

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035820**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.17

(21) Номер заявки
201692213

(22) Дата подачи заявки
2015.05.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/353* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C08G 65/331 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

(54) **МИЦЕЛЛЯРНЫЙ НАНОКОМПЛЕКС, СПОСОБ ЕГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ, КОНЬЮГАТ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ**

(31) **10201402244S**

(32) **2014.05.09**

(33) **SG**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/SG2015/050104**

(87) **WO 2015/171079 2015.11.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЙДЖЕНСИ ФОР САЙЕНС,
ТЕКНОЛОДЖИ ЭНД РИСЕРЧ (SG)**

(56) **WO-A1-2006124000
WO-A1-2009054813
WO-A1-2011112156
WO-A1-2015034436**

(72) Изобретатель:
**Мотоичи Курисава, Нуннарпас
Юнвонсоонтонн, Ин Джеки Я., Чун
Джоо Эун, Бае Ки Хюн, Тан Мин-хан,
Ли Эстер (SG)**

(74) Представитель:
Виноградов С.Г. (BY)

(57) Изобретение относится к мицеллярным наноконкомплексам, к способу их изготовления и применению. Мицеллярный наноконкомплекс включает мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом мицелла включает конъюгат полимер-флавоноид, в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения. Способ включает в себя стадии растворения полимера и флавоноида для получения конъюгата полимер-флавоноид и добавления терапевтического вещества к конъюгату полимер-флавоноид, обеспечивая самосборку мицеллы и инкапсулирование указанного вещества в мицелле. Изобретение также относится к способу лечения опухолей путем введения указанного наноконкомплекса онкопациенту и к применению мицеллярного наноконкомплекса при производстве лекарственных препаратов для лечения опухолей.

B1**035820****035820****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к мицеллярным наноконкомплексам для доставки лекарственных препаратов и к способу их изготовления. Настоящее изобретение также относится к конъюгату полимер-флавоноид, включающему полимер, связанный с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения, и к способу изготовления конъюгата.

Предпосылки создания изобретения

Химиотерапия, являющаяся одним из наиболее распространенных методов лечения раковых заболеваний, предусматривает использование цитотоксичных лекарственных препаратов, вводимых онкопациенту перорально или парентерально. Основная проблема при введении известных противораковых препаратов заключается в их неспецифическом распределении в организме, что приводит к токсичности, вызывающей тяжелые побочные эффекты. Кроме того, терапевтический эффект пероральных лекарственных препаратов ограничен их низкой биодоступностью ввиду того, что препараты должны пройти по желудочно-кишечному тракту. В течение нескольких последних десятилетий исследователи сосредоточили свои усилия на разработке систем доставки лекарственных препаратов с целью устранения ограничений известных методов введения препаратов путем улучшения фармакокинетики и биораспределения лекарственных препаратов.

В последние годы велись широкие исследования в целях изучения катехинов зеленого чая ввиду их лечебно-профилактических свойств, включающих профилактику сердечно-сосудистых и раковых заболеваний. Из всех катехинов (-)-эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) содержится в зеленом чае в наибольшем количестве и считается, что он играет основную роль в лечебном эффекте зеленого чая. Многочисленные исследования продемонстрировали, что EGCG обладает антиоксидантным, антидиабетическим, антибактериальным, противовоспалительным и гипохолестеринемическим действием. Более того, было продемонстрировано, что он эффективно ингибирует рост опухолей и метастазы, таргетируя несколько путей сигнальной трансдукции, являющихся исключительно важными для выживания раковых клеток.

Несмотря на указанные желательные функции EGCG, его клиническое применение было ограничено ввиду низкой стабильности и низкой пероральной биодоступности.

Например, EGCG является нестабильным и быстро распадается в условиях физиологической среды. Также сообщалось, что EGCG имеет короткий период полужизни, составляющий менее 30 мин в фосфатно-солевом буферном растворе (фосфатно-солевом буфере) 0,05 М (pH 7,4) при 37°C. Кроме того, большая часть усвоенного EGCG подвергается глубокому гидролизу в желудочном соке и метаболической деградации в желудочно-кишечном тракте. В результате этого после перорального введения концентрации EGCG в плазме, необходимые для достижения требуемого терапевтического эффекта, не могут быть достигнуты.

Таким образом, существует необходимость в создании системы доставки лекарственных препаратов, которая позволяет преодолеть или, по меньшей мере, частично устранить один или несколько из вышеприведенных недостатков. Также существует необходимость в создании способа изготовления такой системы доставки лекарственных препаратов.

Краткое изложение существа изобретения

В соответствии с первым аспектом предусматривается создание мицеллярного наноконкомплекса, включающего мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом мицелла включает конъюгат полимер-флавоноид, в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения.

Предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомплексы могли быть использованы в качестве систем доставки лекарственных препаратов. Мицеллярные наноконкомплексы имеют малый размер и высокую эффективность включения действующего вещества, приемлемую для направленной доставки лекарственного вещества к опухоли. Кроме того, предпочтительно, чтобы было достигнуто пролонгированное высвобождение терапевтического вещества с помощью мицеллярных наноконкомплекс в физиологических условиях. Еще более предпочтительно, чтобы наноконкомплексы могли представлять собой перспективное средство доставки для широкого диапазона водонерастворимых противоопухолевых препаратов. Также предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомплексы были способны существенно подавлять рост опухолей при пониженной токсичности, связанной с введением препарата в организм. Более предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомплексы могли представлять собой уникальную и эффективную систему доставки лекарственных препаратов с синергетическим терапевтическим действием, создаваемым системой доставки лекарственных препаратов или мицеллой-носителем и лекарством.

Терапевтическое вещество может представлять собой доксорубин. Предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомплексы, инкапсулирующие доксорубин, могли проявлять пролонгированное высвобождение лекарственного препарата. Указанное пролонгированное высвобождение лекарственного препарата может быть обусловлено активным взаимодействием между EGCG и доксорубином внутри мицеллярных наноконкомплекс. Кроме того, предпочтительно, чтобы в некоторых примерах осуществления настоящего изобретения наблюдалось незначительное "взрывное" высвобождение на начальной стадии, указывающее на то, что молекулы доксорубина были стабильно инкапсулированы в мицеллярных наноконкомплекс. Такое слабое истечение лекарственного препарата может быть существенным для обес-

печения максимальной терапевтической эффективности при минимальных побочных эффектах, так как молекулы лекарственного препарата, инкапсулированные в наноконкомпексах, не смогут преждевременно высвободиться при циркулировании в кровяном потоке. Кроме того, предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомпексы могли быть применены для системного введения доксорубина при лечении рака.

Терапевтическое вещество может представлять собой сунитиниб (SU), и флавоноид может представлять собой эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG). Предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомпексы могли проявлять свойства пролонгированного высвобождения SU. Кроме того, предпочтительно, чтобы в ряде примеров осуществления настоящего изобретения практически не наблюдалось "взрывное" высвобождение, указывая на то, что молекулы SU были стабильно инкапсулированы в мицеллярных наноконкомпексах.

В примере осуществления настоящего изобретения флавоноид может представлять собой мономерный флавоноид. В другом примере осуществления настоящего изобретения флавоноид может представлять собой димерный флавоноид. Предпочтительно, чтобы мицеллярный наноконкомплекс, включающий мономерный флавоноид, мог проявлять более быстрое высвобождение SU и в большем количестве по сравнению с мицеллярными наноконкомпексами, включающими димерный флавоноид. Предпочтительно, чтобы обеспечивалось более активное взаимодействие между SU и димерным флавоноидом.

Предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконкомпексы позволили минимизировать неблагоприятные побочные эффекты таких терапевтических веществ, как SU, за счет стабильного инкапсулирования активного вещества внутри мицеллярных наноконкомпексов и обеспечили его доставку к целевой локализации. Таким образом, мицеллярный наноконкомплекс способен обеспечить благоприятный синергетический эффект между SU и EGCG.

Далее предпочтительно, чтобы мицеллярный наноконкомплекс, включающий SU, мог оказывать усиленный противоопухолевый эффект *in vivo* по сравнению со свободным SU. Более предпочтительно, чтобы мицеллярный наноконкомплекс, включающий SU, мог оказывать меньший неблагоприятный эффект *in vivo* по сравнению со свободным SU. Кроме того, предпочтительно, чтобы требовалась меньшая дозировка мицеллярного наноконкомпекса, включающего SU, по сравнению со свободным SU для достижения аналогичного эффекта. Еще более предпочтительно, чтобы обеспечивалось сохранение ингибирующего действия мицеллярного наноконкомпекса, включающего SU, в течение длительного периода времени даже после прекращения проведения курса терапии.

Кроме того, предпочтительно, чтобы мицеллярный наноконкомплекс, включающий SU, обеспечивал снижение концентраций свободного SU в плазме, что, в свою очередь, обеспечивало бы сокращение побочных эффектов, вызываемых SU. Также предпочтительно, чтобы снижение концентрации SU в плазме было обусловлено взаимодействием между флавоноидом и SU, а также эффектом повышенной проницаемости и удержания (EPR), создаваемым мицеллярными наночастицами.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предусматривается создание способа изготовления мицеллярного наноконкомпекса, включающего мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом способ включает следующие этапы:

(a) растворение полимера и флавоноида в растворе с образованием конъюгата полимер-флавоноид с помощью реакции нуклеофильного присоединения в обычных условиях, в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2', и раствор содержит воду, буфер и растворитель; и

(b) добавление указанного вещества к конъюгату полимер-флавоноид, обеспечивая тем самым самосборку мицеллы, включающей конъюгат полимер-флавоноид, и инкапсулирование вещества в мицелле для образования мицеллярного наноконкомпекса.

Предпочтительно, чтобы наноконкомплекс являлся самособираемым в присутствии конъюгата полимер-флавоноид и терапевтического вещества. Далее предпочтительно, чтобы образование наноконкомпекса было достигнуто за счет использования свойств связывания флавоноидов с веществами.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения предусматривается создание конъюгата полимер-флавоноид, включающего полимер, связанный с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения.

Предпочтительно, чтобы флавоноид конъюгировался с полимером. В примере осуществления настоящего изобретения полимер может представлять собой полиэтиленгликоль (PEG). Предпочтительно, чтобы предотвращался как почечный клиренс полимерных наночастиц, так и их захват ретикулоэндотелиальной системой (RES), в результате чего обеспечивалось бы в последующем накопление наночастиц в тканях опухоли за счет эффекта проницаемости и удержания. Более предпочтительно, чтобы стабилизированные PEG мицеллы проявляли длительный период полужизни в плазме по сравнению с немодифицированными мицеллами ввиду того, что поверхностные цепи PEG предотвращают распознавание и клиренс ретикулоэндотелиальной системой в организме. Далее предпочтительно, чтобы PEG мог быть использован для модифицирования поверхности полимерных мицелл и наночастиц для создания незагрязняющихся поверхностей.

В соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматривается создание способа изготовления конъюгата полимер-флавоноид в соответствии с вышеприведенным определением,

включающего этап конъюгирования флавоноида с полимером посредством нуклеофильного присоединения при основных условиях, в котором полимер имеет свободную нуклеофильную группу.

Предпочтительно, чтобы конъюгаты полимер-флавоноид могли быть синтезированы путем нуклеофильного присоединения при щелочном pH. Предпочтительно, чтобы конъюгирование могло быть завершено путем нуклеофильного присоединения нуклеофильной группы, такой как тиольная группа полимера, такого как PEG в положении C2' В-кольца флавоноида при контролируемых условиях pH.

В примере осуществления настоящего изобретения полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG), и свободная нуклеофильная группа представляет собой тиольную группу. Предпочтительно, чтобы электрон-дефицитный ортохинон флавоноида, такой как EGCG, мог вступать в реакцию с нуклеофильной группой, такой как тиольные группы. Тиольные группы присутствуют в широком диапазоне биомолекул, включая цистеин, глутатион и белки. EGCG может связываться ковалентно с цистеиновыми остатками в мембранных эритроцитов человека белках и в глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH). Кроме того, ковалентные аддукты EGCG могут образовываться при окислении в присутствии цистеина и глутатиона. При этом предпочтительно, чтобы полученные цистеиновые конъюгаты EGCG могли проявлять более высокую прооксидантную активность, чем EGCG, сохраняя при этом активность ингибирования роста и противовоспалительную активность. Более предпочтительно, чтобы N-ацетилцистеин-конъюгированный EGCG был способен повышать рост-ингибиторный эффект и апоптоз-индуцирующий эффект EGCG против клеток рака легких мыши и человека.

В соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения предусматривается использование мицеллярного наноконплекса, включающего мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, в качестве средства доставки лекарственного препарата, в котором мицелла включает конъюгат полимер-флавоноид, и в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения.

В соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения предусматривается создание способа лечения опухоли, включающего этап введения мицеллярного наноконплекса, как указано выше, онкопациенту.

Предпочтительно, чтобы мицеллярный наноконплекс мог обладать более сильным противораковым эффектом по сравнению со средством в свободной форме. Кроме того, предпочтительно, чтобы мицеллярные наноконплексы могли свести до минимума неблагоприятные побочные эффекты таких веществ, как сунитиниб (SU) путем стабилизации инкапсулирования вещества внутри них, и доставки их к локализации. Такие системы доставки также могут обеспечить благоприятный синергетический эффект.

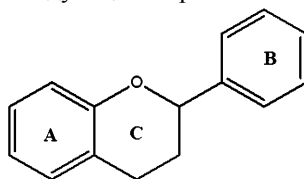
В соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения предусматривается создание мицеллярного наноконплекса, как указано выше, для лечения опухоли.

В соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения предусматривается использование мицеллярного наноконплекса, как указано выше, при производстве лекарственного препарата для лечения опухоли.

Определения

Следующие слова и термины употребляются в настоящем описании в нижеуказанных значениях.

"В-кольцо" флавоноида обозначает необязательно замещенный фенил, связанный с бициклической структурой (бициклическая структура, состоящая из бензольного кольца (A), сконденсированного с 6-членным кольцом (C)). Необязательно замещенный фенил связан с 2-положением C-кольца. Для целей настоящего описания кольца помечены следующим образом:



Формула 1

Термин "эпигаллокатехингаллат" обозначает сложный эфир эпигаллокатехина и галлиевой кислоты и может быть использован взаимозаменяемо с "эпигаллокатехин-3-галлатом" или EGCG.

В целях настоящего документа фраза "конъюгаты PEG-EGCG" обозначает как конъюгаты PEG-mEGCG (мономерный EGCG), так и конъюгаты PEG-dEGCG (димерный EGCG), если не указано иное.

Слово "в основном" не исключает "полностью", например, композиция, которая "в основном не содержит" Y, может полностью не содержать Y. При необходимости слово "в основном" может быть опущено из определения настоящего изобретения.

Если иное не предусмотрено в настоящем контексте, термины "включающий" и "включает" и их грамматические варианты предназначены для представления "открытого", или "инклюзивного" языка, таким образом, чтобы они включали перечисленные элементы, но при этом также обеспечивали включение

ние дополнительных не перечисленных элементов.

В целях настоящего документа термин "приблизительно" в контексте концентраций компонентов композиций, как правило, $\pm 5\%$ от указанного значения, обычно $\pm 4\%$ от указанного значения, обычно $\pm 3\%$ от указанного значения, обычно, $\pm 2\%$ от указанного значения, более того, обычно $\pm 1\%$ от указанного значения, и более того, обычно $\pm 0,5\%$ от указанного значения.

По всему описанию настоящего изобретения некоторые примеры осуществления настоящего изобретения могут быть раскрыты в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено исключительно в целях удобства и краткости и не должно истолковываться как негибкое ограничение раскрытых диапазонов. Соответственно, описание диапазона должно восприниматься как специфически раскрывающее все возможные под диапазоны, а также отдельные числовые значения в таком диапазоне. Например, такое описание диапазона, как от 1 до 6 должно рассматриваться как специфически раскрывающее под диапазоны от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числовые значения в таком диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применяется независимо от ширины диапазона.

В данном контексте некоторые примеры осуществления настоящего изобретения могут быть описаны в обобщенном или в широком смысле. Каждый из более узких признаков из субгенерических группировок, находящихся в пределах раскрытия изобретения в широком смысле, также образует часть описания изобретения. Это включает описание примеров осуществления настоящего изобретения в широком смысле с оговоркой или негативным ограничением, исключающим любой предмет из класса объектов независимо от того, была ли, в частности, дана ссылка на исключенный материал или нет.

Подробное описание примеров осуществления настоящего изобретения

Ниже приведено описание иллюстративных неограничивающих примеров осуществления мицеллярного наноконплекса.

Мицеллярный наноконплекс может включать мицеллу и вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом мицелла включает конъюгат полимер-флавоноид, в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения.

По меньшей мере один флавоноид может быть связан с полимером. По меньшей мере два флавоноида могут быть связаны с полимером.

Полимер может быть связан с флавоноидом посредством линкера. Линкер может являться любой химической группой, способной связать полимер и флавоноид. Линкер может быть выбран из группы, включающей тиоэфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группу.

Флавоноид может быть выбран из группы, включающей мономерный флавоноид или димерный флавоноид, при этом по меньшей мере один флавоноид связан с В-кольцом. Мономерный флавоноид может включать одну молекулу флавоноида. Димерный флавоноид может включать две молекулы флавоноида, связанные вместе линкером. Одна из молекул флавоноида димерного флавоноида может быть связана с полимером. Обе молекулы флавоноида димерного флавоноида могут быть независимо связаны с полимером. Когда один флавоноид присутствует в конъюгате, флавоноид связан с полимером посредством В-кольца. Когда один флавоноид связан с конъюгатом, флавоноид связан с полимером посредством D-кольца.

Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один из флавоноидов связан с полимером посредством В-кольца. По меньшей мере другой флавоноид связан с полимером посредством А-кольца. Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один из флавоноидов связан с полимером посредством В-кольца. По меньшей мере другой флавоноид связан с полимером посредством В-кольца. Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один из флавоноидов связан с полимером посредством В-кольца. По меньшей мере другой флавоноид связан с полимером посредством D-кольца.

Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один флавоноид связан с полимером посредством D-кольца. По меньшей мере другой флавоноид связан с полимером посредством А-кольца. Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один флавоноид связан с полимером посредством D-кольца. По меньшей мере другой флавоноид связан с полимером посредством В-кольца. Когда более чем один флавоноид присутствует в конъюгате, по меньшей мере один флавоноид связан с полимером посредством D-кольца. По меньшей мере, другой флавоноид связан с полимером посредством D-кольца.

Полимер может являться гидрофильным полимером. Гидрофильный полимер может включать мономер, выбранный из группы, включающей акриламиды, алкилы, оксазолины, алкенилы, имины, акриловые кислоты, метакрилаты, диолы, оксираны, спирты, амины, ангидриды, сложные эфиры, лактоны, карбонаты, карбоновые кислоты, акрилаты, гидроксилы, фосфаты, терефталаты, амиды и простые эфиры.

Гидрофильный полимер может быть выбран из группы, включающей полиакриламид, поли-N-изопропилакриламид, полиоксазолин, полиэтиленмин, полиакриловую кислоту, полиметакрилат, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, поливинилпирролидинон, простые полиэфиры,

полиаллиламин, полиангидриды, поли- β -аминоэфир, полибутиленсукцинат, поликапролактон, поликарбонат, полидиоксанон, полиглицерин, полиглицолиевую кислоту, поли-3-гидроксипропионовую кислоту, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, поли-2-гидроксипропилметакриламид, полимолочную кислоту, сополимер молочной и гликолевой кислот, сложные полиортоэфиры, поли-2-оксазолин, полисебаценовую кислоту, сополимер терефталата и фосфата и их сополимеры.

Гидрофильный полимер может являться полисахаридом. Полимер может являться полисахаридом, выбранным из группы, включающей гиалуроновую кислоту, декстран, поллулан, хитозан, целлюлозу, амилозу, крахмал, желатин, каррагенан, циклодекстрин, сульфат декстрана, Фиколл, геллановую камедь, гуаровую камедь, пектин, полисахарозу, поллулан, склероглюкан, ксантан, ксилоглюкан и алгинат.

Флавоноид может быть выбран из группы, включающей флавоны, изофлавоны, флаваны, проантоцианидины и антоцианидины.

Флаваны могут быть выбраны из группы, включающей (-)-эпикатехин, (+)-эпикатехин, (-)-катехин, (+)-катехин, эпикатехингаллат, эпигаллокатехин, эпигаллокатехингаллат, физетинидол, галлокатехин, галлокатехингаллат, мескитол и робинетинидол, эллагитаннин, галлотаннин, улунтеанин, флоротаннин, таннин, теацитрин, теадибензотрополон, теафлавин, теанафтохинон, теарубигины, теазиненсин и их смеси.

Терапевтическое вещество может являться химиотерапевтическим средством, выбранным из группы, включающей алкилирующие агенты, антрациклины, дискрипторы цитоскелета, эпотилоны, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, ингибиторы киназы, моноклональные антитела, конъюгаты антитела с лекарственным препаратом, нуклеотидные аналоги, пролекарства, пептидные антибиотики, Pt-содержащие препараты, ретиноиды, алкалоиды винка, цитокины, антиметаболиты и производные алкалоидов винка, а также иные цитотоксические препараты.

Химиотерапевтическое средство может быть выбрано из группы, включающей актиномицин, афатиниб, политрансретиноевую кислоту, акситиниб, азацидин, азатиоприн, бевацизумаб, блеомицин, бозутиниб, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цетуксимаб, цисплатин, хлорамбуцил, кризотиниб, циклофосфамид, цитарабин, дазатиниб, даунорубин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубин, эпирубицин, эпотилон А ($C_{26}H_{39}NO_6S$), Эпотилон В ($C_{27}H_{41}NO_6S$), эпотилон С ($C_{26}H_{39}NO_5S$), эпотилон D ($C_{27}H_{41}NO_5S$), эпотилон Е ($C_{26}H_{39}NO_7S$), эпотилон F ($C_{27}H_{41}NO_7S$), эрлотиниб, этопозид, фторурацил, фостаматиниб, гефитиниб, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубин, иматиниб, иринотекан, лапатиниб, ленватиниб, мехлорэтамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, nilотиниб, оксалиплатин, паклитаксел, панитумумаб, пазопаниб, пегаптапаниб, пеметрексед, ранибизумаб, Регорафениб, руксолинтиниб, сорафениб, сунитиниб, трастузумаб, тенипозид, тиогуанин, тофацитиниб, топотекан, валрубицин, вемурафениб, винбластин, винкрестин, виндезин и винорелбин.

Сунитиниб (SU) представляет собой многоцелевой ингибитор тирозинкиназы и терапию первой линии для светлоклеточного рака почки (ccRCC). В частности, SU таргетирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGF), которые играют важную роль в ангиогенезе и пролиферации опухоли, что приводит к снижению васкуляризации опухоли, а также к гибели раковых клеток. Указанный ингибитор был одобрен для применения при лечении прогрессирующего светлоклеточного рака почки, гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST) и нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (pNET). Также было показано, что данный ингибитор эффективен для лечения метастатического рака молочной железы, прогрессирующего немелкоклеточного рака легкого, прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномы, нейроэндокринных опухолей и лейкемии. Тем не менее, он может вызывать тяжелые побочные эффекты, такие как гепатитная, сердечная и гастроинтестинальная токсичность, гипертензию, кожные заболевания и акральную эритему.

Размер мицеллярного наноконплекса может находиться в диапазоне 30-300 нм, 50-300 нм, 100-300 нм, 30-50 нм, 30-100 нм, 30-150 нм, 150-300 нм, 200-300 нм, 250-300 нм, 100-150 нм, 100-200 нм, 100-250 нм, 130-180 нм или 130-250 нм.

Относительное содержание терапевтического вещества, заключенного в мицелле мицеллярного наноконплекса, может находиться в диапазоне 1-10 вес.%, 5-25 вес.%, 20-45 вес.%, 30-50 вес.%, 35-50 вес.%, 40-50 вес.%, 45-50 вес.%, 30-35 вес.%, 30-40 вес.% или 30-45 вес.%.

В другом аспекте настоящее изобретения мицеллярный наноконплекс выступает в качестве средства доставки лекарственного препарата.

Способ изготовления мицеллярного наноконплекса может включать мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом способ включает следующие этапы:

а) растворение полимера и флавоноида в растворе с образованием конъюгата полимер-флавоноид с помощью реакции нуклеофильного присоединения в обычных условиях, в указанном конъюгате полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2'; и раствор содержит, воду, буфер и растворитель; и

б) добавление указанного вещества к конъюгату полимер-флавоноид, обеспечивая тем самым самосборку мицеллы, включающей конъюгат полимер-флавоноид, и инкапсулирование вещества в мицелле для образования мицеллярного наноконплекса.

