

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036833**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.24

(21) Номер заявки
201790565

(22) Дата подачи заявки
2015.09.10

(51) Int. Cl. **A61K 31/59** (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕДРАКОВЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ

(31) **62/048,586**

(32) **2014.09.10**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/049434**

(87) **WO 2016/040638 2016.03.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАШИНГТОН ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
**Корнелиус Линн, Демехри Шадмехр,
Копан Рафаэль (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A-4820711**

(SECKIN, D et al.) Can topical calcipotriol be a treatment alternative in actinic keratoses? A preliminary report. Journal of Drugs in Dermatology. 2009. Vol. 8. No. 5. Pages 451-455; abstract; page 452, left column, 'treatment protocol'; table 1

WO-A2-2006120682

WO-A2-2000000159

US-A1-20050079235

US-B2-8299109

(RXLIST) Dovonex (calcipotriene) Cream, 0.005 Percent. 23 September 2005 [Retrieved on 2015-11-09]. Retrieved from the internet: <URL: <http://www.rxlist.com/dovonex-ointment-drug.htm>>; 'drug description'

(57) Настоящее изобретение относится к способу лечения предракового поражения кожи, включающему местное применение на пораженном участке композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол. Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения перехода предракового поражения кожи в рак кожи, включающему а) идентификацию субъекта с одним или более предраковым поражением кожи; и б) местное применение на участке(ах) предракового(ых) поражения (поражений) кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол.

B1**036833****036833****B1**

Область техники

Настоящее изобретение включает способы лечения предраковых поражений кожи. Композиции по изобретению содержат цитотоксический агент и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП).

Уровень техники

Немеланомные виды рака кожи представляют собой наиболее распространенный тип рака, поражающий большое количество людей в Соединенных Штатах [1]. В отсутствие лечения эти раковые заболевания могут приводить к значительной заболеваемости, включая язвы, инфекции и локальные физические недостатки. Необходимо отметить, что в случае плоскоклеточной карциномы, очаги предшествующего поражения, которые могут быть идентифицированы клинически как актинический кератоз, можно лечить на ранних стадиях с целью предотвращения их прогрессирования до полностью развившихся кожных злокачественных новообразований, требующих дорогостоящих хирургических процедур. В дополнение к деструктивным способам лечения клинически выраженного актинического кератоза (например, криотерапии) были разработаны несколько способов местного лечения, с помощью которых можно также лечить субклиническое поражение. Такие способы очагового лечения включают фотодинамическую терапию, 5-фторурацил и имихимод [2]. Однако эффективность существующих способов лечения, продолжительность лечения и тяжесть побочных эффектов, связанных с указанными способами лечения, ограничивают комплаенс пациентов и терапевтическую эффективность. Таким образом, существует потребность в создании новых средств лечения актинического кератоза, которые смогут обеспечивать оптимальный результат с меньшим количеством процедур и нежелательных реакций. Учитывая, что ежегодная стоимость лечения актинического кератоза только в Соединенных Штатах составляет более 900 млн долларов [3], эффективное средство лечения, способное излечить актинический кератоз и предотвратить развитие рака кожи, к тому же окажет большое влияние на нашу систему здравоохранения.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения предракового поражения кожи. Способ включает местное применение на пораженном участке композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол.

В одном из вариантов способа композиция содержит от около 2 до около 5% 5-ФУ.

В другом варианте способа композиция содержит от около 0,002 до около 0,005% кальципотриола.

В еще одном варианте способа предраковое поражение кожи представляет собой актинический кератоз.

В другом варианте способа композицию применяют дважды в сутки в течение 4-6 дней.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ предотвращения перехода предракового поражения кожи в рак кожи. Способ включает: (а) идентификацию субъекта с одним или более предраковым поражением кожи; и (б) местное применение на участке(ах) предракового поражения кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол.

В другом варианте предраковое поражение кожи представляет собой актинический кератоз, а рак кожи представляет собой плоскоклеточную карциному.

В еще одном варианте композиция содержит от около 2 до около 5% 5-ФУ.

В одном из вариантов способа композиция содержит от около 0,002 до около 0,005% кальципотриола.

В еще одном варианте способа композицию применяют дважды в сутки в течение 4-6 дней.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А проиллюстрирована схема рандомизации пациентов. Подходящие пациенты были зарегистрированы, и все подлежащие лечению анатомические области, отвечающие критериям, были оценены и сфотографированы. Рандомизация участника для получения лечения основывалась на первично определенной основной анатомической области, выбранной лечащим врачом. После назначения препарата участники будут применять это же лекарственное средство на всех анатомических областях, отвечающих критериям.

*: Исследуемое лекарственное средство выдавали согласно списку рандомизации для каждой основной анатомической области, однако участники будут применять те же средства на всех найденных у них анатомических областях, соответствующих критериям. ВФХ: верхняя правая конечность; ВЛК: верхняя левая конечность.

На фиг. 1В представлена диаграмма, иллюстрирующая расписание клинического испытания. Необходимо отметить, что визиты на 2 и 4 неделях являются необязательными.

*: Визиты на 2 и 4 неделях рекомендуются, но не обязательны.

На фиг. 2 проиллюстрированы демографические данные пациентов в исследовании. Приведено количество подходящих пациентов (175), количество начавших и завершивших участие в исследовании (132) и их распределение на основании основной анатомической области.

На фиг. 3 проиллюстрировано процентное уменьшение участков, пораженных актиническим кератозом, для лечения кальципотриолом+5-фторурацилом и 5-фторурацилом. Через четыре дня лечения с применением дважды в сутки, комбинация 5-ФУ+кальципотриола приводила к значительно более высокой степени очистки актинического кератоза (АК) по сравнению со стандартной схемой лечения (5-ФУ+вазелин) при наблюдении через 8 недель ($p < 0,0001$ для всех анатомических областей, t-тест Стьюдента; ВФХ: верхняя правая конечность; ВЛК: верхняя левая конечность).

На фиг. 4 приведены изображения побочных эффектов, связанных со схемами лечения. У участников, наносивших 5-ФУ+кальципотриол дважды в сутки в течение 4 дней, развилось заметное воспаление, центрированное вокруг участков актинического кератоза, что наблюдалось непосредственно после последнего нанесения (5 день) и через 10 дней после прекращения лечения (2 неделя).

На фиг. 5А, В, С и D проиллюстрированы графики, демонстрирующие процент участников с баллами эритемы 0, 1 и 2 для каждой пролеченной анатомической области (фиг. 5А). Кожа волосистой части головы (фиг. 5В). Лицо (фиг. 5С) ВФХ и (фиг. 5D) ВЛК. Необходимо отметить, что из-за короткой продолжительности курса лечения, ни у одного из участников не возникало эритемы с баллами 3 или 4, которая обычно наблюдается у пациентов, получавших 5-ФУ дважды в сутки в течение 2-3 недель (стандартная схема лечения).

На фиг. 6А и В проиллюстрированы две схемы лечения, примененные для получения изображений, приведенных на фиг. 6С. На фиг. 6С проиллюстрированы окрашенные гематоксилином и эозином (Г&Э) срезы АК до и после лечения. Изображения демонстрируют накопление лимфоцитов в верхней дерме, в основном в АК, после лечения (Тх) у участника, получавшего 5-ФУ+кальципотриол (стрелка).

Дополнительно иммунофлуоресцентное окрашивание образцов с участков АК до и после лечения показывает устойчивую экспрессию ТСЛП на участке АК после лечения у участника, получавшего 5-ФУ+кальципотриола, включая аккумуляцию CD3+ Т-клеток около границы дермы и эпидермиса. Большинство из этих Т-клеток представляют собой CD4+ Т-хелперные клетки (вставка). К14 обозначает кератиноциты кожи.

Подробное описание изобретения

Заявителями неожиданно было обнаружено, что композиция для местного применения, содержащая цитотоксический агент и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), значительно уменьшает количество и размер предраковых поражений кожи. Уменьшение количества и размера поражений происходит при укороченном курсе лечения, тем самым уменьшая риск побочных эффектов. Соответственно в настоящем изобретении предлагаются композиции и способы для профилактики и лечения различных кожных поражений. Дополнительные аспекты изобретения описаны ниже.

I. Композиции.

В одном аспекте композиция по изобретению содержит цитотоксическое средство и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП). В конкретном варианте реализации изобретения композиция по изобретению содержит 5-фторурацил (5-ФУ) и кальципотриол.

Композиция по изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут содержать консерванты, солюбилизующие агенты, стабилизаторы, увлажнители, эмульгаторы, подсластители, красители, ароматизаторы, соли (вещества по настоящему изобретению сами по себе могут быть представлены в виде фармацевтически приемлемой соли), буферные вещества, компоненты покрытия или антиоксиданты.

Другие аспекты настоящего изобретения описаны более подробно ниже.

(а) Цитотоксический агент.

В данном документе "цитотоксический агент" обозначает агент, который воздействует на быстро делящиеся клетки в целом.

