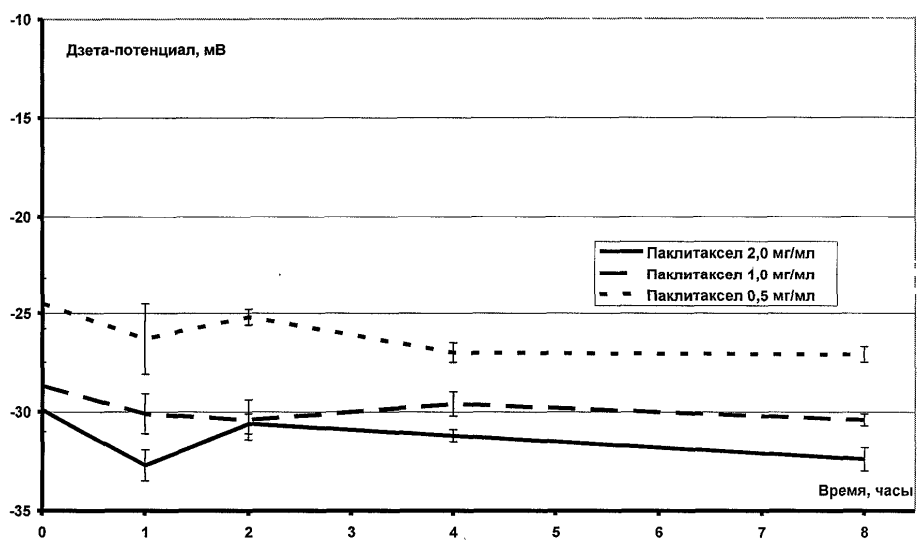
Фиг. 2



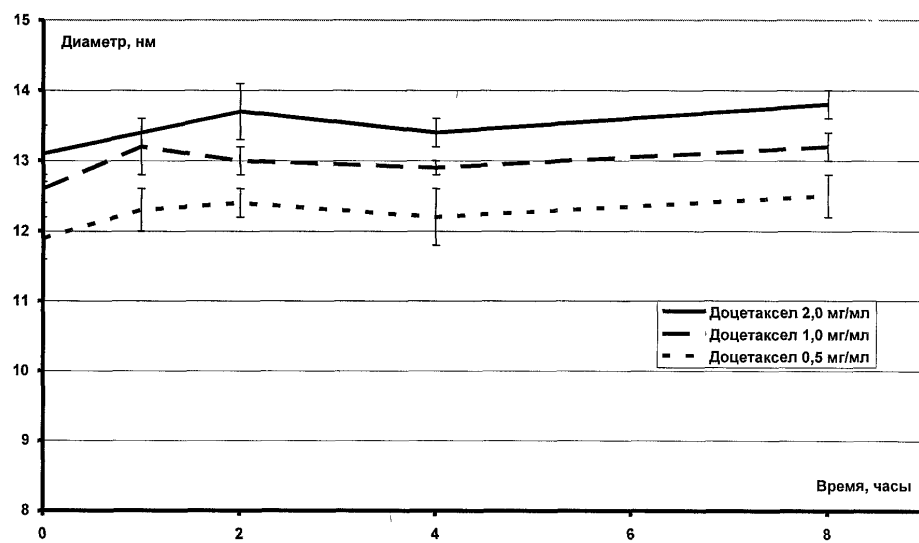
Фиг. 3



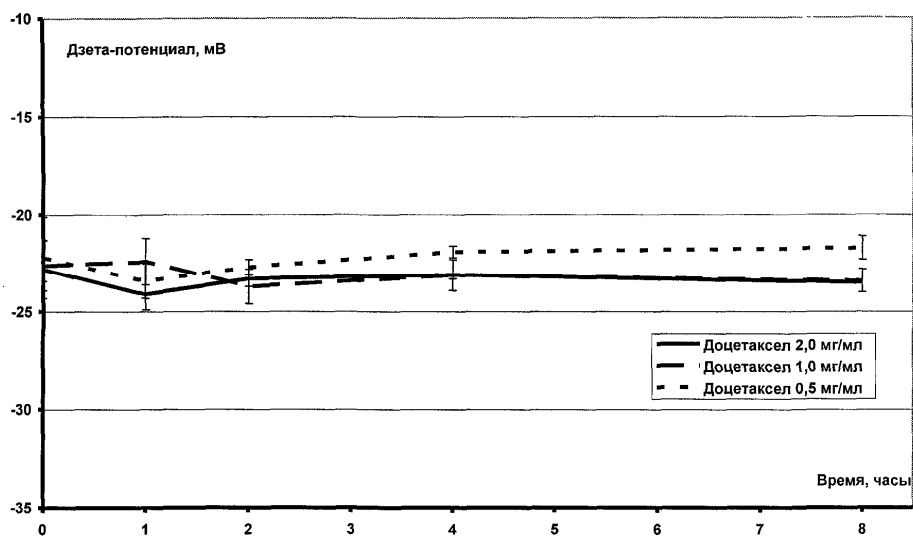
Фиг. 4



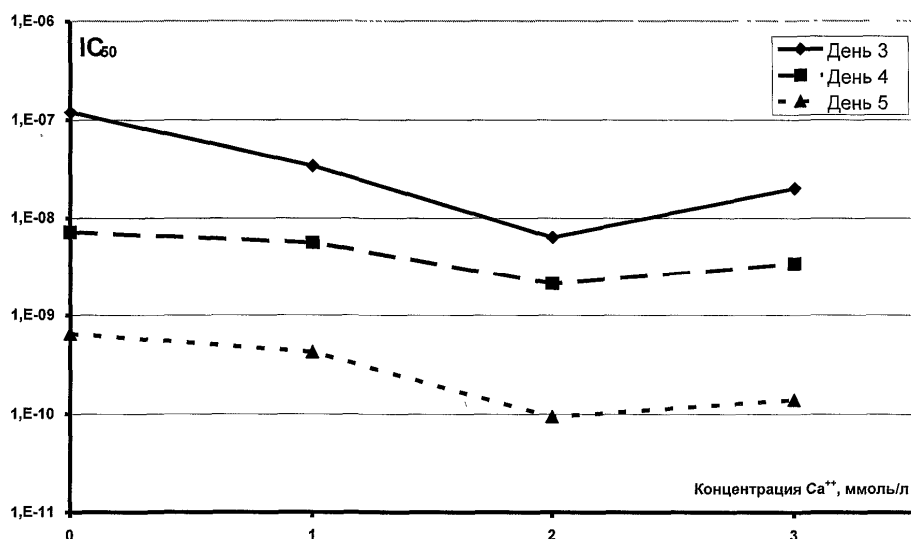