Этап (b) может дополнительно включать следующие этапы:

а) удаление растворителя для формирования сухой пленки терапевтического вещества и конъюгата

полимер-флавоноид;

б) гидратирование сухой пленки водным растворителем.

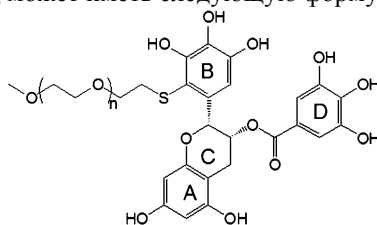
Конъюгат полимер-флавоноид может включать полимер, связанный с В-кольцом флавоноида в положении 2' посредством линкера, выбранного из группы, включающей тиоэфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группу.

Полимер конъюгата полимер-флавоноид может быть выбран из группы, включающей полисахарид, полиакриламид, поли-N-изопропилакриламид, полиоксазолин, полиэтиленмин, полиакриловую кислоту, полиметакрилат, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, поливинилпирролидинон, простые полиэфиры, полиаллиламин, полиангидриды, поли-β-аминоэфир, полибутиленсукцинат, поликапролактон, поликарбонат, полидиоксанон, полиглицерин, полиглицолиевую кислоту, поли-3-гидроксипропионовую кислоту, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, поли-2-гидроксипропилметакриламид, полимолочную кислоту, сополимер молочной и гликолевой кислот, сложные полиортоэфиры, поли-2-оксазолин, полисебациновую кислоту, сополимер терефталата и фосфата и их сополимеры.

Флавоноид конъюгата полимер-флавоноид может быть выбран из группы, включающей (-)-эпикатехин, (+)-эпикатехин, (-)-катехин, (+)-катехин, эпикатехингаллат, эпигаллокатехингаллат, физетинидол, галлокатехин, галлокатехингаллат, мескитол и робинетинидол, эллагитаннин, галлотаннин, улунтеанин, флоротаннин, таннин, теацитрин, теадибензотрополон, теафлавин, теанафтохинон, теарубигины, теазиненсин и их смеси.

Полимер может быть конъюгирован с флавоноидом в конъюгате полимер-флавоноид посредством линкера, выбранного из группы, включающей тиоэфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группу.

Конъюгат полимер-флавоноид может иметь следующую формулу:



Формула 2

в которой n находится в диапазоне 20-910.

Способ изготовления конъюгата полимер-флавоноид может включать этап конъюгирования флавоноида с полимером посредством нуклеофильного присоединения при основных условиях, в котором полимер имеет свободную нуклеофильную группу.

Нуклеофильная группа может быть выбрана из группы, включающей тиольную, аминную, диазоалкановую и азидную группы.

Нуклеофильная группа может являться тиольной группой. EGCG может окисляться в присутствии кислорода, образуя ортохинон по каскаду реакций с участием радикалов семихинона и активных форм кислорода. Электрон-дефицитный ортохинон EGCG может вступать в реакцию с нуклеофильной тиольной группой, присутствующей в различных биомолекулах, включающих цистеин, глутатион и белки. EGCG может связываться ковалентно с остатками цистеина в мембранных белках эритроцитов человека и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH). Ковалентные аддукты EGCG могут образовываться при окислении в присутствии цистеина и глутатиона. Полученные цистеиновые конъюгаты EGCG могут проявлять более высокую прооксидантную активность по сравнению с EGCG, сохраняя при этом активность ингибирования роста и противовоспалительную активность. Кроме того, N-ацетилцистеин-конъюгированный EGCG способен повышать рост-ингибиторный эффект и апоптоз-индуцирующий эффект EGCG против клеток рака легких мыши и человека.

Способ лечения опухоли может включать этап введения мицеллярного наноконплекса онкопациенту.

Мицеллярный наноконплекс может быть введен парентерально, с помощью аэрозоли для ингаляции, топикально, ректально, назально, буккально, вагинально, посредством имплантированной емкости, путем инъекции, субдермально, интраперитонеально, трансмукозально, перорально или в виде офтальмологического препарата.

Парентеральное введение может включать следующие методы введения: подкожно, внутрикожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно, внутриартериально, внутрисиновиально, интратерально, интратекально, внутриочагово, а также способом внутричерепной инъекции и инфузии.

Вещество, находящееся в мицеллярном наноконплексе, может быть введено при дозе 1-80 мг/кг в день. Онкопациент может страдать от рака, выбранного из группы, включающей аденокортикальную

Краткое описание чертежей

Фиг. 12 – диаграммы, иллюстрирующие (А) эффективность включения действующего вещества и (В) относительное содержание действующего вещества мицеллярных наноккомплексов SU/PEG-EGCG.

приготовленных при различных весовых соотношениях PEG-EGCG:SU.

Фиг. 13 - диаграммы, иллюстрирующие кривую высвобождения лекарственного вещества *in vitro* мицеллярных наноконплексов (А) SU/PEG-mEGCG и мицеллярных наноконплексов (В) SU/PEG-dEGCG при различных весовых соотношениях PEG-EGCG: SU в фосфатно-солевом буфере (pH 7,3) при 37°C.

Фиг. 14 - диаграмма, иллюстрирующая ежедневное измерение веса тела мышей, проходящих ежедневный курс лечения при пероральном введении SU (60 мг/кг), по сравнению с мышами, получающими Мицеллярные наноконплексы SU/PEG-EGCG (с заданными весовыми соотношениями PEG-EGCG: SU), и с контрольной группой.

Фиг. 15 - изображения, иллюстрирующие (А) размер опухоли (количественно определенную по люминесцентному сигналу) и (В) люминесцентное изображение мышей, проходящих лечение с использованием SU/PEG-EGCG мицеллярного наноконплекса (с заданным весовым соотношением PEG-EGCG:SU), лечение с пероральным введением SU или не проходящих лечение.

Фиг. 16 - диаграмма, иллюстрирующая измерение веса тела мышей, проходящих ежедневный курс лечения при пероральном введении SU (40 и 15 мг/кг), по сравнению с мышами, получающими SU/PEG-mEGCG (8:1) мицеллярные наноконплексы, и с контрольной группой.

Фиг. 17 - диаграмма, иллюстрирующая размер опухолей у мышей, проходящих курс лечения при пероральном введении SU/PEG-mEGCG (8:1) мицеллярного наноконплекса, курс лечения при пероральном введении SU, и не проходящих лечение.

Примеры

Ниже приведено более подробное описание неограничивающих примеров настоящего изобретения и сравнительного примера со ссылкой на конкретные примеры, которые не должны истолковываться никоим образом как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Материалы и культура клеток.

Материалы.

Метокси-полиэтиленгликоль с тиоловым концом (PEG-SH, $M_w=5000$ Да) приобретали у компании "JenKem Technology" (Китай). Метокси-полиэтиленгликоль с альдегидным концом (PEG-CHO, $M_w=5000$ Да) приобретали у компании "NOF Co.", Япония. (-)-Эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG, >95% чистота) приобретали у компании "Kurita Water Industries" (Токио, Япония). Раствор пирувата натрия (100 ммоль/л) закупали у компании "Invitrogen" (Сингапур). Фосфатно-солевой буферный раствор без Ca^{2+} и Mg^{2+} (150 ммоль/л, pH 7,3) поставлялся предприятием по приготовлению сред в Биополисе, Сингапур. Диметилсульфоксид (ДМСО) и триэтиламин (ТЭА) приобретали у компании "Sigma-Aldrich" (Сингапур). Доксорубинагидрохлорид (DOX-HCl) приобретали у компании "Boryung Pharm. Inc." (Корея). SU (основная форма) приобретали у компании "BioVision" (США). Все другие химические вещества имели аналитическую степень чистоты.

Культура клеток.

Клетки почечно-клеточной карциномы человека A498 были приобретены у компании "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, VA, USA) и культивированы в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина, 2 ммоль/л глутамина и 0,1 ммоль/л неосновных аминокислот. Стабильный клон клеток A498, экспрессирующий ген люциферазы (A498-luc), был получен, как описывалось выше. Вкратце, клетки A498 высевали на 6-луночном планшете при плотности 5×10^5 клеток/луночку и трансфицировали плазмидой pRC-CMB2-luc, используя липофектамин 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Спустя 1 день трансфицированные клетки переносили в 100-мм чашку для культивирования клеток и в среду добавляли 1 мг/мл генетина для отбора резистентных клеток. После 1 недели отбора резистентные клетки высевали на 96-луночном планшете при плотности 1 клетка/луночку для формирования колоний. В целом было отобрано и расширено 10 колоний и активность люциферазы измеряли с помощью набора Promega (Madison, WI, USA) в однотрубном люминометре (Berthold Lumat LB 9507, Bad Wildbad, Germany). Был выбран клон с наивысшей активностью люциферазы и сохранен с использованием 500 мг/мл генетина.

Пример 2. Конъюгаты PEG-EGCG.

В данном исследовании использовали два типа конъюгатов PEG-EGCG для формирования мицеллярных наноконплексов (PEG-mEGCG и PEG-dEGCG), которые имеют одну и две части EGCG на одном конце PEG соответственно.

Синтез конъюгата PEG-mEGCG.

Конъюгат PEG-mEGCG синтезировали путем конъюгирования EGCG с PEG, содержащим тиоловый конец. Как правило, EGCG (18,3 мг, 40 мкмоль/л) растворяли в 20 мл смеси фосфатно-солевого буфера и ДМСО в отношении 1:1 (объемное содержание). PEG-SH ($M_w=5000$ Да, JenKem Technology, China) (100 мг, 20 мкмоль/л) отдельно растворяли в 20 мл фосфатно-солевого буфера. Раствор PEG-SH по каплям добавляли к перемешиваемому раствору EGCG. В качестве контрольного эксперимента немодифицированный раствор PEG добавляли к перемешиваемому раствору EGCG при той же самой концентрации. Значение pH полученной смеси составляло 8,4. Смесь перемешивали в течение 7 ч при 25°C. К указанному раствору добавляли 1,6 мл 10% уксусной кислоты для корректировки pH до значения 4 с це-

лю прекращению реакции. Полученный раствор перемещали в диализные пробирки с номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ), составляющей 1000 Да. Пробирки диализировали против деионизированной воды. Очищенный раствор лиофилизировали с целью получения конъюгата PEG-mEGCG. Структура конъюгата PEG-mEGCG была подтверждена методом ^1H ЯМР-спектроскопии. Высушенный конъюгат PEG-mEGCG растворяли в D_2O при концентрации 20 мг/мл и затем анализировали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker AV-400, работающего при частоте 400 МГц. Выход: 89%. ^1H ЯМР (D_2O): δ 2,9 (t, H- α из PEG), 3,4 (s, H- γ из PEG), 3,5-3,8 (m, протонов PEG), 5,5 (s, H-2 C-кольца), 5,85 (s, H-3 C-кольца), 6,15 (d, H-6 и H-8 A-кольца), 6,9 (s, H-6' B-кольца), 7,05 (s, H-2" и H-6" D-кольца).

На фиг. 1 проиллюстрирована схема синтеза конъюгатов PEG-mEGCG (108). Тиол-функционализированный PEG (PEG-SH) (102) инкубировали с 2-кратным молярным избытком EGCG(PEG-SH: EGCG = 1:2) (104) в смеси ДМСО и воды при соотношении 1:3 (объемное содержание) при щелочном pH (106). Исходя из имеющейся информации значение pH оказывает существенное влияние на процесс автооксидации EGCG. При щелочном значении pH в диапазоне 7-9,5 галлиловая часть на В-кольце в большей степени подвержена автооксидации, чем галлатная часть на D-кольце. В результате этого исключительно галлиловая часть на В-кольце образует ортохинон. В сильнощелочной среде (pH >10) галлатная часть на D-кольце также может подвергнуться автооксидации, образуя орто-хинон. В настоящем исследовании реакцию проводили при значении pH 8,4 с целью обеспечения образования орто-хинона исключительно на В-кольце EGCG. Последующее нуклеофильное присоединение PEG-SH к орто-хинону позволяет получить конъюгаты PEG-mEGCG, связанные ковалентной связью простого тиоэфира.