В конкретном варианте реализации изобретения цитотоксический агент представляет собой анти-метаболит, представляющий собой 5-фторурацил (5-ФУ). 5-ФУ представляет собой лекарственное средство, являющееся пиримидиновым аналогом, который применяется при лечении рака. Он представляет собой суицидный ингибитор и действует посредством необратимого ингибирования тимидилатсинтетазы.

В общем лекарственная форма цитотоксического агента представляет собой крем или раствор для местного применения. Однако включены и другие подходящие лекарственные формы для местного применения цитотоксического агента. Фармацевтические композиции, приспособленные для местного применения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей, масел или бальзамов.

Кроме того, местное применение может включать трансдермальное введение, например трансдермальные пластыри или устройства для ионтофореза. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция применяется в форме местной мази или крема.

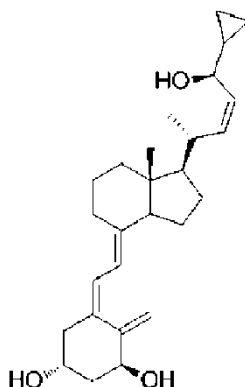
Дозы цитотоксического агента 5-ФУ могут варьировать в зависимости от заболевания или устройства, подлежащего лечению, и/или возраста и состояния субъекта, подлежащего лечению. В варианте реализации изобретения, в котором композицию, содержащую цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, вводят субъекту, концентрация цитотоксического агента в композиции может составлять от око-

ло 2 до около 5%. Например, концентрация цитотоксического агента в композиции может составлять около 2%, около 2,5%, около 3%, около 3,5%, около 4%, около 4,5%, около 5%. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения концентрация цитотоксического агента в композиции составляет около 2,5%. В другом варианте реализации изобретения концентрация цитотоксического агента в композиции составляет около 5%.

(b) Индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП).

В данном документе "индуктор ТСЛП" представляет собой соединение, которое способно индуцировать тимусный стромальный лимфопоэтин (ТСЛП). ТСЛП представляет собой кальципотриол. Авторами изобретения было обнаружено, что ТСЛП действует в коже как высокоактивный противоопухолевый цитокин путем рекрутинга CD4+ Th2 клеток для обеспечения иммунного надзора в коже. Способы определения того, является ли соединение индуктором ТСЛП, известны из уровня техники. Например, может быть измерена экспрессия нуклеиновой кислоты ТСЛП, экспрессия белка ТСЛП или активность ТСЛП, как описано более подробно ниже, в разделах 1 (b) i, ii, iii. В конкретном варианте реализации изобретения индуктор ТСЛП может представлять собой кальципотриол.

Структурно модифицированные производные витамина D могут упоминаться как аналоги витамина D. Аналоги витамина D могут быть модифицированы для улучшения биодоступности, растворимости, стабильности и/или технологических свойств по сравнению с немодифицированной версией. В конкретном варианте реализации изобретения аналог витамина D представляет собой кальципотриол. Кальципотриол или кальципотриен или кальцитрен или Dovonex® представляет собой соединение формулы (III):



Формула (III)

В общем лекарственная форма индуктора ТСЛП представляет собой крем, мазь или раствор для местного применения. Однако включены другие подходящие лекарственные формы для местного применения индуктора ТСЛП. Фармацевтические композиции, приспособленные для местного применения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей, масел или бальзамов. Кроме того, местное применение может включать трансдермальное введение, например трансдермальные пластыри или устройства для ионтофореза. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию применяют в виде местной мази или крема.

Дозы индуктора ТСЛП могут варьировать в зависимости от заболевания или расстройства, подлежащего лечению, и/или возраста и состояния субъекта, подлежащего лечению. В конкретном варианте реализации изобретения индуктор ТСЛП представляет собой аналог витамина D кальципотриол. Дозы кальципотриола могут варьировать в зависимости от заболевания или расстройства, подлежащего лечению, и/или возраста и состояния субъекта, подлежащего лечению. В варианте реализации изобретения, в котором композицию, содержащую 5-ФУ и кальципотриол, вводят субъекту, концентрация кальципотриола в композиции составляет от около 0,002 до около 0,005%. В другом примерном варианте реализации изобретения концентрация аналога витамина D в композиции составляет около 0,0025%. В еще одном примерном варианте реализации изобретения концентрация аналога витамина D в композиции составляет около 0,005%.

i) Экспрессия нуклеиновой кислоты ТСЛП.

В варианте реализации изобретения экспрессию нуклеиновой кислоты ТСЛП можно измерять с целью идентификации соединения, которое индуцирует ТСЛП. Например, если экспрессия нуклеиновой кислоты ТСЛП увеличивается в присутствии соединения по сравнению с необработанным контролем, то соединение индуцирует ТСЛП. В конкретном варианте реализации изобретения можно измерять мРНК ТСЛП для идентификации соединения, которое индуцирует ТСЛП.

Способы количественной оценки экспрессии нуклеиновой кислоты в клетках хорошо известны из уровня техники, и все подходящие способы количественной оценки экспрессии нуклеиновой кислоты, известные специалисту из уровня техники, находятся в объеме изобретения. Термин "количественное

определение экспрессии нуклеиновой кислоты" или "уровень экспрессии нуклеиновой кислоты" в данном документе относится к измеряемому показателю уровня экспрессии нуклеиновой кислоты, например, но не ограничиваясь ими, уровня транскрипта матричной РНК (мРНК), экспрессируемого конкретным вариантом или другой частью мРНК, ферментной или другой активности нуклеиновых кислот и уровня конкретного метаболита. Термин "нуклеиновая кислота" включает ДНК и РНК, которые могут быть двухцепочечными или одноцепочечными. Неограничивающие примеры подходящих способов количественной оценки экспрессии нуклеиновой кислоты могут включать применение матриц, таких как микрочипы, ПЦР, такой как ОТ-ПЦР (включая количественную ОТ-ПЦР), анализы с защитой от нуклеазы и Нозерн-блоттинг. В конкретном варианте реализации изобретения количественное определение экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени включает, в частности, измерение уровня экспрессии мРНК нуклеиновой кислоты-мишени.

В одном варианте реализации изобретения экспрессия нуклеиновой кислоты может быть количественно определена путем применения матрицы, такой как микрочип. Способы применения микрочипа нуклеиновой кислоты хорошо и широко известны из уровня техники. Например, зонд нуклеиновой кислоты, который является комплементарным или способен гибридизоваться с продуктом экспрессии гена-мишени, может быть применен в матрице. Термин "гибридизация" или "способен гибридизоваться" относится к специфичному для последовательности нековалентному связывающему взаимодействию с комплементарной нуклеиновой кислотой. В предпочтительном варианте реализации изобретения гибридизацию осуществляют в условиях высокой строгости. Условия подходящей строгости, которые способствуют гибридизации, известны специалистам из уровня техники или могут быть найдены в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1.6.3.6. Термин "зонд" в данном документе относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая будет гибридизоваться с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. В одном примере зонд гибридизуется с РНК-продуктом нуклеиновой кислоты или комплементарной ей последовательности нуклеиновой кислоты. Длина зонда зависит от условий гибридизации, последовательности зонда и целевой последовательности нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации изобретения длина зонда составляет по меньшей мере 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 400, 500 или более нуклеотидов.

В другом варианте реализации изобретения экспрессия нуклеиновой кислоты может быть количественно определена с применением ПЦР. Способы ПЦР хорошо и широко известны из уровня техники и могут включать количественную ПЦР, полуколичественную ПЦР, мультиплексную ПЦР или любую их комбинацию. В частности, экспрессия нуклеиновой кислоты может быть количественно определена с применением количественной ОТ-ПЦР. Способы выполнения количественной ОТ-ПЦР являются обычными для данной области техники. В таком варианте реализации изобретения праймеры, применяемые для количественной ОТ-ПЦР, могут включать прямой и обратный праймер для гена-мишени. Термин "праймер" в данном документе относится к последовательности нуклеиновой кислоты, вне зависимости от того, встречается ли она в природе, например в виде очищенного продукта рестрикционного расщепления, или получена синтетически, которая способна функционировать в качестве точки синтеза при помещении в условия, в которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера, комплементарного цепи нуклеиновой кислоты (например, в присутствии нуклеотидов и индуцирующего агента, такого как ДНК-полимераза, при подходящей температуре и pH). Праймер должен быть достаточно длинным, чтобы праймировать синтез целевого продукта удлинения в присутствии индуцирующего агента. Точная длина праймера будет зависеть от различных факторов, включая температуру, последовательность праймера и применяемые способы. Праймер обычно содержит 15-25 или более нуклеотидов, хотя их количество может быть меньшим или большим. Факторы, учитываемые при определении надлежащей длины праймера, хорошо известны специалистам из уровня техники.