Фиг. 5



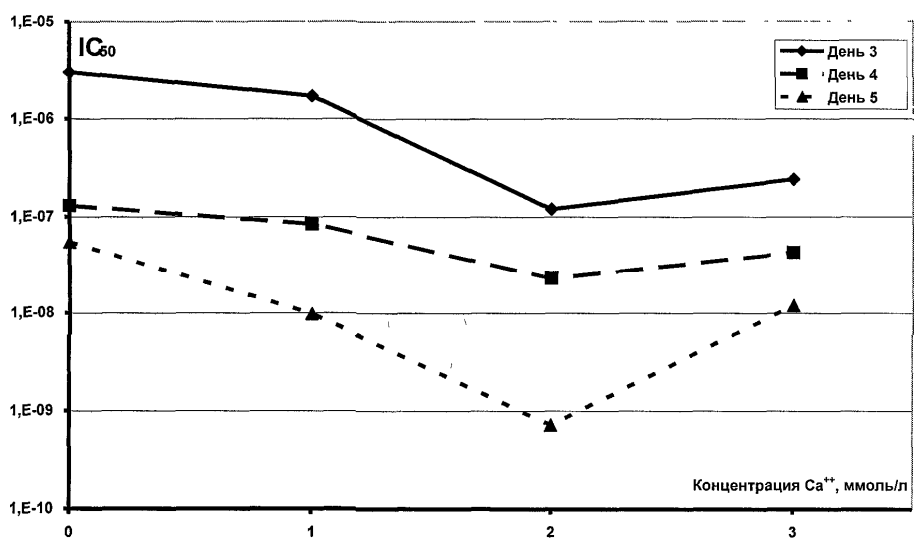
Фиг. 6



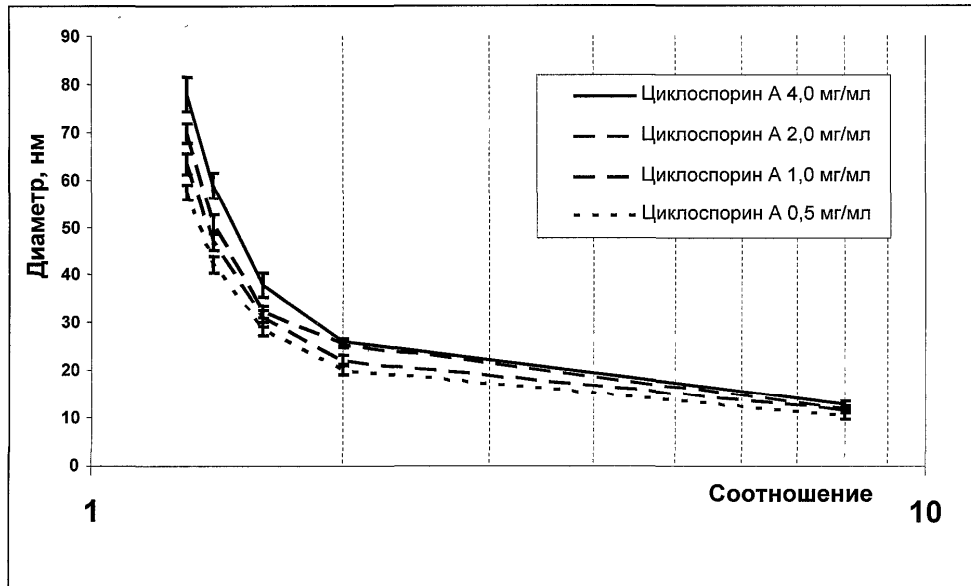
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