Следует отметить, что реакция конъюгирования протекала в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО). Ввиду того, что EGCG подвергается агрегации при контакте с PEG в водном растворе, необходимо предотвратить агрегацию EGCG в процессе его конъюгирования с PEG-SH. Было обнаружено, что ДМСО эффективно предотвращал агрегацию. Исходя из этого открытия реакцию конъюгирования проводили в смеси ДМСО и воды. Кроме того, использовали пируват натрия в качестве поглотителя кислорода для H_2O_2 , образующегося в процессе автооксидации EGCG. Ввиду того, что пируват натрия защищает свободные тиольные группы от H_2O_2 -опосредованного окисления, он позволяет увеличить количество молекул PEG-SH, доступных для реакции конъюгирования с EGCG. Полученный конъюгат PEG-mEGCG очищали путем диализа в атмосфере азота и затем лиофилизировали для получения порошка белого цвета.

Определение характеристик конъюгата PEG-mEGCG в ультрафиолетовой и видимой области света.

Характеристики конъюгатов PEG-mEGCG были определены методом спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области света (фиг. 2).

Спектры в видимой и УФ-области конъюгатов PEG-mEGCG измеряли с помощью спектрофотометра Hitachi U-2810 (Япония). Для проведения спектроскопии в видимой и УФ-области высушенный конъюгат PEG-mEGCG и PEG растворяли в деионизированной воде при концентрации 0,5 мг/мл. В отличие от немодифицированного PEG (204) конъюгаты PEG-mEGCG (202), как было продемонстрировано, имеют интенсивный пик поглощения УФ при 280 нм, что указывает на успешное конъюгирование EGCG. Более того, не наблюдалась полоса поглощения УФ при 425 нм, соответствующая димерам EGCG и иным продуктам окисления.

Определение характеристик конъюгата PEG-mEGCG методом ВЭЖХ.

Также была проведена оценка конъюгата PEG-mEGCG методом обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Обратно-фазная ВЭЖХ была проведена с использованием сепарационного модуля Waters 2695, снабженного органической колонкой SpiritTM C18 (5 мкм, 4,6×250 мм внут. диам., AAPPТес). Смесь EGCG, PEG/EGCG и конъюгаты PEG-mEGCG растворяли в деионизированной воде при концентрации 1 мг/мл⁻¹. Образцы элюировали смесью растворителя 1% уксусной кислоты в ацетонитриле и 1% уксусной кислоты в воде при расходе 1 мл/мин при 25°C. Для мобильной фазы объемное отношение ацетонитрил:вода постепенно повышали от 3:7 на минуте 0 до 4:6 на 10-й минуте. Элюированные образцы контролировали при 280 нм. Степень конъюгирования EGCG определяли путем сравнения интегрированной площади пика с площадью, полученной из серии стандартных растворов EGCG различных концентраций. Как показано на фиг. 3, EGCG (302) элюировали при времени удерживания 4,8 мин, в то время как конъюгат PEG-mEGCG (304) элюировали при времени удерживания 8 мин. Такой существенный сдвиг времени удерживания можно было бы объяснить присоединением гидрофильной цепи PEG к EGCG. Кроме того, на ВЭЖХ-хроматограмме конъюгатов PEG-mEGCG не наблюдался пик EGCG, что дает основание полагать, что непрореагировавшие молекулы EGCG были полностью удалены в процессе диализа. Степень конъюгирования EGCG повысилась от ~63 до 98% ввиду увеличения времени реакции с 6 до 7 ч (фиг. 4). Тем не менее, при времени реакции, составляющем 8 ч, степень конъюгирования несколько снизилась, предположительно ввиду образования димеров EGCG и иных продуктов окисления. Следовательно, оптимальное время реакции составляло 7 ч.

Определение характеристик конъюгата PEG-mEGCG методом ^1H ЯМР.

Структура конъюгатов PEG-mEGCG была определена методом ^1H ядерной магнитно-резонансной спектроскопии. Как показано на фиг. 5, конъюгаты PEG-mEGCG отображали протонные сигналы для А-кольца (H-6 и H-8 при $\delta = 6,15$), С-кольца (H-2 при $\delta = 5,5$ и H-3 при $\delta = 5,85$) и D-кольца (H-2'' и H-6'' при $\delta = 7,1$). Протонные сигналы, исходящие от А, С и D-колец, были аналогичны сигналам немодифицированного EGCG, что дает основание предполагать, что указанные части остались неизменными в процессе реакции конъюгирования. В противоположность этому протонные сигналы от В-кольца были сдвинуты с 6,5 до 6,9 ppm после реакции конъюгирования. Указанный значительный сдвиг протонных сигналов, вероятно, был обусловлен присоединением PEG-SH к положению C2' В-кольца. Кроме того, было показано, что пик ЯМР для В-кольца имеет половину площади относительно пика для D-кольца, указывая на то, что один протон на В-кольце после реакции конъюгирования. Наблюдаемое явление согласовывалось с предыдущим сообщением, в соответствии с которым образование 2'-цистеинил EGCG приводило к исчезновению атома Н-2' из В-кольца. Вышеприведенные результаты выявили, что только одна молекула PEG могла быть конъюгирована именно с положением C2' В-кольца EGCG.

Синтез конъюгата PEG-dEGCG.

Конъюгаты PEG-dEGCG были синтезированы путем конъюгирования EGCG с PEG с альдегидной концевой группой (PEG-CHO). PEG-CHO ($M_w=5000$ Да, NOF Co., Япония) (1,75 г) и EGCG (3,25 г, 7,09 ммоль/л) отдельно растворяли в смеси уксусной кислоты, воды и ДМСО. Реакция была запущена путем добавления по каплям раствора PEG-CHO и была проведена при 20°C в течение 72 ч. Полученный раствор диализовали (НОММ = 3500 Da) против деионизированной воды. Очищенный раствор лиофилизировали с целью получения конъюгатов PEG-dEGCG.

Пример 3. Конъюгат доксорубицин/PEG-mEGCG.

Для применения в области лечения раковых заболеваний конъюгаты PEG-mEGCG были предназначены для формирования мицеллярных наноконплексов, способных доставлять большое количество противораковых лекарственных препаратов в своей внутренней части. В данном исследовании PEG-mEGCG мицеллярные наноконплексы использовали в качестве средства доставки для доксорубицина. Доксорубицин является одним из наиболее широко используемых химиотерапевтических средств и проявляет высокую цитотоксическую активность против различных типов рака, таких как лейкемия, рак груди, яичников и легких. Тем не менее, доксорубицин может вызвать тяжелую кардиотоксичность и повышение риска застойной сердечной недостаточности, сердечной аритмии, гипотонии и других побочных эффектов. Предполагается, что PEG-mEGCG мицеллярные наноконплексы способны свести до минимума неблагоприятные побочные эффекты путем стабильного инкапсулирования молекул лекарственного средства в своей внутренней части и их пролонгированного высвобождения.

Образование мицеллярных наноконплексов доксорубицин/PEG-mEGCG.

Мицеллярные наноконплексы доксорубицин/PEG-mEGCG приготавливали, используя метод диализа. Вкратце, 5 мг DOX-HCl растворяли в 4,5 мл диметилформамида. К этому раствору ТЕА добавляли при молярном отношении ТЕА:DOX-HCl 5:1. Указанную смесь интенсивно перемешивали в течение 30 мин для получения депротонированного доксорубицина (DOX). Полученный раствор DOX смешивали с конъюгатами PEG-mEGCG, растворенными в 0,5 мл диметилформамид при изменяющихся весовых соотношениях PEG-mEGCG/DOX. Указанную смесь интенсивно перемешивали в течение 90 мин и затем перемещали в диализные пробирки с НОММ = 2000 Да. Пробирки диализовали против деионизированной воды в течение 24 ч до получения мицеллярных наноконплексов доксорубицин/PEG-mEGCG.

Определение характеристик мицеллярных наноконплексов доксорубицин/PEG-mEGCG.

Оценку гидродинамических диаметров, коэффициентов полидисперсности и зета-потенциалы мицеллярных наноконплексов доксорубицин/PEG-mEGCG проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Измерения были проведены три раза в воде при 25°C. Для измерения количества содержащегося в наноконплексе доксорубицина, 20 мкл диспергированных в воде наноконплексов перемешивали в воде с 980 мкл диметилформамида для экстрагирования доксорубицина. Измеряли поглощающую способность доксорубицина при 480 нм с помощью спектрофотометра Hitachi U-2810 (Япония). Эффективность включения и относительное содержание действующего вещества определяли путем сравнения значений поглощающей способности со значениями, полученными на основе серии стандартных растворов доксорубицина при различных концентрациях.

На фиг. 6 проиллюстрировано формирование мицеллярных наноконплексов доксорубицин/PEG-mEGCG. Конъюгаты PEG-mEGCG (602) и доксорубицин(604) совместно растворяли в диметилформамиде (606). Указанную смесь диализовали против дистиллированной воды (608). После того как органический растворитель был удален из диализных пробирок, гидрофобные части EGCG в конъюгатах начинали самосборку и формировали мицеллярное ядро, окруженное оболочкой из гидрофильных цепей PEG (610). Одновременно молекулы доксорубицина также были разделены в гидрофобном мицеллярном ядре. Также сообщалось, что молекулы доксорубицина легко укладывались вместе в пакет в водном растворе за счет π - π взаимодействия между планарными антрациклиновыми кольцами. Ввиду того, что EGCG имеет полифенольную структуру, способную взаимодействовать с доксорубицином посредством

π - π стэкинга, предполагалось, что EGCG, накопленный в ядре мицеллярных наноконплексов, мог создать благоприятную среду для включения в них доксорубина. Кроме того, находящиеся на поверхности цепи PEG могли образовывать защитную оболочку вокруг мицеллярных наноконплексов для предотвращения клиренса ретикулоэндотелиальной системой, тем самым обеспечивая длительную циркуляцию в кровотоке.

Размер и поверхностный заряд мицеллярных наноконплексов доксорубин/PEG-mEGCG определяли методом динамического рассеяния света (ДРС). На фиг. 7 представлены диаграммы, иллюстрирующие (А) размер и (В) зета-потенциал мицеллярных наноконплексов доксорубин/PEG-mEGCG.

На фиг. 7А показан гидродинамический диаметр мицеллярных наноконплексов, приготовленных при различных весовых соотношениях PEG-mEGCG-доксорубин. В частности, размер полученных наноконплексов находился в диапазоне 130-180 нм. Такой малый размер является приемлемым для достижения длительной циркуляции в кровотоке и таргетирования опухоли за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания (EPR). Мицеллярные наноконплексы, образованные при весовом соотношении PEG-mEGCG: доксорубин 0,5:1, имеют больший диаметр по сравнению с наноконплексами, полученными при соотношении 1:1. Включение большего количества доксорубина, вероятно, обусловлено образованием более крупных мицеллярных наноконплексов. Наноконплексы были высокомоносодисперсными, что следует из низкого значения коэффициента полидисперсности (PDI), находящегося в диапазоне 0,1-0,2.

Как показано на фиг. 7В, мицеллярные наноконплексы имели положительный зета-потенциал в диапазоне 15-25 мВ. Указанный катионный поверхностный заряд был обусловлен инкапсулированием положительно заряженных молекул доксорубина внутри наноконплекса. Заявителями также была проведена оценка того, сохраняли ли мицеллярные наноконплексы свою структурную целостность в процессе сушки вымораживанием. Сушка вымораживанием является одним из наиболее широко используемых способов обеспечения долгосрочного хранения коллоидных наночастиц. Наноконплексы лиофилизировали и затем повторно диспергировали в деионизированной воде при такой же концентрации. Было обнаружено, что восстановленные наноконплексы сохраняют первоначальный размер частиц и поверхностный заряд даже без каких-либо лиопротекторов. Такая высокая коллоидная стабильность была бы предпочтительной при переходе к клиническому применению и промышленному внедрении мицеллярных наноконплексов.

На фиг. 8 показаны эффективность включения и относительное содержание действующего вещества мицеллярных наноконплексов доксорубин/PEG-mEGCG. Эффективность включения действующего вещества превышала 75%, и это указывало на то, что доксорубин был эффективно включен в наноконплексы PEG-mEGCG. По мере снижения весового соотношения PEG-mEGCG:доксорубин, происходило увеличение как эффективности включения действующего вещества, так и относительного содержания.