Экспрессия нуклеиновой кислоты может быть измерена количественно путем измерения количества полноразмерного транскрипта мРНК для последовательности нуклеиновой кислоты или измерения части транскрипта мРНК для последовательности нуклеиновой кислоты. Например, если матрица нуклеиновой кислоты применяется для количественного определения экспрессии мРНК, матрица может содержать зонд для части мРНК для целевой последовательности нуклеиновой кислоты или матрица может содержать зонд для полноразмерной мРНК для целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Аналогичным образом в реакции ПЦР праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать всю последовательность кДНК для целевой последовательности нуклеиновой кислоты или часть последовательности кДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует более чем один набор праймеров, которые могут быть применены для амплификации кДНК, полноразмерной или части кДНК для целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Способы конструирования праймеров известны из уровня техники. Способы экстракции РНК из биологического образца известны из уровня техники.

Уровень экспрессии может быть или может не быть нормализован к уровню контрольной нуклеиновой кислоты. Такая контрольная нуклеиновая кислота не должна специфично гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью мРНК по изобретению. Это позволит осуществить сравнение анализов, которые выполняются в различных случаях.

ii) Экспрессия белка ТСЛП.

В другом варианте реализации изобретения может быть измерена экспрессия белка ТСЛП с целью идентификации соединения, которое индуцирует ТСЛП. Например, если экспрессия белка ТСЛП увеличивается в присутствии соединения по сравнению с необработанным контролем, то соединение индуцирует ТСЛП. В конкретном варианте реализации изобретения экспрессия белка ТСЛП может быть измерена с помощью иммуноблоттинга. В другом конкретном варианте реализации изобретения экспрессия белка ТСЛП может быть измерена с применением иммунофлуоресцентного окрашивания.

Способы количественной оценки экспрессии белка хорошо известны из уровня техники, причем все подходящие способы количественной оценки экспрессии белка, известные специалисту из уровня техники, находятся в объеме изобретения. Неограничивающие примеры подходящих способов количественной оценки экспрессии белка могут включать способы на основе агента, связывающегося с эпитопом, и способы на основе масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ количественной оценки экспрессии белка представляет собой масс-спектрометрию. С использованием собственных свойств массы и заряда, масс-спектрометрия (МС) позволяет разделять и уверенно идентифицировать большой спектр сложных соединений, включая белки. В традиционной количественной МС применяется ионизация электрораспылением (ИЭР), с последующей тандемной МС (МС/МС) (Chen et al., 2001; Zhong et al., 2001; Wu et al., 2000), в то время как новые количественные способы разрабатываются с применением матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), с последующей времяпролетной (ВП) МС (Bucknall et al., 2002; Mirgorodskaya et al., 2000; Gobom et al., 2000). В соответствии с настоящим изобретением можно применять масс-спектрометрию для определения уровня белка, кодируемого целевой нуклеиновой кислотой по изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ количественной оценки экспрессии белка представляет собой способ на основе связывающегося с эпитопом агента. Применяемый в данном документе термин "связывающийся с эпитопом агент" относится к антителу, аптамеру, нуклеиновой кислоте, олигонуклеиновой кислоте, аминокислоте, пептиду, полипептиду, белку, липиду, метаболиту, молекуле небольшого размера или ее фрагменту, распознающему и способному связываться с белком гена-мишени. Нуклеиновые кислоты могут включать РНК, ДНК и природное или полученное синтетическим путем производное.

В данном документе термин "антитело" в общем случае обозначает полипептид или белок, который распознает и может связываться с эпитопом антигена. Антитело согласно данному документу может быть полноразмерным антителом, как известно из уровня техники, т.е. состоящим из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, или может представлять собой любую антителоподобную молекулу, которая содержит антигенсвязывающий участок и включает, но не ограничиваясь ими, фрагменты антител, такие как Fab', Fab, F(ab')₂, однодоменные антитела, Fv и одноцепочечные Fv. Термин "антитело" дополнительно относится к поликлональному антителу, моноклональному антителу, химерному антителу и гуманизированному антителу. Способы получения и применения различных конструкций и фрагментов на основе антител хорошо известны из уровня техники. Кроме того, средства получения и характеристики антител хорошо известны из уровня техники (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; которая включена в данный документ ссылкой в полном объеме).

Применяемый в данном документе термин "аптамер" относится к полинуклеотиду, обычно РНК или ДНК, который обладает полезной биологической активностью с точки зрения биохимической активности, распознавания молекул или характеристик связывания. Обычно аптамер обладает молекулярной активностью, такой как связывание с молекулой-мишенью на конкретном эпитопе (участке). Обычно считается, что специфичный аптамер для связывания с полипептидом может быть синтезирован и/или идентифицирован с помощью способов перегруппировки *in vitro*. Средства получения и характеристики аптамеров, включая способы перегруппировки *in vitro*, хорошо известны из уровня техники (см., например, патент США 7939313; включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

В общем способ количественной оценки экспрессии белка, основанный на связывающемся с эпитопом агенте, включает приведение образца, содержащего полипептид, в контакт с агентом, связывающимся с эпитопом, который является специфичным в отношении полипептида, в условиях, эффективно способствующих образованию комплекса между связывающимся с эпитопом агентом и полипептидом. Способы, основанные на связывающемся с эпитопом агенте, могут проводиться в растворе, или агент, связывающийся с эпитопом, или образец может быть иммобилизован на твердой поверхности. Неограничивающие примеры подходящих поверхностей включают микротитровальные планшеты, пробирки, шарики, смолы и другие полимеры.

Агент, связывающийся с эпитопом, может быть прикреплен к подложке различными способами, как будет понятно специалистам в данной области техники. Вначале может быть синтезирован агент, связывающийся с эпитопом, с последующим прикреплением к подложке, или он может быть синтезирован непосредственно на подложке. Подложка и агент, связывающийся с эпитопом, могут быть дериватизированы химическими функциональными группами для последующего их соединения. Например, подложка может быть дериватизирована химической функциональной группой, включая, но не ограничива-

ясь ими, аминокислотные группы, карбоксильные группы, оксигруппы или тиольные группы. С применением указанных функциональных групп агент, связывающийся с эпитопом, может быть присоединен прямо, с помощью функциональных групп, или косвенно, с помощью линкеров.

Дополнительно агент, связывающийся с эпитопом, может быть прикреплен к подложке нековалентным соединением. Например, может быть получен биотинилированный агент, связывающийся с эпитопом, который может ковалентно связываться с поверхностями, покрытыми стрептавидином, что ведет к присоединению. В качестве альтернативы агент, связывающийся с эпитопом, может быть синтезирован на поверхности с применением таких методик как фотополимеризация и фотолитография. Дополнительные способы прикрепления агентов, связывающихся с эпитопом, к твердым поверхностям и способы синтеза биомолекул на подложках хорошо известны из уровня техники, а именно технология VLSIPS производителя Affymetrix (например, см. патент США № 6566495 и Rockett and Dix, *Xenobiotica* 30(2): 155-177, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Приведение образца в контакт с агентом, связывающимся с эпитопом, в эффективных условиях, на протяжении периода времени, достаточного для создания возможности образования комплекса, обычно включает добавление композиции агента, связывающегося с эпитопом, к образцу и инкубацию смеси в течение периода времени, достаточного для связывания агента, связывающегося с эпитопом, с любым присутствующим антигеном. После этого комплекс промывают, и комплекс может быть обнаружен любым способом, хорошо известным из уровня техники. Способы обнаружения комплекса агента, связывающегося с эпитопом, и полипептида в общем основаны на обнаружении метки или маркера. Термин "метка" в данном документе относится к любому веществу, прикрепленному к агенту, связывающемуся с эпитопом, или другому материалу подложки, в котором вещество обнаруживают с помощью способа обнаружения. Неограничивающие примеры подходящих меток включают люминесцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, гасящие флуоресценцию реагенты, окрашенные молекулы, радиоизотопы, сцинтилляторы, биотин, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni²⁺, метку Flag, метку тус, тяжелые металлы и ферменты (включая щелочную фосфатазу, пероксидазу и люциферазу). Способы обнаружения комплекса агента, связывающегося с эпитопом, и полипептида на основе обнаружения метки или маркера хорошо известны из уровня техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой иммуноанализ. Иммуноанализы могут проводиться в ряде различных форматов. В общем иммуноанализы могут быть разделены на две категории: конкурентные иммуноанализы и неконкурентные анализы. В конкурентном иммуноанализе немеченое анализируемое вещество в образце конкурирует с меченым анализируемым веществом за связывание с антителом. Несвязанное анализируемое вещество вымывают и измеряют количество связанного анализируемого вещества. В неконкурентном иммунологическом анализе метку вводят в антитело, а не в анализируемое вещество. В неконкурентных анализах может применяться одно антитело (например, вводят метку в иммобилизованное антитело) или более чем одно антитело (например, по меньшей мере одно иммобилизованное антитело без метки и по меньшей мере одно "блокирующее" или обнаруживающее антитело с меткой). Подходящие метки описаны выше.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой ТИФА. В других вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой радиоиммунный анализ. В других вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой иммуноблоттинг или Вестерн-блоттинг. В альтернативных вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой матрицу. В другом варианте реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой проточную цитометрию. В других вариантах реализации изобретения способ на основе агента, связывающегося с эпитопом, представляет собой иммуногистохимию (ИГХ) или иммунофлуоресценцию. В ИГХ применяют антитело (или флуоресцентно меченное антитело в случае иммунофлуоресценции) для обнаружения и количественного определения антигенов в образцах интактной ткани. Образцы ткани могут быть свежеморожеными и/или фиксированными в формалине, парафине (или пластическом материале) блоками тканей, подготовленными для исследования с помощью ИГХ или иммунофлуоресценции. Способы получения блока ткани для исследования с помощью ИГХ или иммунофлуоресценции, а также способы проведения ИГХ или иммунофлуоресценции хорошо известны из уровня техники.

iii. Активность ТСЛП.