Наблюдаемое относительное содержание (35-50 вес.%) было значительно выше, чем относительное содержание, достигнутое в других полимерных мицеллярных системах, π - π "стэкинг" и (или) гидрофобное взаимодействие между EGCG и доксорубином, вероятно, являлось существенным фактором в плане высокой степени наполнения мицеллярных наноконплексов PEG-mEGCG лекарственным веществом.

Исследование по высвобождению доксорубина.

Для проведения эксперимента по высвобождению лекарственного вещества 0,5 мл заполненных доксорубином мицеллярных наноконплексов (2 мг/мл) помещали в диализные пробирки (НОММ = 2000 Да). Пробирки погружали в 25 мл фосфатно-солевого буфера во встряхивателе-инкубаторе при 37°C. В заданный момент времени собирали 1 мл среды высвобождения и затем заменяли эквивалентным объемом свежего фосфатно-солевого буфера. Количество доксорубина, высвобожденное в среду, было определено путем измерения поглощающей способности доксорубина при 480 нм с помощью спектрофотометра Hitachi U-2810 (Япония).

Также был изучен профиль высвобождения лекарственного вещества мицеллярных наноконплексов доксорубин/PEG-mEGCG при физиологической температуре и pH. Как показано на фиг. 9, мицеллярные наноконплексы проявляли пролонгированное высвобождение доксорубина в фосфатно-солевом буфере. Приблизительно 11% содержащегося в наноконплексах доксорубина высвобождалось в течение 7 дней. Наблюдаемая скорость высвобождения значительно ниже скорости других систем доставки доксорубина, о которых сообщалось ранее. Это продолжительное высвобождение лекарственного средства было вызвано, вероятно, сильным взаимодействием между EGCG и доксорубином в мицеллярных наноконплексах. Кроме того, наблюдалось только незначительное "взрывное" высвобождение на начальной стадии, указывающее на то, что молекулы доксорубина были стабильно инкапсулированы в мицеллярных наноконплексах. Такое слабое истечение лекарственного препарата может быть существенным для обеспечения максимальной терапевтической эффективности при минимальных побочных эффектах, так как молекулы лекарственного препарата, инкапсулированные в наноконплексах, не смогут преждевременно высвободиться при циркулировании в кровяном потоке. В совокупности

указанные результаты продемонстрировали, что мицеллярные наноконплексы PEG-mEGCG могли быть применены для системного введения доксорубина при лечении рака.

Пример 4. Конъюгаты SU/PEG-EGCG.

Формирование мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG.

На фиг. 10 проиллюстрировано формирование конъюгатов SU/PEG-EGCG с использованием метода диспергирования твердых частиц. Вкратце, 2 мг SU (1006) растворяли в 1 мл хлороформа. Затем раствор SU добавляли к конъюгатам PEG-EGCG (либо PEG-mEGCG (1002), либо PEG-dEGCG (1004)) в стеклянных флаконах при различных весовых соотношениях PEG-EGCG:SU (1008) и перемешивали вихревым способом. Затем хлороформ раствора выпаривали при пониженном давлении (1010). Полученную тонкую пленку из смеси PEG-EGCG и SU (1012) гидратировали путем нанесения 2 мл воды на поверхность (1014) и инкубировали при температуре внешней среды в течение 24 ч. После гидратирования полученной твердой пленки осуществлялась самосборка PEG-EGCG с образованием мицеллярных наноконплексов путем отделения SU и частей EGCG от гидратированных цепей PEG. Далее раствор мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG фильтровали (1016) через 0,8-мкм фильтр (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Германия) для удаления любых остаточных несвязанных лекарственных веществ и получали прозрачный раствор мицеллярного наноконплекса SU/PEG-EGCG (1018). Для проведения исследований *in vivo* раствор мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG далее фильтровали с использованием 0,2-мкм фильтра (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Германия).

Следует отметить, что конъюгаты PEG-EGCG относятся как к PEG-mEGCG, так и к PEG-dEGCG, если не указано иное.

Ввиду того, что EGCG имеет полифенольную структуру, способную взаимодействовать с SU посредством гидрофобного взаимодействия и π - π "стэкинга", предполагалось, что EGCG, накопленный в ядре мицеллярных наноконплексов, создаст приемлемую среду для включения SU. Кроме того, цепи ПЭГ, расположенные на поверхности, образуют высокогидратную оболочку вокруг мицеллярных наноконплексов для предотвращения клиренса ретикулоэндотелиальной системой, тем самым обеспечивая длительную циркуляцию в кровотоке и снижая проявление побочных эффектов.

Определение характеристик мицеллярных наноконплексов SU/PEG-mEGCG.

Определение гидродинамического диаметра, распределения размеров и поверхностного заряда мицеллярных наноконплексов SU/PEG-mEGCG проводили методом динамическое рассеяние света (ДРС) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Великобритания). Измерения проводили три раза в воде при 25°C. На фиг. 11А показан гидродинамический диаметр мицеллярных наноконплексов, изготовленных при различных весовых соотношениях PEG-EGCG:SU. В частности, размер полученных мицеллярных наноконплексов находился в диапазоне 130-250 нм. Нанометровый размер является приемлемым для обеспечения длительной циркуляции и таргетирования опухоли за счет эффекта проницаемости и удержания. Характеристики мицеллярных наноконплексов контролировали путем изменения весовых соотношений PEG-EGCG:SU. На фиг. 11В показано, что мицеллярные наноконплексы, образованные при весовых соотношениях PEG-EGCG:SU 8 и 16, были высокомонодисперсными. Положительный заряд мицеллярных наноконплексов снижался по мере увеличения весового соотношения PEG-EGCG:SU (фиг. 11С). Их незначительный положительный поверхностный заряд был обусловлен инкапсулированием положительно заряженных молекул SU.

Для измерения эффективности включения действующего вещества и количества, 10 мкл мицеллярных наноконплексов в воде растворяли в 990 мкл ДМФ и измеряли поглощающую способность SU при 431 нм с помощью (Япония). Калибровочная кривая, полученная на основе стандартных растворов SU, была использована для определения эффективности включения и количества.

На фиг. 12 показаны эффективность включения и относительное содержание действующего вещества мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG. По мере увеличения весовых соотношений PEG-EGCG:SU от 1 до 16, эффективность включения действующего вещества повышалась от ~30 до ~80%. Эффективность включения мицеллярных наноконплексов SU/PEG-dEGCG была выше по сравнению с эффективностью включения мицеллярных наноконплексов SU/PEG-mEGCG, что указывает на более интенсивное взаимодействие SU с PEG-dEGCG по сравнению с PEG-mEGCG. Также было обнаружено, что эффективность включения мицеллярных наноконплексов относилась к количеству незаполненного осадка SU до фильтрации. При увеличении весовых соотношений PEG-EGCG:SU до 8, не было обнаружено выделений SU. Как и ожидалось, относительное содержание мицеллярных наноконплексов снижалось по мере увеличения весовых соотношений PEG-EGCG:SU ввиду более высокого содержания PEG-EGCG в мицеллярных наноконплексах.

Исследование высвобождения SU.

Было проведено дальнейшее изучение профиля высвобождения лекарственного вещества мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG при физиологических условиях (фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,3 при 37°C). При проведении экспериментов по высвобождению SU, 0,5 мл мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG (0,4 мг/мл⁻¹) помещали в диализные пробирки (НОММ = 2000 Да). Пробирки погружали в 25 мл фосфатно-солевого буфера во встряхивателе-инкубаторе при 37°C. В заданный момент времени собирали 1 мл среды высвобождения и затем заменяли эквивалентным объемом свежего

фосфатно-солевого буфера. Количество SU, высвобожденное в среду, было определено путем измерения поглощающей способности при 431 нм с помощью спектрофотометра Hitachi U-2810.

Как показано на фиг. 13, мицеллярные наноконплексы проявляли пролонгированное высвобождение SU в фосфатно-солевом буфере, что могло бы быть объяснено сильным взаимодействием между EGCG и SU в мицеллярных наноконплексах. Кроме того, практически не наблюдалось какого-либо "взрывного" высвобождения, что дает основание предполагать, что молекулы SU были стабильно инкапсулированы в мицеллярных наноконплексах. Мицеллярные наноконплексы SU/PEG-mEGCG проявили более быстрое высвобождение SU и в большем количестве по сравнению с мицеллярными наноконплексами SU/PEG-dEGCG ввиду слабого взаимодействия между SU и частями mEGCG. Скорость высвобождения и количество также зависели от весового соотношения PEG-EGCG:SU. Для мицеллярных наноконплексов SU/PEG-mEGCG как скорость высвобождения, так и количество сокращались по мере увеличения весового соотношения PEG-EGCG:SU. Весовое соотношение PEG-EGCG:SU незначительно влияло на скорость высвобождения и количество в мицеллярных наноконплексах SU/PEG-dEGCG, за исключением того, что более медленное высвобождение и в меньшем количестве было связано с весовым соотношением PEG-EGCG:SU в размере 8.

Терапевтическое исследование *in vivo*.

Для исследования токсичности терапевтического эффекта было проведено изучение мицеллярных наноконплексов *in vivo*. Была создана модель подкожной почечно-клеточной карциномы. Использовали взрослых самок белых бестимусных иммунологически некомпетентных мышей (средний вес = 19, возраст = 6-8 недель).

Для исследования терапевтического эффекта мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG путем внутривенной инъекции была создана ксенотрансплантатная модель опухоли путем инокуляции 6×10^6 A498-luc клеток подкожно в корень левого бедра мыши. На 6-й день после инокуляции опухоли животные были разделены на четыре группы для инъектирования различных растворов в хвостовую вену ($n=8$ в группе) дважды в неделю в течение 5 недель, при этом одна группа ежедневно получала SU через желудочный зонд при 60 мг/кг. Был использован исследуемый раствор в количестве 200 мкл для введения в хвостовую вену.

Для мониторинга биолуминесцентных сигналов, испускаемых клетками A498-luc, животным, анестезированным изофлураном, интраперитонеально вводили 200 мкл D-люциферина (5 мг/мл, Promega) в фосфатно-солевом буфере и размещали их на подогреваемом столике (30°C) внутри корпуса камеры системы обработки изображений IVIS (Xenogen, Alameda, CA, США) с ПЗС-камерой. Луминесцентные изображения снимали через 20 мин после введения люциферина (получение изображения в 30-секундном интервале). Свет, испускаемый клетками A498-luc, оцифровывали и отображали на экране электронными средствами как наложение псевдоцвета на полутонное изображение животного. Были получены и проанализированы изображения и измерения луминесцентных сигналов с помощью программного обеспечения обработки изображений Xenogen v3.2 и количественно определены как фотон(ы). Ежедневно проводили измерения размера опухолей и веса тела. Обращение и уход за животными осуществляли в соответствии с Руководством по уходу и использованию животных в научных целях, выпущенным Национальным консультативным комитетом по исследованию лабораторных животных, Сингапур.

Все данные были представлены как средняя $\pm$ квадратическая ошибка среднего (SEM). Статистическая достоверность различий между средними значениями флавоноида и SU была определена по параметрическому t-критерию Стьюдента. Оценка множественных сравнений была проведена методом дисперсного анализа (ANOVA) по критериям множественного сравнения Бонферрони с использованием версии SigmaStat 3.5. Р-значение $<0,05$ рассматривалось как статистически значимое.

Мицеллярные наноконплексы SU/PEG-mEGCG (при весовом соотношении PEG-EGCG:SU 8 и 16) и мицеллярные наноконплексы SU/PEG-dEGCG (при весовом соотношении PEG-EGCG:SU 8) были выбраны для проведения исследований *in vivo* на основе размера мицеллярного наноконплекса, распределения размеров и поверхностного заряда. Мицеллярные наноконплексы SU/PEG-mEGCG были внутривенно инъектированы дважды в неделю в течение 5 недель, и в одной группе животным ежедневно вводили через желудочный зонд SU в количестве 60 мг/кг. Пероральная доза лекарственного препарата в количестве 60 мг/кг в день была выбрана на основе предшествующей информации, в соответствии с которой оптимальная доклиническая доза SU для достижения противоопухолевой эффективности у мышей составляла 40-80 мг/кг в день. Для проводимого исследования доза в количестве 60 мг/кг в день являлась эффективной противоопухолевой дозой, в то время как в соответствии с другими исследованиями доза <40 мг/кг в день считалась субэффективной, и доза в количестве 120 мг/кг в день позволила бы определить эффект дальнейшего введения лекарственного препарата при увеличении дозы.

На фиг. 14 показана существенная потеря веса в группе, получавшей перорально свободный SU, спустя одну неделю после начала курса лечения. Такая потеря веса не наблюдалась в другой группе, проходившей курс лечение с использованием мицеллярного наноконплекса SU/PEG-EGCG. Противоопухолевый эффект был повышен при введении мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG дважды в

неделю по сравнению с ежедневной терапией, предусматривающей пероральное введение SU (фиг. 15). Указанный противоопухолевый эффект с использованием мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG был достигнут практически при одной десятой концентрации пероральной дозы. Ингибирующий эффект мицеллярного наноконплекса SU/PEG-EGCG сохранялся в течение длительного периода времени даже после завершения 5-недельного курса лечения. Скорость возобновления роста опухоли была намного выше в группе, проходившей курс лечения при пероральном приеме препарата, по сравнению с группами, проходившими курс лечения с применением мицеллярного наноконплекса.

С целью исследования терапевтического эффекта мицеллярного наноконплекса SU/PEG-mEGCG при пероральном введении была создана модель ксенотрансплантатной опухоли путем подкожной вакцинации клеток 4×10^6 ACHN, суспендированных в 100 мкл фосфатно-солевого буфера и 100 мкл Matrigel (BD Bioscience) в правый корень бедра мыши. Как только объем опухолей достиг 200 мм³, животные были разделены на четыре группы для ежедневного введения различных растворов через желудочный зонд (n=8 на группу) в течение 5 недель: контроль (цитратный буфер pH 5), соотношение SU/PEG-mEGCG 8:1 (SU при 15 мг/кг), SU при 15 и 40 мг/кг. Опухоли измеряли дважды в неделю цифровым штангенциркулем, и объемы опухолей (мм³) рассчитывали по следующей формуле: объем = (длина×ширина²)/2 (фиг. 16 и 17).

Как было указано выше, ввиду того, что пероральная доза SU в количестве 60 мг/кг в день является исключительно токсичной, пероральную дозу SU сократили до 40 мг/кг в день в настоящем описании. Указанная пероральная доза SU в количестве 40 мг/кг в день является оптимальной доклинической дозой для достижения противоопухолевой эффективности у мышей (40-80 мг/кг в день) с учетом предшествующей информации в литературе. На фиг. 16 показана значительная потеря веса в группе, получающей SU при 40 мг/кг во время лечения. Потеря веса не наблюдалась в других группах, получающих мицеллярный наноконплекс SU/PEG-mEGCG 8:1 и SU при 15 мг/кг во время лечения. При той же самой дозе в количестве 15 мг/кг мицеллярный наноконплекс SU/PEG-mEGCG проявил существенно более высокий терапевтический эффект по сравнению с использованием только одного SU (фиг. 17). Указанное противоопухолевое действие за счет использования мицеллярного наноконплекса SU/PEG-mEGCG было достигнуто при менее половины концентрации оптимальной пероральной дозы SU, составляющей 40 мг/кг. Ингибирующий эффект мицеллярного наноконплекса SU/PEG-mEGCG сохранялся в течение достаточно длительного периода времени, даже после завершения курса терапии через 5 недель.

В рамках эффекта проницаемости и удержания учитывается анатомический и физиологический характер кровяных сосудов опухоли, обеспечивающих перенос макромолекул размером >40 кДа, которые селективно просачиваются из кровяных сосудов опухоли и накапливаются в ткани опухоли. В наиболее плотной опухоли имеются кровяные сосуды с дефективной архитектурой, которая, как правило приводит к существенной сосудистой проницаемости. Такой процесс не возникает в нормальных тканях. В настоящем изобретении раскрывается использование мицеллярных наноконплексов SU/PEG-mEGCG посредством как внутривенного, так и перорального введения впервые в качестве возможного метода лечения светлоклеточного рака почки. Было обнаружено, что EGCG взаимодействовал с SU, и фармакокинетические исследования на мышах показали, что введение EGCG позволило существенно понизить концентрации SU в плазме. Описанное в литературе взаимодействие между зеленым чаем и SU и эффект проницаемости и удержания мицеллярных наночастиц в различных опухолях дает основание предположить возможность использования PEG-EGCG в качестве носителей наночастиц для доставки SU. При глиобластоме - высокой ангиогенной активности опухоли - антиангиогенная терапия продемонстрировала высокую, но временную эффективность. Такая опухоль стимулирует формирование новых кровяных сосудов в процессах, обусловленных главным образом фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), однако вновь образованные сосуды имеют структурные и функциональные нарушения. Использование мицеллярных наноконплексов SU/PEG-EGCG могло бы потенциально в таких случаях повысить антиангиогенную активность.

Промышленная применимость

Мицеллярные наноконплексы могут быть применены для системного введения доксорубина в целях лечения раковых заболеваний.

Мицеллярные наноконплексы могут быть использованы в качестве носителей наночастиц для доставки SU. При глиобластоме - высокой ангиогенной активности опухоли - антиангиогенная терапия продемонстрировала высокую, но временную эффективность. Такая опухоль стимулирует формирование новых кровяных сосудов в процессах, обусловленных главным образом фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), однако вновь образованные сосуды имеют структурные и функциональные нарушения. Использование мицеллярных наноконплексов, включающих SU, может в таких случаях потенциально повысить антиангиогенную активность.

Мицеллярные наноконплексы могут быть использованы для пролонгированного высвобождения терапевтических веществ при их системном введении или при использовании в качестве системы доставки терапевтических веществ к целевому участку.

Мицеллярные наноконплексы могут быть использованы для инкапсулирования различных терапевтических веществ для лечения различных типов раковых заболеваний.

Мицеллярные наноконплексы также могут быть использованы для инкапсулирования различных терапевтических веществ для лечения доброкачественных опухолей. Это предусматривает использование малых молекул для антибиотиков и других областей медицинского применения.

Понятно, что допускаются различные изменения и дополнения, которые очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с вышеприведенным описанием, не выходящие за пределы существа и объема настоящего изобретения, и предусматривается, что такие изменения и дополнения не выходят за пределы прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мицеллярный наноконплекс, включающий мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом мицелла включает конъюгат полимер-флавоноид, в котором полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' с помощью реакции нуклеофильного присоединения.

2. Мицеллярный наноконплекс по п.1, в котором по меньшей мере один флавоноид связан с полимером.

3. Мицеллярный наноконплекс по п.1 или 2, в котором полимер связан с флавоноидом посредством линкера, при этом линкер выбран из группы, включающей тиозфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группы.

4. Мицеллярный наноконплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором флавоноид является мономерным флавоноидом или димерным флавоноидом, при этом по меньшей мере один флавоноид связан В-кольцом в положении 2' с полимером.

5. Мицеллярный наноконплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором полимер является гидрофильным полимером.

6. Мицеллярный наноконплекс по п.5, в котором гидрофильный полимер содержит мономеры, выбранные из группы, включающей акриламиды, алкилы, оксазолины, алкенилы, имины, акриловую кислоту, метакрилаты, диолы, оксираны, спирты, амины, ангидриды, сложные эфиры, лактоны, карбонаты, карбоновые кислоты, акрилаты, гидроксилы, фосфаты, терефталаты, амиды и простые эфиры.

7. Мицеллярный наноконплекс по п.5, в котором гидрофильный полимер выбран из группы, включающей полиакриламид, поли-N-изопропилакриламид, полиоксазолин, полиэтиленмин, полиакриловую кислоту, полиметакрилат, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, поливинилпирролидинон, простые полиэфиры, полиаллиламин, полиангидриды, поли-β-аминоэфир, полибутиленсукцинат, поликапролактон, поликарбонат, полидиоксанон, полиглицерин, полиглицолиевую кислоту, поли-3-гидроксипропионовую кислоту, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)-метакриламид, полимолочную кислоту, сополимер молочной и гликолевой кислот, сложные полиорто-эфиры, поли-2-оксазолин, полисебаценовую кислоту, сополимер терефталата и фосфата, полисахарид и их сополимеры.

8. Мицеллярный наноконплекс по п.7, в котором гидрофильный полимер является полисахаридом, выбранным из группы, включающей гиалуроновую кислоту, декстран, поллулан, хитозан, целлюлозу, амилозу, крахмал, желатин, каррагенан, циклодекстрин, декстран, сульфат, фикоилл, геллановую камедь, гуаровую камедь, пектин, полисахарозу, склероглюкан, ксантан, ксилоглюкан и алгинат.

9. Мицеллярный наноконплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором флавоноид выбран из группы, включающей флавоны, изофлавоны, флаваны, проантоцианидины и антоцианидины.

10. Мицеллярный наноконплекс по п.9, в котором флаваны выбраны из группы, включающей (-)-эпикатехин, (+)-эпикатехин, (-)-катехин, (+)-катехин, эпикатехингаллат, эпигаллокатехин, эпигаллокатехингаллат, физетинидол, галлокатехин, галлокатехингаллат, мескитол и робинетинидол, эллагитанин, галлотанин, улунтеанин, флоротанин, танин, теацитрин, теадибензотрополон, теафлавин, теанафтохинон, теарубигины, теазиненсин и их смеси.

11. Мицеллярный комплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором терапевтическое вещество является химиотерапевтическим средством, выбранным из группы, включающей алкилирующие агенты, антрациклины, дискрипторы цитоскелета, эпотилоны, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, ингибиторы киназы, моноклональные антитела, конъюгаты антитела с лекарственным препаратом, нуклеотидные аналоги, пролекарства, пептидные антибиотики, Pt-содержащие препараты, ретиноиды, алкалоиды винка, цитокины, антиметаболиты и производные алкалоидов винка, а также иные цитотоксические препараты.

12. Мицеллярный комплекс по п.11, в котором химиотерапевтическое средство выбрано из группы, включающей актиномицин, афатиниб, политрансретиноевую кислоту, акситиниб, азацидин, азатиоприн, бевацизумаб, блеомицин, бозутиниб, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цетуксимаб, цисплатин, хлорамбуцил, кризотиниб, циклофосфамид, цитарабин, дазатиниб, даунорубин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубин, эпирубинин, эпотилон А ($C_{26}H_{39}NO_6S$), эпотилон В ($C_{27}H_{41}NO_6S$), эпотилон С ($C_{26}H_{39}NO_5S$), эпотилон D ($C_{27}H_{41}NO_5S$), эпотилон Е ($C_{26}H_{39}NO_7S$), эпотилон F ($C_{27}H_{41}NO_7S$),

эрлотиниб, этопозид, фторурацил, фостаматиниб, гефитиниб, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, иматиниб, иринотекан, лапатиниб, ленватиниб, мехлорэтамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, нилотиниб, оксалиплатин, паклитаксел, панитумумаб, пазопаниб, пегаптапаниб, пеметрексед, ранибизумаб, регорафениб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, трастузумаб, тенипозид, тиогуанин, тофацитиниб, топотекан, валрубицин, вемурафениб, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин.

13. Мицеллярный наноконкомплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором мицеллярный наноконкомплекс имеет размер в диапазоне 30-300 нм, 50-300 нм, 100-300 нм, 30-50 нм, 30-100 нм, 30-150 нм, 150-300 нм, 200-300 нм, 250-300 нм, 100-150 нм, 100-200 нм, 100-250 нм, 130-180 нм или 130-250 нм.

14. Мицеллярный наноконкомплекс по любому из предшествующих пунктов, в котором относительное содержание терапевтического вещества, заключенного в мицелле, находится в диапазоне 1-10 вес.%, 5-25 вес.%, 20-45 вес.%, 30-50 вес.%, 35-50 вес.%, 40-50 вес.%, 45-50 вес.%, 30-35 вес.%, 30-40 вес.% или 30-45 вес.%

15. Мицеллярный наноконкомплекс по любому из предшествующих пунктов, который выступает в качестве средства доставки лекарственного препарата.

16. Способ изготовления мицеллярного наноконкомплекса, включающего мицеллу и терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицелле, при этом способ включает следующие этапы:

а) растворение полимера и флавоноида в растворе с образованием конъюгата полимер-флавоноид с помощью реакции нуклеофильного присоединения в обычных условиях, при этом в указанном конъюгате полимер связан с В-кольцом флавоноида в положении 2' и раствор содержит воду, буфер и растворитель; и

б) добавление указанного вещества к конъюгату полимер-флавоноид, обеспечивая тем самым самосборку мицеллы, включающей конъюгат полимер-флавоноид, и инкапсулирование вещества в мицелле для образования мицеллярного наноконкомплекса.