В варианте реализации изобретения может быть измерена активность ТСЛП для идентификации соединения, которое индуцирует ТСЛП. ТСЛП представляет собой цитокин эпителиального происхождения, который принадлежит к цитокиновому семейству интерлейкина-7 (ИЛ-7). ТСЛП действует в коже как высокоактивный противоопухолевый цитокин путем рекрутинга CD4⁺ Th2 клеток. Соответственно воспаление и/или Th2-клетки могут быть определены как показатель активности ТСЛП. Воспаление может быть измерено стандартными для уровня техники способами. Например, воспаление может быть измерено визуально с помощью ИГХ, иммунофлуоресценции и/или ОТ-ПЦР. Неограничивающие маркеры воспаления, которые можно исследовать, включают GR1, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD117,

B220 и ИФН γ . Если воспаление усиливается в присутствии соединения по сравнению с необработанным контролем, то соединение индуцирует ТСЛП.

В другом варианте реализации настоящего изобретения можно произвести подсчет клеток CD4+ и/или клеток CD8+ как показатель активности ТСЛП. Количество клеток CD4+ и/или клеток CD8+ может быть определено стандартными для уровня техники способами. Например, подсчет клеток CD4+ и/или CD8+ клеток можно произвести с помощью проточной цитометрии. Если количество клеток CD4+ и/или CD8+ увеличивается в присутствии соединения по отношению к необработанному контролю, то соединение индуцирует ТСЛП. (с)

Компоненты композиции

В настоящем изобретении дополнительно предлагаются фармацевтические композиции. Фармацевтическая композиция содержит цитотоксическое средство и индуктор ТСЛП в качестве активных ингредиентов и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой разбавитель, связующее вещество, наполнитель, буферный агент, модифицирующий pH агент, дезинтегрант, диспергирующий агент, консервант, смазывающее вещество или краситель. Количество и виды вспомогательных веществ, применяемых для получения фармацевтических композиций, могут быть выбраны в соответствии с известными принципами фармацевтической науки.

В одном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть разбавителем. Разбавитель может быть прессуемым (т.е. пластически деформируемым) или абразивно хрупким. Неограничивающие примеры подходящих прессуемых разбавителей включают микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ), производные целлюлозы, порошкообразную целлюлозу, сложные эфиры целлюлозы (т.е. смешанные сложные эфиры ацетат и бутират), этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, кукурузный крахмал, фосфатированный кукурузный крахмал, прежелатинизированный кукурузный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, маниоковый крахмал, крахмал-лактозу, крахмал-карбонат кальция, крахмал-гликолят натрия, глюкозу, фруктозу, лактозу, моногидрат лактозы, сахарозу, ксилит, маннит, мальтит, сорбит, ксилит, мальтодекстрин и трегалозу. Неограничивающие примеры подходящих абразивно хрупких разбавителей включают двухосновный фосфат кальция (безводный или дигидрат), фосфат кальция, карбонат кальция и карбонат магния.

В другом варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть связующим веществом. Подходящие связующие вещества включают, но не ограничиваясь ими, крахмалы, прежелатинизированные крахмалы, желатин, поливинилпирролидон, целлюлозу, метилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, полиакриламиды, поливинилоксоазолидон, поливиниловые спирты, C₁₂-C₁₈ жирнокислотный спирт, полиэтиленгликоль, полиолы, сахараиды, олигосахараиды, полипептиды, олигопептиды и их комбинации.

В другом варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть наполнителем. Подходящие наполнители включают, но не ограничиваясь ими, углеводы, неорганические соединения и поливинилпирролидон. В качестве неограничивающего примера наполнитель может быть сульфатом кальция, двух- и трехосновным, крахмалом, карбонатом кальция, карбонатом магния, микрокристаллической целлюлозой, двухосновным фосфатом кальция, карбонатом магния, оксидом магния, силикатом кальция, тальком, модифицированными крахмалами, лактозой, сахарозой, маннитом или сорбитом.

В еще одном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть буферным агентом. Характерные примеры подходящих буферных агентов включают, но не ограничиваясь ими, фосфаты, карбонаты, цитраты, трис-буферы и соли для буферизации физиологического раствора (например, трис-буферизованный физиологический раствор или буферизованный фосфатом физиологический раствор).

В различных вариантах реализации изобретения вспомогательное вещество может быть модификатором pH. В качестве неограничивающего примера модификатор pH может представлять собой карбонат натрия, бикарбонат натрия, цитрат натрия, лимонную кислоту или фосфорную кислоту.

В другом варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть дезинтегрантом. Дезинтегрант может быть нешипучим или шипучим. Подходящие примеры нешипучих дезинтегрантов включают, но не ограничиваясь ими, крахмалы, такие как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, эти же виды крахмала в прежелатинизированной и модифицированной форме, подсластители, глины, такие как бентонит, микрокристаллическую целлюлозу, альгинаты, натрий крахмал гликолят, камеди, такие как агар, гуаровая, камедь рожкового дерева, карайя, пектин и трагакант. Неограничивающие примеры подходящих шипучих дезинтегрантов включают бикарбонат натрия в сочетании с лимонной кислотой и бикарбонат натрия в сочетании с винной кислотой.

В еще одном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть диспергирующим или усиливающим диспергирование агентом. Подходящие диспергирующие агенты могут включать, но не ограничиваясь ими, крахмал, альгиновую кислоту, поливинилпирролидоны, гуаровую камедь, каолин, бентонит, очищенную древесную целлюлозу, натрий крахмал гликолят, изоаморфный силикат и микрокристаллическую целлюлозу.

В другом альтернативном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть консервантом. Неограничивающие примеры подходящих консервантов включают антиоксиданты, такие как бутилированный гидроксианизол (БГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), витамин А, витамин С, витамин Е или ретинилпальмитат, лимонная кислота, цитрат натрия; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или ЭГТК; противомикробные средства, такие как парабены, хлорбутанол или фенол.

В еще одном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть смазывающим веществом. Неограничивающие примеры подходящих смазывающих веществ включают минералы, такие как тальк или кремния диоксид; и жиры, такие как растительный стеарин, стеарат магния или стеариновая кислота.

В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения вспомогательное вещество может быть красителем. Подходящие красители включают, но не ограничиваясь ими, пищевые, фармацевтические и косметические красители (FD&C), фармацевтические и косметические красители (D&C) или фармацевтические красители для местного применения и косметические красители (Ext. D&C).

Массовая доля вспомогательного вещества или комбинации вспомогательных веществ в композиции может составлять около 99% или менее, около 97% или меньше; около 95% или менее, около 90% или менее, около 85% или менее, около 80% или менее, около 75% или менее, около 70% или менее, около 65% или менее, около 60% или менее, около 55% или менее, около 50% или менее, около 45% или менее, около 40% или менее, около 35% или менее, около 30% или менее, около 25% или менее, около 20% или менее, около 15% или менее, около 10% или менее, около 5% или менее, около 2% или около 1% или менее от общей массы композиции.

Композиции могут быть приготовлены в виде различных дозированных лекарственных форм и применяться местно с помощью различных средств, которые будут доставлять терапевтически эффективное количество активных ингредиентов. При желании, такие композиции для местного применения в дозированных лекарственных формах могут содержать обычные нетоксичные, фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и вспомогательные вещества. Кроме того, местное применение может включать трансдермальное введение, например трансдермальные пластыри или устройства для ионтофореза. Состав лекарственных средств обсуждается, например, в Gennaro, A.R., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (18th ed, 1995), и Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1980).