17. Способ по п.16, при котором этап (б) дополнительно включает следующие этапы:

а) удаление растворителя для формирования сухой пленки терапевтического вещества и конъюгата полимер-флавоноид;

б) гидратирование сухой пленки водным растворителем.

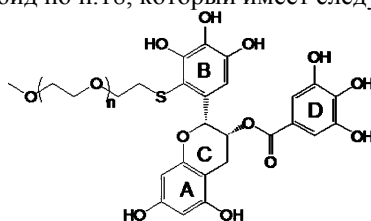
18. Конъюгат полимер-флавоноид, включающий полимер, связанный с В-кольцом флавоноида в положении 2' посредством линкера, выбранного из группы, включающей тиоэфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группы.

19. Конъюгат полимер-флавоноид по п.18, в котором полимер выбран из группы, включающей полисахарид, полиакриламид, поли-N-изопропилакриламид, полиоксазолин, полиэтиленимин, полиакриловую кислоту, полиметакрилат, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, поливинилпирролидинон, простые полиэфиры, полиаллиламин, полиангидриды, поли-β-аминоэфир, полибутиленисукцинат, поликапролактон, поликарбонат, полидиоксанон, полиглицерин, полиглицолиевую кислоту, поли-3-гидроксипропионовую кислоту, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид, полимолочную кислоту, сополимер молочной и гликолевой кислот, сложные полиортоэфиры, поли-2-оксазолин, полисебаценовую кислоту, сополимер терефталата и фосфата и их сополимеры.

20. Конъюгат полимер-флавоноид по п.18 или 19, в котором флавоноид выбран из группы, включающей (-)-эпикатехин, (+)-эпикатехин, (-)-катехин, (+)-катехин, эпикатехингаллат, эпигаллокатехин, эпигаллокатехингаллат, физетинидол, галлокатехин, галлокатехингаллат, мескитол и робинетинидол, эллагитаннин, галлотаннин, улунтеанин, флоротаннин, таннин, теацитрин, теадибензотрополон, теафлавин, теанафтохинон, теарубигины, теазиненсин и их смеси.

21. Конъюгат полимер-флавоноид по любому из пп.18-20, в котором полимер конъюгирован с флавоноидом посредством линкера, выбранного из группы, включающей тиоэфирную, иминную, аминную, азо и 1,2,3-триазольную группы.

22. Конъюгат полимер-флавоноид по п.18, который имеет следующую формулу:



в которой n находится в диапазоне 20-910.

23. Конъюгат полимер-флавоноид по любому из пп.18-22, в котором конъюгат полимер-флавоноид получен способом, включающим этап конъюгирования флавоноида с полимером посредством нуклеофильного присоединения при основных условиях, в котором полимер имеет свободную нуклеофильную группу.

24. Конъюгат полимер-флавоноид по п.23, в котором нуклеофильная группа выбрана из группы, включающей тиольную, аминую, диазоалкановую и азидную группы.

25. Способ лечения опухоли, включающий этап введения онкопациенту мицеллярного наноконплекса по любому из пп.1-17.

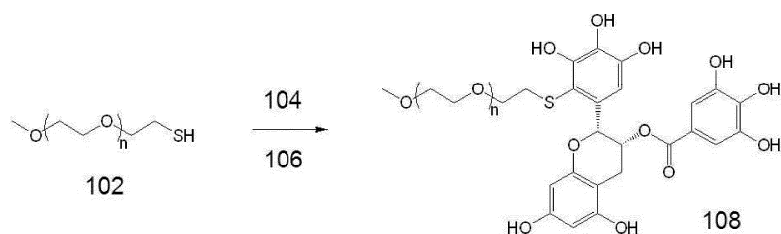
26. Способ по п.25, при котором мицеллярный наноконплекс вводят парентерально, с помощью аэрозоля для ингаляции, топикально, ректально, назально, буккально, вагинально, посредством имплантированной емкости, путем инъекции, субдермально, интраперитонеально, трансмукозально, перорально или в виде офтальмологического препарата.

27. Способ по п.26, при котором парентеральное введение осуществляют подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно, внутриартериально, внутрисиновиально, интрастернально, интратекально, внутриочагово или посредством внутрочерепной инъекции и инфузии.

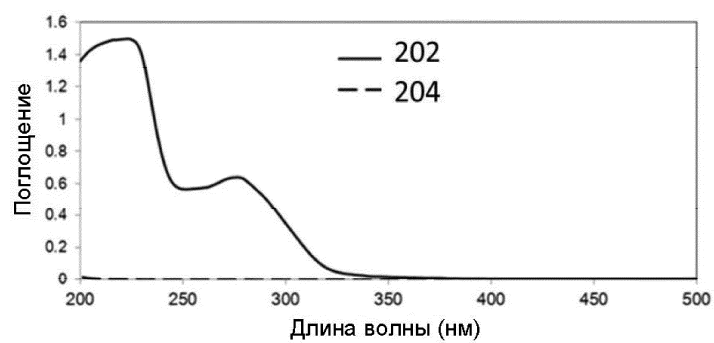
28. Способ по любому из пп.25-27, при котором терапевтическое вещество, инкапсулированное в мицеллярный наноконплекс, вводят при дозе 1-80 мг/кг в день.

29. Способ по любому из пп.25-28, в котором онкопациент болен раком, выбранным из группы, включающей аденокарциному, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, атипическую астроцитому I степени, астроцитому II степени, астроцитому III степени, астроцитому IV степени, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль центральной нервной системы, базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак бронхов, бронхоальвеолярную карциному, лимфому Беркитта, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, рак эндометрия, эндометриальный рак матки, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, эстеиобластому, саркому Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, рак внепечёчного жёлчного протока, фиброзную гистиоцитоксантому, рак желчного пузыря, рак желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, гастроинтестинальную стромальную опухоль, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак, внутрипротоковую холангиокарциному, лимфому Ходжкина, гипогарингиальный рак, интраокулярную меланому, инсулиному, саркому Капоши, гангленганосклеточный гистиоцитоз, рак гортани, рак губы, лимфому, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитоксантому, медуллобластому, медуллоэпителиому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, эндокринную неоплазию, множественную миелому, фунгоидный микоз, миелодисплазию, миелодиспластические/миелолиферативные неоплазмы, миелолиферативные заболевания, рак носовой полости, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому, светлоклеточный рак яичников, эпителиальный рак яичников, овариальную герминогенную опухоль, папилломатоз, рак придаточных пазух носа, рак паразитовидных желёз, рак полового члена, фарингеальный рак, пинеальную паренхиматозную опухоль, пинеобластому, опухоль гипофиза, плазмноклеточную опухоль, плеврорегочную бластому лимфому первичной центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак дыхательных путей с изменениями хромосомы 15, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желёз, ретикулез Сезари, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак шеи, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, рак яичка, рак горла, рак вилочковой железы, тимому, рак щитовидной железы, рак почечной лоханки, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрёма и опухоль Вильмса.

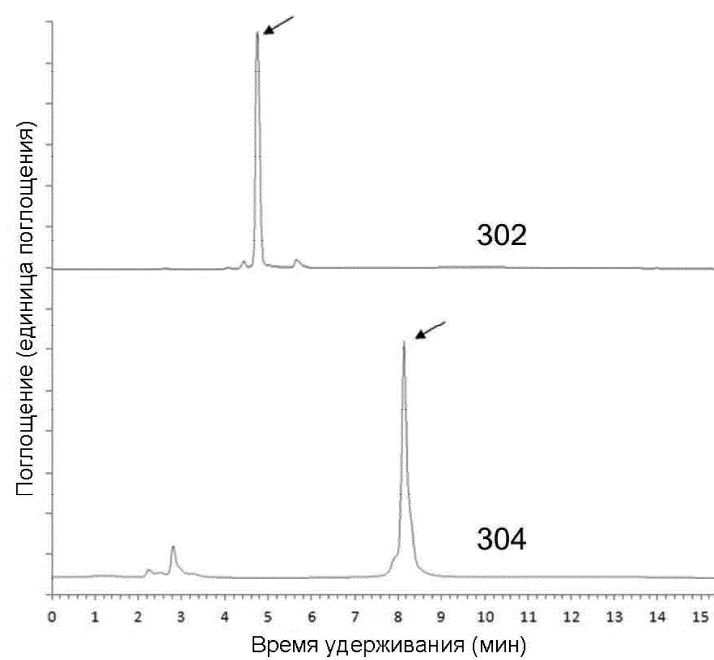
30. Применение мицеллярного наноконплекса по любому из пп.1-17 при производстве лекарственного препарата для лечения опухоли.



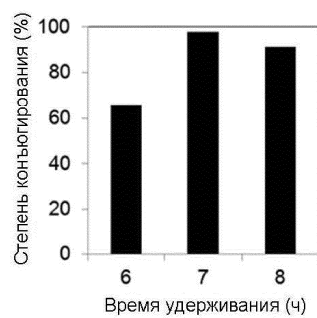
Фиг. 1



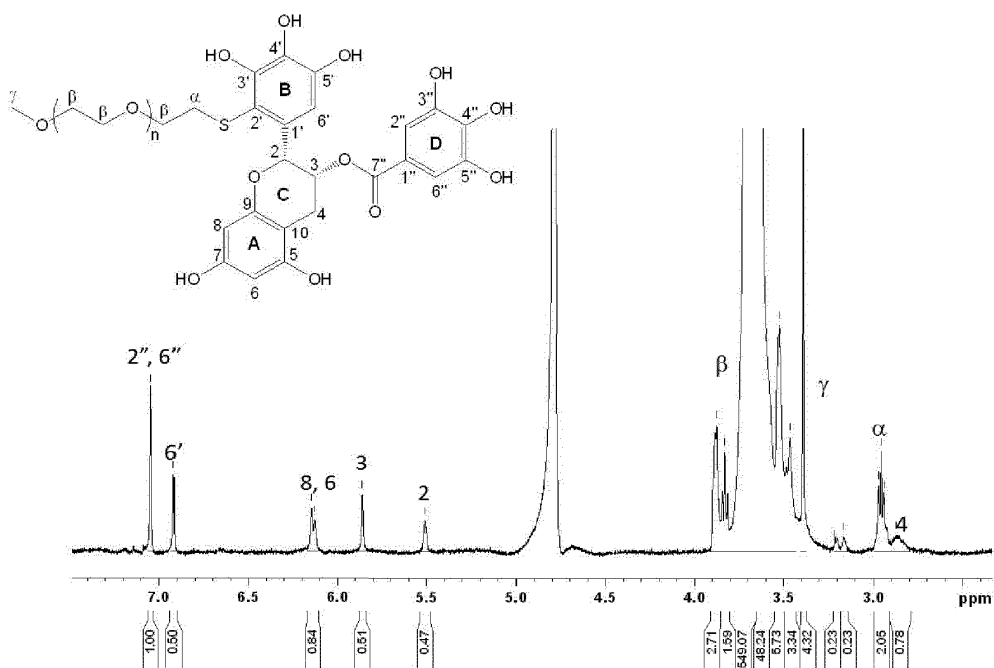
Фиг. 2



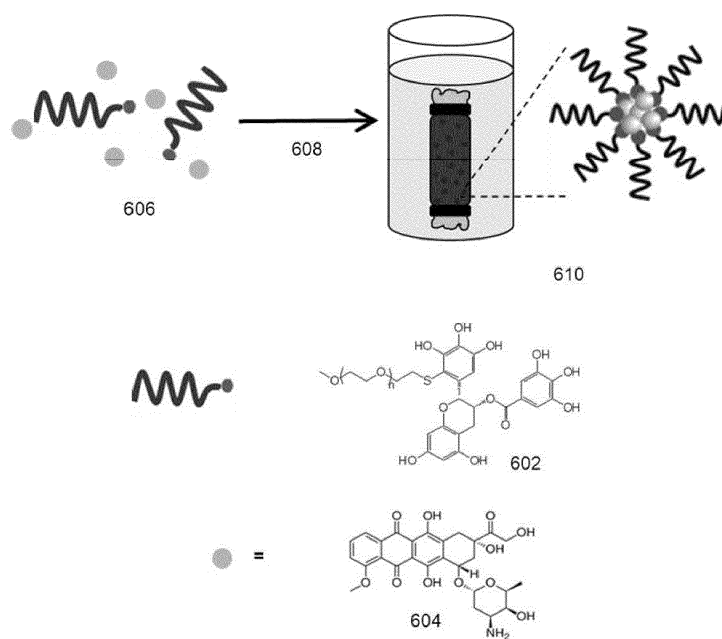
Фиг. 3



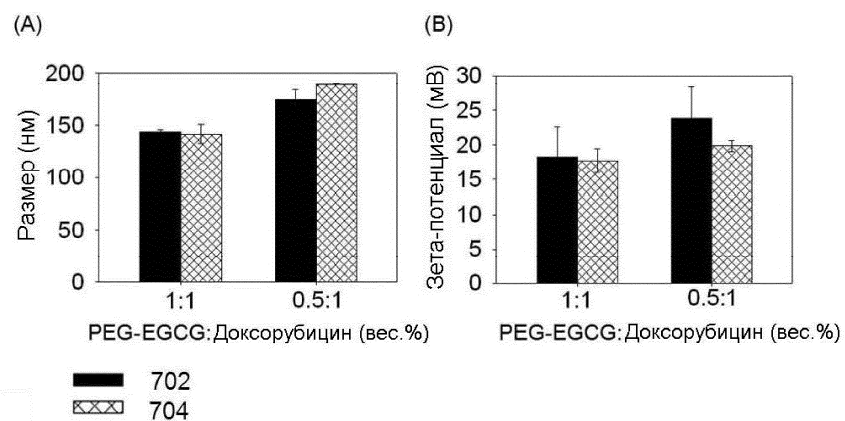
Фиг. 4



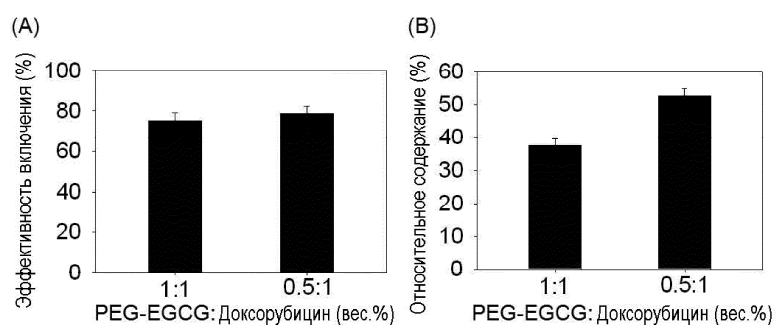
ФИГ. 5



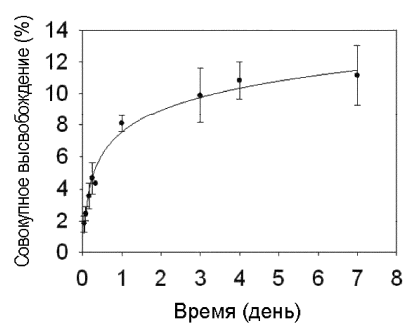
ФИГ. 6



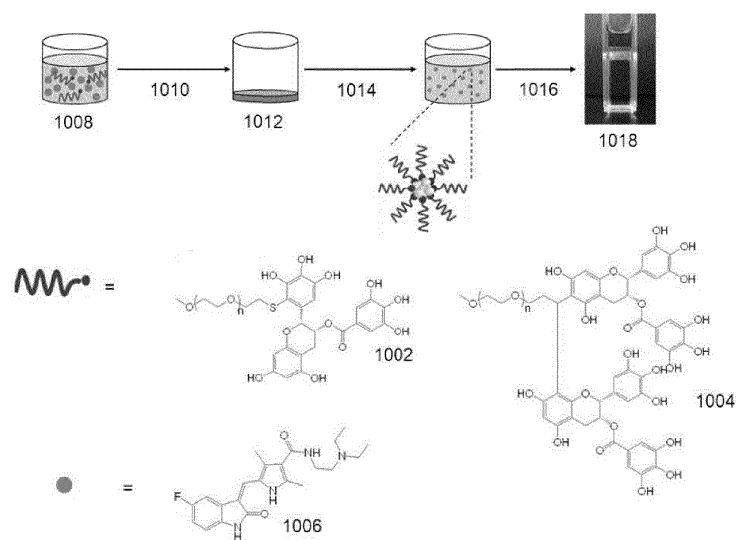
Фиг. 7



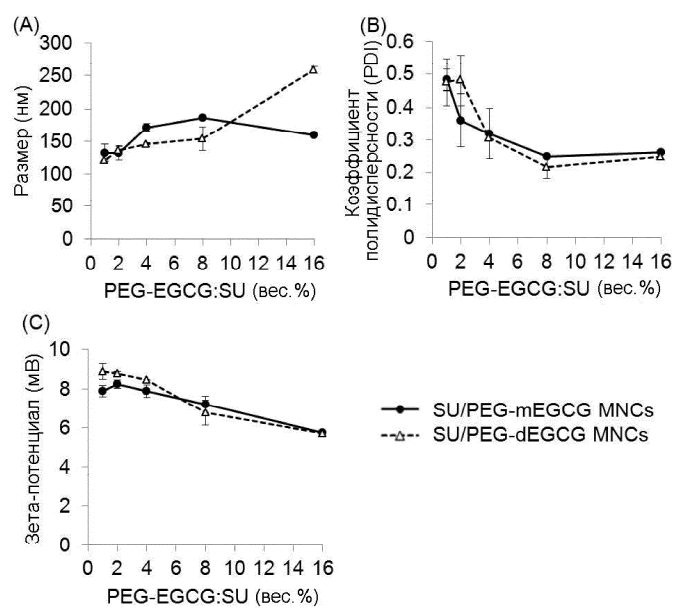
Фиг. 8



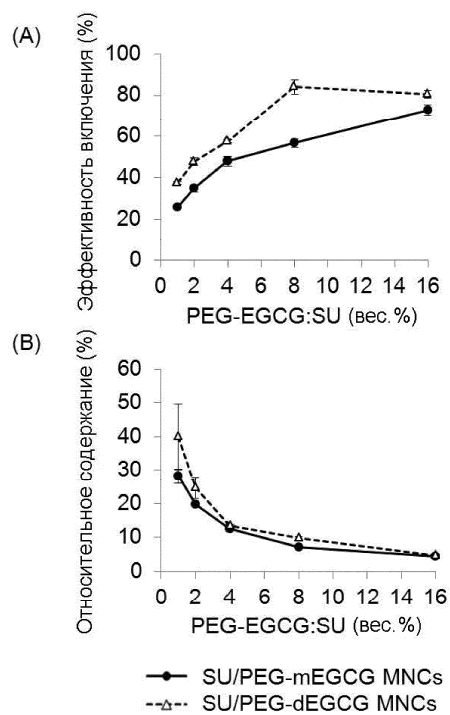
Фиг. 9



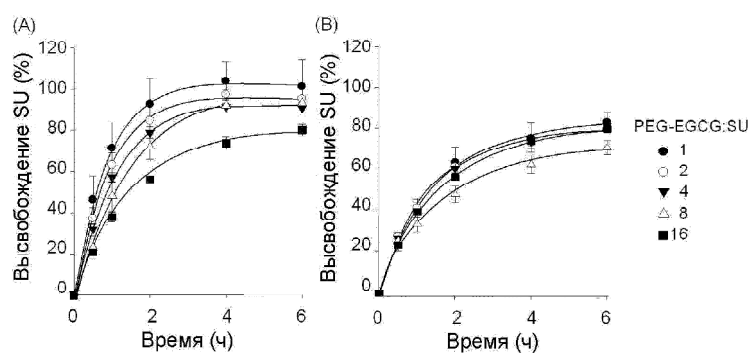
Фиг. 10



Фиг. 11

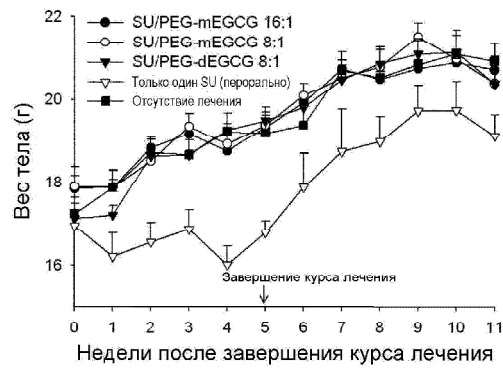


Фиг. 12



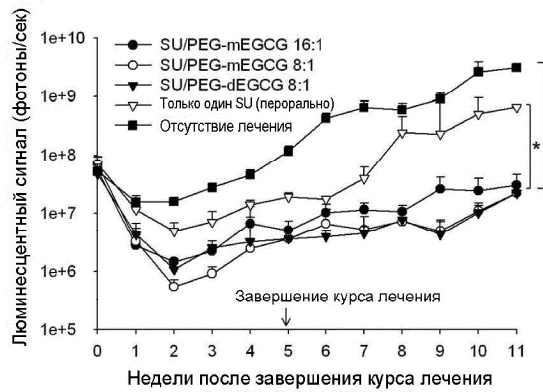
Фиг. 13

Вес тела

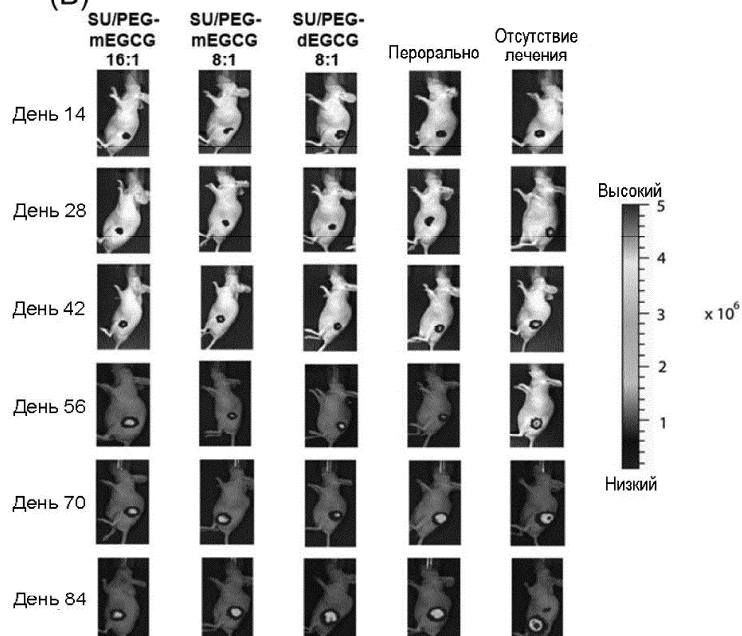


Фиг. 14

(A) Размер опухоли

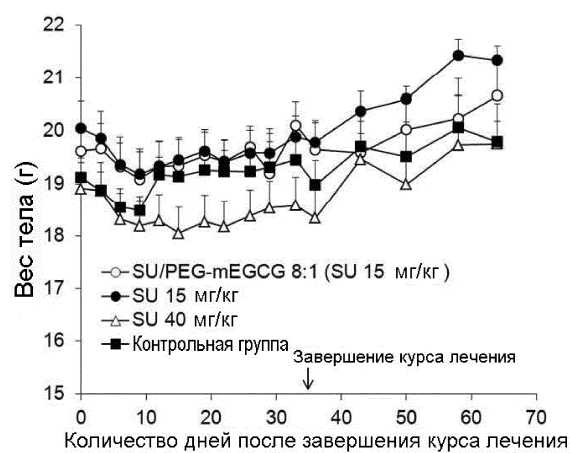


(B)



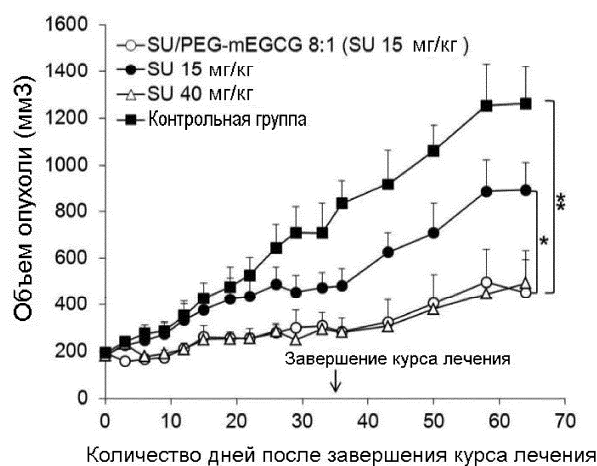
Фиг. 15

Вес тела



Фиг. 16

Размер опухоли



Фиг. 17