Препараты для местного применения (например, трансдермального или трансмукозального) обычно содержат пенетранты, соответствующие барьеру, проникновение сквозь который необходимо обеспечить. Фармацевтические композиции, приспособленные для местного применения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или бальзамов. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция наносится в виде местной мази или крема. При приготовлении в виде мази активный ингредиент может применяться с парафиновой или со смешивающейся с водой мазевой основой. В качестве альтернативы активный ингредиент может быть приготовлен в виде крема с кремовой основой "масло-в-воде" или кремовой основой "вода-в-масле". Фармацевтические композиции, приспособленные для местного глазного применения, включают глазные капли, в которых активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, особенно в водном растворителе. Фармацевтические композиции, приспособленные для местного применения во рту, включают леденцы, таблетки и полоскания для рта. Трансмуккозальное введение может осуществляться путем применения назальных спреев, аэрозолей, таблеток или суппозитория, а трансдермальное введение может осуществляться посредством мазей, бальзамов, гелей, пластырей или кремов, как в общем известно из уровня техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию, содержащую цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, инкапсулируют в подходящем носителе с целью доставки соединения в клетки-мишени, для повышения стабильности композиции или для минимизации потенциальной токсичности композиции. Как должно быть понятно квалифицированным специалистам, различные носители пригодны для доставки композиции по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры подходящих структурированных систем доставки жидкости могут включать наночастицы, липосомы, микроэмульсии, мицеллы, дендримеры и другие системы, содержащие фосфолипиды. Способы введения композиций в средства доставки известны из уровня техники.

В одном альтернативном варианте реализации изобретения для введения может быть применен липосомальный носитель. Липосомы, в зависимости от варианта реализации изобретения, пригодны для введения цитотоксического агента и индуктора ТСЛП благодаря их структурным и химическим свойствам. В общем липосомы представляют собой сферические пузырьки с двухслойной фосфолипидной мембраной. Липидный бислой липосомы может сливаться с другими бислоями (например, клеточной мембраной), таким образом доставляя содержимое липосомы в клетки. Таким способом цитотоксический агент и индуктор ТСЛП могут быть избирательно доставлены в клетку путем инкапсулирования в липосому, которая сливается с мембраной клетки-мишени.

Липосомы могут состоять из множества различных типов фосфолипидов с различной длиной углеводородной цепи. В общем фосфолипиды содержат две жирных кислоты, соединенные посредством гли-

церофосфата в одну из различных полярных групп. Подходящие фосфолипиды включают фосфатидную кислоту (ФК), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ), дифосфатидилглицерин (ДФГ), фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтанолламин (ФЭ). Длина цепей жирных кислот, из которых состоят фосфолипиды, может находиться в диапазоне от около 6 до около 26 атомов углерода, причем липидные цепи могут быть насыщенными или ненасыщенными. Подходящие цепи жирных кислот включают (тривиальное название представлено в скобках), н-додеканоат (лаурат), н-тетрадеканоат (мирилат), н-гексадеканоат (пальмитат), н-октадеканоат (стеарат), н-эйкозаноат (арахидат), н-докозаноат (бегенат), н-тетракозаноат (лигноцерат), цис-9-гексадеканоат (пальмитолеат), цис-9-октадеканоат (олеат), цис,цис-9,12-октадекандиеноат (линолеат), все цис-9,12,15-октадекатриеноат (линоленат) и все цис-5,8,11,14-эйкозатетраеноат (арахидонат). Две цепи жирных кислот фосфолипида могут быть одинаковыми или различными. Пригодные фосфолипиды включают диолеил-ФС, диолеил-ФХ, дистеароил-ФС, дистеароил-ФХ, димиристоил-ФС, димиристоил-ФХ, дипальмитоил-ФГ, стеароил,олеил-ФС, пальмитоил,линоленил-ФС и т.п.

Фосфолипиды могут происходить из любого природного источника, и, таким образом, могут представлять собой смесь фосфолипидов. Например, яичный желток богат ФХ, ФГ и ФЭ, соевые бобы содержат ФХ, ФЭ, ФИ и ФК, а головной или спинной мозг животных богат ФС. Кроме того, фосфолипиды могут быть получены из синтетических источников. Могут применяться смеси фосфолипидов с различным соотношением индивидуальных фосфолипидов. Смеси различных фосфолипидов могут давать липосомальные композиции с лучшей активностью или стабильностью активности. Вышеупомянутые фосфолипиды могут быть смешаны в оптимальных соотношениях с катионными липидами, такими как N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид, 1,1'-диокадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлорат, 3,3'-дегептилоксакарбоцианина йодид, 1,1'-дедодецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлорат, 1,1'-диолеил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина метансульфонат, N-4-(делинолеиламиностирил)-N-метилпиридиния йодид или 1-линолеил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлорат.

Липосомы необязательно могут содержать сфинголипиды, причем сфингозин представляет собой структурный аналог глицерина и одной из жирных кислот фосфоглицерида или холестерина, основного компонента клеточных мембран у животных. Липосомы необязательно могут содержать модифицированные ПЭГ липиды, которые представляют собой липиды, ковалентно связанные с полиэтиленгликолевыми (ПЭГ) полимерами. Размер ПЭГ может находиться в диапазоне от около 500 до около 10000 Дальтон.

Липосомы могут дополнительно содержать подходящий растворитель. Растворитель может быть органическим растворителем или неорганическим растворителем. Подходящие растворители включают, но не ограничиваясь ими, диметилсульфоксид (ДМСО), метилпирролидон, N-метилпирролидон, ацетонитрил, спирты, диметилформамид, тетрагидрофуран или их комбинации.

Липосомы, несущие цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, могут быть получены любым известным способом получения липосом для доставки лекарственного средства, например такими, как описаны в патентах США №№ 4241046, 4394448, 4529561, 4755388, 4828837, 4925661, 4954345, 4957735, 5043164, 5064655, 5077211 и 5264618, описание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, липосомы могут быть получены путем обработки липидов ультразвуком в водном растворе, инъекции растворителя, гидратации липида, обратного испарения или лиофилизации с многократным замораживанием и оттаиванием. В предпочтительном варианте реализации изобретения липосомы формируют путем обработки ультразвуком. Липосомы могут быть многослойными, содержащими несколько слоев, подобно луку, или однослойными. Липосомы могут быть большими или маленькими. Длительная обработка ультразвуком с высоким сдвигом проявляет тенденцию к образованию однослойных липосом меньшего размера.

Как будет понятно специалисту, все параметры, которые управляют образованием липосом, могут варьировать. Такие параметры включают, но не ограничиваясь ими, температуру, pH, концентрацию соединения метионина, концентрацию и состав липидов, концентрацию поливалентных катионов, скорость перемешивания, присутствие и концентрацию растворителя.

В другом варианте реализации изобретения композиция по настоящему изобретению может быть доставлена в клетку в виде микроэмульсии. Микроэмульсии, как правило, представляют собой прозрачные, термодинамически стабильные растворы, содержащие водный раствор, поверхностно-активное вещество и "масло". "Масло" в данном случае представляет собой суперкритическую жидкую фазу. Поверхностно-активное вещество остается на поверхности раздела масло-вода. Любое из множества поверхностно-активных веществ является подходящим для применения в микроэмульсионных композициях, включая описанные в данном документе или другие, известные из уровня техники. Водные микроэмульсии, подходящие для применения в изобретении, в общем будут иметь характерные структурные размеры от около 5 до около 100 нм. Агрегаты указанного размера являются слабыми рассеивателями видимого света, и, следовательно, такие растворы будут оптически прозрачными. Как будет понятно квалифицированному специалисту, микроэмульсии могут и будут иметь множество различных микроскопических структур, включая сферу, стержень или агрегаты в форме диска. В одном варианте реализации изобретения структура может представлять собой мицеллы, которые являются простейшими микро-

эмульсионными структурами и обычно представляют собой сферические или цилиндрические объекты. Мицеллы подобны каплям масла в воде, а обратные мицеллы подобны каплям воды в масле. В альтернативном варианте реализации изобретения структура микроэмульсии представляет собой пластины. Она состоит из последовательных слоев воды и масла, разделенных слоями поверхностно-активного вещества. "Масло" микроэмульсий в идеале содержит фосфолипиды. Любой из фосфолипидов, подробно описанных выше для липосом, пригоден для вариантов реализации изобретения, относящихся к микроэмульсиям. Цитотоксический агент и индуктор ТСЛП могут быть инкапсулированы в микроэмульсию любым способом, в общем известным из уровня техники.

В еще одном варианте реализации изобретения цитотоксический агент и индуктор ТСЛП могут доставляться в виде дендритной макромолекулы или дендримера. В общем дендример представляет собой разветвленную древовидную молекулу, в которой каждая ветвь представляет собой сцепленные цепи молекул, разделяющиеся на две новых ветви (молекулы) после определенной длины. Такое ветвление продолжается до тех пор, пока ветви (молекулы) не становятся настолько плотно упакованными, что купол образует шар. В общем свойства дендримеров определяются функциональными группами на их поверхности. Например, гидрофильные концевые группы, такие как карбоксильные группы, обычно дают водорастворимый дендример. В качестве альтернативы фосфолипиды могут быть введены на поверхности дендримера для облегчения всасывания через кожу. Любой из фосфолипидов, подробно описанных для применения в относящихся к липосомам вариантах реализации изобретения, подходит для применения в вариантах реализации изобретения, относящихся к дендримерам. Любой способ, в общем известный из уровня техники, может быть применен для получения дендримеров и для инкапсулирования композиций по изобретению в них. Например, дендримеры могут быть получены посредством итеративной последовательности реакционных стадий, в которой каждая дополнительная итерация дает дендример более высокого порядка. Таким образом, они имеют правильную, высоко разветвленную 3D структуру с практически однородным размером и формой. Кроме того, конечным размером дендримера обычно управляют, регулируя количество итерационных стадий, применяемых в процессе синтеза. Разнообразные размеры дендримера являются подходящими для применения в настоящем изобретении. В общем размер дендримеров может находиться в диапазоне от около 1 до около 100 нм.

II. Способы.

Авторами изобретения неожиданно было обнаружено, что при лечении предраковых поражений кожи композиция, содержащая цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, является значительно более эффективной, чем монотерапия цитотоксическим средством, с более коротким курсом лечения. Это неожиданное открытие имеет дополнительное преимущество уменьшения риска побочных эффектов, тем самым потенциально повышая соблюдение пациентом режима лечения. Индуктор ТСЛП служит цели индукции экспрессии ТСЛП, таким образом, модулируя иммунное окружение в коже. Цитотоксический агент индуцирует апоптоз в клетках, которые высвобождают антигены, усиливающие иммунный ответ, инициированный с помощью индуктора ТСЛП.

В одном аспекте изобретение включает способ лечения предракового поражения кожи, включающий местное применение на пораженном участке композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП. В конкретном варианте реализации изобретения композицию можно применять в течение 7 дней. Композицию можно применять дважды в сутки в течение 4-6 дней.

В другом варианте реализации изобретения изобретение включает способ предотвращения развития предракового поражения кожи, включающий местное применение у субъекта с риском развития предракового поражения кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения композицию можно применять в течение 7 дней. Композицию можно применять дважды в сутки в течение 4-6 дней.

В данном документе "предраковое поражение кожи" обозначает поражение кожи, которое может прогрессировать до рака кожи, но не собственно рак. Неограничивающие примеры видов предракового поражения могут включать актинический кератоз (солнечный кератоз), актинический хейлит (губа фермера), роговую кератому, родинку (невус) и диспластические невусы. В конкретном варианте реализации изобретения предраковое поражение кожи представляет собой актинический кератоз. Способы идентификации предраковых поражений кожи известны из уровня техники. Например, биопсия кожи или дерматоскопия может идентифицировать предраковое поражение кожи. Обзор дерматоскопии и ее применения для диагностики предраковых поражений кожи приведен в Giacomel et al., *Dermatol Clin* 2013, 31: 649-678, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, при дерматоскопии непигментированный актинический кератоз (АК) лица обычно показывает беловато-желтые поверхностные чешуйки и земляничный рисунок, причем последний состоит из эритематозной (от розового до красного цвета) псевдосетки, окружающей волосные фолликулы. Отверстия волосных фолликул окружены белым ореолом и заполнены локальными желтоватыми кератозными пробками, что дает специфический внешний вид. Кроме того, тонкие, линейно-волнообразные сосуды часто наблюдаются вокруг волосных фолликул. Дополнительно в случае участков АК на лице иногда можно увидеть небольшие кольцеобразные сосуды.

Гистология также может быть применена для диагностики предракового поражения. Например, ак-

тинический кератоз (АК) определяется на гистологическом уровне по дисплазии и состоит из кератиноцитов с атипичными ядрами, которые являются увеличенными, неправильной формы и гиперхромными. Кроме того, АК демонстрирует разупорядоченный рост, который прерывает дифференциацию и приводит к утолщению рогового слоя с сохранением ядер. Для стратификации степеней дисплазии эпидермиса шкала с трехуровневой градацией была предложена для АК, которая параллельно применяется для оценки дисплазии шейки матки. Гистологическими признаками кератиноцитной внутриэпидермальной неоплазии I (KIN I) является атипия базальных кератиноцитов, ограниченная нижней третью эпидермиса. KIN II показывает атипичные кератиноциты, занимающие две нижних трети эпидермиса, и KIN III показывает атипичные кератиноциты по всему эпидермису; эта последняя степень эквивалентна карциноме *in situ*. Локализованная эпидермальная атипия при АК отражает частичное разрушение программы дифференцировки, в то время как более полное разрушение программы дифференцировки связано с плоскоклеточной карциномой (SCC) *in situ* (SCCIS). Квалификация критериев KIN включает оценку макроскопических и микроскопических признаков АК. Кроме того, клинические проявления, анамнез пациента, например воздействие УФ-света, и внешний вид поражения могут позволить идентифицировать предраковое поражение. Например, актинический кератоз (АК) обычно появляется на незащищенных от солнечного света участках, таких как лицо, лысая кожа волосистой части головы, губы и тыльная сторона кистей. Поражение в форме актинического кератоза может быть плоским или слегка выступающим, обычно менее 1 дюйма в диаметре, грубой текстуры, сухим, чешуйчатым и может напоминать бородавки. В большинстве случаев оно имеет красный цвет, а в некоторых случаях имеет рыжеватый, розовый, красный и/или телесный оттенок. В конкретном варианте реализации изобретения способы по настоящему изобретению можно применять для лечения АК поражения KIN I, KIN II и/или KIN III типа.

В другом аспекте изобретение дополнительно включает способ предотвращения перехода предракового поражения кожи в рак, включающий идентификацию субъекта с одним или более предраковыми поражениями кожи и местное применение на участке(ах) предракового поражения кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, причем участок (участки) предракового поражения кожи уменьшается в размере таким образом, что развитие рака кожи предотвращается. В конкретном варианте реализации изобретения композицию можно применять в течение 7 дней. В другом конкретном варианте реализации изобретения рак кожи представляет собой немеланомный рак кожи. Нелеченный актинический кератоз может прогрессировать до плоскоклеточной карциномы (SCC). Соответственно изобретение включает способ предотвращения прогрессирования поражения в форме актинического кератоза до плоскоклеточной карциномы; способ включает идентификацию субъекта с одним или несколькими участками актинического кератоза и местное применение на участке(ах) актинического кератоза композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, причем участок (участки) актинического кератоза уменьшается в размере таким образом, что развитие плоскоклеточной карциномы предотвращается. В конкретном варианте реализации изобретения композицию можно применять в течение 7 дней.

В другом аспекте изобретение включает способ лечения неракового поражения кожи. Способ включает идентификацию субъекта с одним или более участками незлокачественного поражения кожи и местное применение на участке(ах) незлокачественного поражения кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, причем участок (участки) незлокачественного поражения кожи уменьшается в размере. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения композицию можно применять в течение 10 дней. Подходящие незлокачественные поражения кожи могут включать бородавки и аналогичные вирусные инфекции кожи. Неограничивающие примеры могут включать в себя подошвенные бородавки, кожные бородавки, аногенитальные бородавки, простые бородавки, плоские бородавки, нитевидные бородавки и бородавкоподобные повреждения, связанные с вирусными инфекциями кожи, такими как вирусы папилломы человека и контактный моллюск. Способы диагностики бородавок известны из уровня техники. В целом квалифицированный специалист будет способен диагностировать бородавки в ходе осмотра. Однако, для диагностики бородавок может быть дополнительно применена биопсия. Бородавки могут появляться в любом месте на теле, однако лицо, кисть руки, палец, нога и гениталии представляют собой наиболее распространенную локализацию. Бородавки могут быть шероховатыми, гладкими, плоскими, выступающими, содержащими черные "включения", круглыми, овальными, и могут быть светлее или темнее окружающей кожи.

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения немеланомного рака кожи. Способ включает идентификацию субъекта с немеланомным раком кожи и местное применение на участке немеланомного рака кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, причем участок немеланомного рака кожи уменьшается в размере. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения композицию можно применять в течение 10 дней. Неограничивающие примеры видов немеланомного рака кожи могут включать базально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, болезнь Боуэна, кератоакантомы, клеточную карциному из клеток Меркеля, кожные лимфомы (кожи), саркому Капоши, опухоли придатков кожи, карциномы сальных желез и саркомы. В около 80% случаев рак развивается из базальных клеток кожи и называется базально-клеточной карциномой. Базально-клеточная карцинома наиболее часто возникает на голове и шее. Она вызывается главным обра-

зом воздействием солнечного света или развивается у людей, которым в детстве проводили лучевую терапию. Данный тип рака кожи обычно растет медленно и редко образует метастазы (распространяется) в других частях тела. В около 20% случаев рак кожи развивается из сквамозных клеток и называется плоскоклеточной карциномой. Этот тип рака вызывается главным образом солнечным светом, но он может появляться на участках кожи, которые были обожжены, повреждены химикатами или подвергались воздействию рентгеновских лучей. Участки хронического воспалительного состояния кожи, слизистые оболочки (кожа вокруг рта, носа, ануса и влагалища) и губы поражаются плоскоклеточной карциномой. Плоскоклеточный рак редко образует метастазы, но его распространение более вероятно, чем распространение базально-клеточной карциномы. Способы идентификации немеланомного рака кожи известны из уровня техники. В целом специалист будет способен диагностировать немеланомный рак кожи посредством осмотра. Однако для диагностики немеланомного рака кожи может быть дополнительно применена биопсия.

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения меланомного рака кожи. Способ включает идентификацию пациента с меланомным раком кожи и местное применение на участке меланомного рака кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, причем участок меланомного рака кожи уменьшается в размере. В конкретном варианте реализации изобретения композицию можно применять в течение 10 дней. Меланома возникает, когда раковые клетки образуются в клетках кожи под названием меланоциты. В частности, способы по изобретению могут быть применены для лечения меланомы *in situ* (MIS). MIS дополнительно упоминается, как стадия 0 меланомы. На стадии 0 в эпидермисе обнаруживаются аномальные меланоциты. В общем MIS затрагивает только верхний слой кожи. Такие аномальные меланоциты могут становиться злокачественными и распространяться в близлежащие участки нормальной ткани. Способы диагностики и идентификации меланомы известны из уровня техники. В общем, меланому можно диагностировать на основе семейного анамнеза, анамнеза пациента, клинической картины и/или исследования кожной биопсии бородавки с измененным размером, формой или цветом, неровными краями или кромкой, более чем одного цвета, асимметричной, зудящей или выделяющей жидкость, кровь или изъязвленной, с изменениями пигментированной кожи или сателлитных бородавок.

Результатом применения композиции по изобретению может стать уменьшение размера пораженного участка более чем на 50%, по сравнению со стандартной схемой лечения. Например, результатом применения композиции по изобретению может стать уменьшение размера пораженного участка более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90%, более чем на 95% или на 100% по сравнению со стандартной схемой лечения. Например, композиция, содержащая 5-ФУ и аналог витамина D, может давать уменьшение размера пораженного участка более чем на 50% относительно композиции, содержащей 5-ФУ в качестве единственного активного агента. В некоторых вариантах реализации изобретения результатом применения композиции, содержащей 5-ФУ и аналог витамина D, может стать уменьшение размера пораженного участка более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90%, более чем на 95% или на 100%, по сравнению с композицией, содержащей 5-ФУ в качестве единственного активного агента. В варианте реализации изобретения, в котором происходит уменьшение размера поврежденного участка на 100%, можно считать, что поражение устранено.

Способы по изобретению могут уменьшать частоту и/или тяжесть побочных эффектов относительно частоты и/или тяжести побочных эффектов, обычных для стандартной схемы лечения. Неограничивающие примеры побочных эффектов во время местного применения цитотоксического агента включают локальную боль, зуд, покалывание, жжение, ощущение иголок, образование корки, выделение жидкости, дерматит, фоточувствительность, головную боль, бессонницу, раздражительность, сыпь, лейкоцитоз, тромбоцитопению, врожденные пороки развития, воспаление, выкидыш, простой герпес, аллергический контактный дерматит, телеангиэктазию, гипер- или гипопигментацию и рубцевание. В частности, частота и/или тяжесть покраснения, шелушения, образования корки, зуда и жжения может быть уменьшена по сравнению со стандартной схемой лечения. Например, снижение частоты и/или тяжести побочных эффектов может составлять 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% относительно стандартной схемы лечения.

(a) Введение.

В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество композиции по изобретению можно вводить субъекту. Введение осуществляют с применением стандартных эффективных способов. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения композицию применяют местно. Композиция по изобретению может применяться местно в виде мази, крема, суспензии, лосьона, порошка, раствора, пасты, геля, спрея, аэрозоля, мази, пластыря или масла. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию по изобретению применяют в виде мази или крема для местного применения.

Для терапевтического применения терапевтически эффективное количество композиции по изобретению вводят субъекту. "Терапевтически эффективное количество" обозначает количество терапевтической композиции, достаточное для получения измеримого ответа (например, уменьшение размера пора-

женного участка, уменьшение количества пораженных участков, снижение токсичности и улучшение переносимости лечения, индукция ТСЛП, уменьшение тяжести симптомов, связанных с поражением, таких как покраснение, шелушение, образование корки, зуд, жжение и утолщение, нормализация дифференцировки кератиноцитов и экспрессии гена, восстановление целостности эпидермиса с компетентной барьерной функцией, уменьшение аномальной клеточной пролиферации и воспаления). Фактические уровни дозы активных ингредиентов в терапевтической композиции по изобретению могут быть изменены таким образом, чтобы вводить количество активного(ых) соединения(соединений), которое является эффективным с точки зрения достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента. Выбранный уровень доз будет зависеть от различных факторов, включая активность терапевтической композиции, состав, способ введения, комбинацию с другими лекарственными средствами или терапевтическими средствами, возраст, предраковое поражение, немеланомный рак кожи, меланомный рак кожи, бородавку, симптомы, физическое состояние и анамнез пациента, подлежащего лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения вводят минимальную дозу, а затем дозу увеличивают при условии отсутствия ограничивающей дозу токсичности. Определение и коррекция терапевтически эффективной дозы, а также оценка времени и способа осуществления такой коррекции известны обычным специалистам в области медицины.

Расписание лечения относительно самого заболевания и продолжительность лечения будут определяться обстоятельствами конкретного случая. Лечение может начинаться прямо в госпитале или клинике или позже, после выписки из госпиталя или после амбулаторного осмотра в клинике.

В одном аспекте применение композиции по изобретению может привести к уменьшению продолжительности лечения относительно стандартной схемы лечения. Например, стандартная схема лечения может составлять дважды в сутки в течение 2 недель. Однако заявителями неожиданно было обнаружено, что сокращенный курс лечения приводит к значительному уменьшению размера пораженного участка относительно стандартной схемы лечения. Таким образом, продолжительность лечения может составлять менее чем 14 дней. Например, продолжительность лечения может составлять около 13 дней, около 12 дней, около 10 дней, около 9 дней, около 8 дней, около 7 дней, около 6 дней, около 5 дней, около 4 дней, около 3 дней, около 2 дней или около 1 дня. В некоторых вариантах реализации изобретения продолжительность лечения может составлять 10 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня или 2 дня. В одном варианте реализации изобретения продолжительность лечения может составлять 7 дней. В другом варианте реализации изобретения продолжительность лечения может составлять от 4 до 6 дней. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения продолжительность лечения может составлять 4 дня. В другом конкретном варианте реализации настоящего изобретения продолжительность лечения может составлять 6 дней.

Стандартная частота введения составляет дважды в сутки. Соответственно частота применения композиции по изобретению может составлять дважды в сутки. В качестве альтернативы предполагается, что частота введения может быть изменена. Например, частота введения может составлять один, два или три раза в сутки. Увеличение частоты введения может привести к уменьшению продолжительности лечения. С другой стороны, уменьшение частоты введения может привести к увеличению продолжительности лечения.

(b) Субъект.

Субъектом может быть грызун, человек, сельскохозяйственное животное, домашнее животное или зоологическое животное. В одном варианте реализации изобретения субъект может быть грызуном, например мышью, крысой, морской свинкой и т.д. В другом варианте реализации изобретения субъект может быть сельскохозяйственным животным. Неограничивающие примеры подходящих сельскохозяйственных животных могут включать свиней, коров, лошадей, коз, овец, лам и альпак. В еще одном варианте реализации изобретения пациент может быть домашним животным. Неограничивающие примеры домашних животных могут включать таких домашних животных как собаки, кошки, кролики, а также птицы. В еще одном варианте реализации изобретения субъект может быть зоологическим животным. В данном документе "зоологическое животное" обозначает животное, которое может содержаться в зоопарке. Такие животные могут включать приматов, больших кошек, волков и медведей. В предпочтительном варианте реализации изобретения субъект является человеком.

Человек может быть любого возраста. Однако поскольку меланома, немеланомный рак кожи и предраковые поражения кожи, как правило, связаны со старением человека, он может быть человеком старшего возраста. В некоторых вариантах реализации изобретения возраст человека может составлять около 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 лет или более. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 30 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 40 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 45 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 50 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 55 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 60 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека

составляет 65 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 70 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 75 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 80 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 85 лет или более. В других предпочтительных вариантах реализации изобретения возраст человека составляет 90 лет или более.

Кроме того, субъект может быть субъектом с риском развития предракового поражения кожи. Специалист будет способен определить субъекта с риском развития предракового поражения кожи. Например, субъект может быть определен как подверженный риску развития предракового поражения кожи на основе семейного анамнеза, анамнеза пациента, клинической картины, исследования биопсии кожи, дерматоскопии, воздействия солнечного света и/или воздействия на кожу химикатов или рентгеновских лучей. Конкретные области риска могут включать незащищенные от солнечного света участки, такие как лицо, лысая кожа волосистой части головы, губы и тыльная сторона кистей рук.

Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов реализации изобретения. Специалистам в данной области техники необходимо понимать, что способы, описанные в примерах, представляют примерные методики, которые, как было обнаружено авторами изобретения, эффективны в практике изобретения и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы практики изобретения. Однако специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия будет понятно, что может быть осуществлено множество модификаций конкретно раскрытых вариантов реализации изобретения, и все же получены подобные или аналогичные результаты без выхода за пределы объема изобретения.

Пример 1. Клиническое испытание для оценки роли кальципотриола при лечении предраковых поражений кожи.

Цели

Авторы изобретения предположили, что кальципотриол может применяться для создания противоопухолевого иммунного окружения в коже человека, что приводит к устранению актинического кератоза. Таким образом, авторами изобретения проведено клиническое испытание для проверки этой гипотезы. Цель клинического испытания состояла в том, чтобы определить терапевтический потенциал кальципотриола при лечении актинического кератоза у человека. Кальципотриол оказывает свое противоопухолевое действие, по меньшей мере частично, путем модулирования иммунного окружения в коже. Таким образом, с целью оптимизации воздействия антигена на иммунные клетки, атакующие кожные опухоли, будет исследована способность кальципотриола усиливать эффекты местного химиотерапевтического агента, 5-фторурацила, который в настоящее время применяется в клинической практике для лечения актинического кератоза. Индукция 5-фторурацилом апоптоза опухолевых клеток будет высвобождать антигены, которые могут усиливать иммунный ответ, инициированный с помощью кальципотриола. Следовательно, будет сравниваться ответ пациентов с множественным актиническим кератозом на местное применение кальципотриола+5-фторурацила против монотерапии 5-фторурацилом в течение 4-дневного периода лечения с введением дважды в сутки. Группы лечения будут распределяться на основе анатомической области, пораженной актиническим кератозом (кожа волосистой части головы, лицо, верхняя правая конечность и верхняя левая конечность) для дополнительного разграничения сайт-специфических эффектов лечения. Первичным конечным показателем исследования является сравнение эффективности местного кальципотриола+5-фторурацила против монотерапии 5-фторурацилом при лечении актинического кератоза у пациентов с рассеянным актиническим кератозом в каждой из четырех анатомических областей (кожа волосистой части головы, лицо, верхняя правая конечность и верхняя левая конечность). Целевой результат представляет процентное изменение от исходного количества участков актинического кератоза в целевой области лечения на коже волосистой части головы, лице, верхней правой конечности и верхней левой конечности через 8 недель после лечения. Вторичные конечные показатели исследования включают: определение полного и частичного (>75%) очищения актинического кератоза через 8 недель после лечения; определение токсичности и переносимости местного 5-фторурацила+кальципотриола против монотерапии 5-фторурацилом при лечении актинического кератоза в конце 4-дневного курса лечения; контроль индукции кальципотриолом экспрессии ТСЛП в кератиноцитах на участке актинического кератоза в конце 4-дневного курса лечения; определение любых отличий в ответе на местное применение 5-фторурацила+кальципотриола против монотерапии 5-фторурацилом для четырех анатомических участков через 8 недель после лечения.

Критерии отбора

В данном рандомизированном, двойном слепом клиническом испытании участники с актиническим кератозом были случайным образом распределены для получения местного препарата 5-ФУ+кальципотриола (тестовая группа) или 5-ФУ+вазелина (контрольная группа) дважды в сутки в течение 4 дней методом самостоятельного нанесения.

Таблица 1. Критерии отбора: включения и исключения

Критерии включения:	Критерии исключения:
Возраст по меньшей мере 50 лет Наличие от четырех до пятнадцати отдельных, клинически типичных, видимых участков актинического кератоза на площади 25 см² в любой из четырех анатомических областей: кожа волосистой части головы, лицо, верхняя правая конечность и верхняя левая конечность Возможность и желание пациента принять участие в исследовании (получено информированное согласие)	Подлежащая лечению область находится в пределах 5 см от неполностью зажившей раны или подозреваемой базально-клеточной или плоскоклеточной карциномы Подлежащая лечению область содержит гипертрофические и гиперкератозные участки, участки роговой кератомы или пораженные участки, которые не отвечали на повторную криотерапию Недавнее (в пределах месяца) применение лекарственных средств, которые могут помешать оценке подлежащей лечению области (например, препараты для местного применения, кремы для
	искусственного загара, иммуносупрессанты, иммуномодуляторы, цитотоксические средства, УФ-фототерапия В, другие терапевтические средства для лечения актинического кератоза или пероральные ретиноиды) Женщина в возрасте менопаузы (во избежание риска беременности) Анамнез гиперкальциемии или клинических проявлений токсичности витамина D

Процедура регистрации

В данное рандомизированное, двойное слепое исследование были набраны 132 пациента с актиническим кератозом по мере того как они обращались в дерматологическую клинику Вашингтонского университета. Отделение дерматологических клинических испытаний медицинского института Вашингтонского университета (МИВН) известно на общегосударственном уровне как разработчик и участник проведения клинических терапевтических испытаний. Отделение клинических испытаний проводит выборку из большой базы пациентов подразделения - свыше 50000 визитов пациентов в год. Основанием до 15% указанных визитов является лечение актинического кератоза [11]. Пациентам старше 50 лет, которые соответствовали критериям включения в исследование, предлагали принять участие в исследовании в соответствии с директивами комитета по этике (ЭК). Если пациент хотел и имел возможность принять участие, он давал информированное согласие и регистрировался в исследовании с учетом анатомической области лечения. Если у участника присутствовали две или более отвечающих критериям анатомических области, лечащий врач выбирал одну в качестве основной анатомической области, а другие области считали вторичными. Основную анатомическую область выбирали со следующей приоритетностью: кожа волосистой части головы > лицо > верхняя левая конечность > верхняя правая конечность. Во всех случаях участники получали один препарат, который они наносили на все пораженных области, во избежание путаницы. Применяли четыре рандомизированных списка лекарственных средств, по одному для каждой основной анатомической области (кожа волосистой части головы, лицо, верхняя правая конечность и верхняя левая конечность).

Лечащий врач выбирал основную и вторичные анатомические области (если это уместно) для лечения, документировал количество участков клинически проявленного актинического кератоза, отмечал пораженные участки на прозрачной пленке и по отдельности фотографировал подлежащую(ие) лечению область(и). Участники были рандомизированы для получения препаратов для местного применения 5-ФУ+кальципотриол (тестируемая группа) или 5-ФУ+вазелина (контрольная группа) путем обращения к списку рандомизации для их основной анатомической области. Если список рандомизации для анатомической области был заполнен (40 для каждой области), то в качестве основной области врач выбирал другую соответствующую критериям анатомическую область, если таковая имелась. Участники исследования наносили исследуемое лекарственное средство на все соответствующие критериям области, подлежащие лечению, два раза в сутки в течение 4 дней подряд, начиная с дня после начального визита. Лекарственные средства для местного применения выдавали участникам бесплатно в ходе начального визита. Участников просили посетить клинику для визита контрольного наблюдения на 5 день (т.е. в день после последнего нанесения), а также на 2 и 4 неделе (оба визита были рекомендованными, но не обязательными) и на 8 неделе. В ходе каждого визита обработанную кожу оценивали на предмет каких-либо признаков раздражения (включая эритему, образование корки или изъязвление эритемы (с применением шкалы эритемы, табл. 2)), причем актинический кератоз оценивали клинически и фотографировали. Остальные участки актинического кератоза отмечали на прозрачных пленках в ходе последнего визита (8 неделя). Со всеми участниками, которые сделали выбор не посещать клинику на 2 и/или 4 неделе, связывались по телефону на 2 и 4 неделе и расспрашивали о состоянии обработанной кожи, наличии каких-либо побочных эффектов, ходе заживления участков биопсии, а также просили отправить фотографии электронной почтой (если пациенты давали согласие на отправку сообщений электронной почтой). Все записи хранились в закрытом на замок офисе или на защищенном паролем компьютере, которые были доступны только персоналу исследования.

Таблица 2. Шкала эритемы позволяет количественно оценить побочные эффекты со стороны кожи, связанные с применением исследуемых лекарственных средств

0	Эритема отсутствует
1	Легкая эритема
2	Выраженная эритема с минимальным шелушением
3	Выраженная эритема со значительным шелушением
4	Выраженная эритема с шелушением, образованием корок, зудом и жжением

Методика исследования/лечения

В ходе начального визита (0 день) соответствующую(ие) критериям область(и) актинического кератоза для лечения очерчивали, подсчитывали пораженные участки, отмечали на прозрачной пленке, фотографировали и назначали исследуемый препарат на основании списка рандомизации, соответствующего основной анатомической области участника (фиг. 1). Участники наносили назначенные препараты на все соответствующие критериям анатомические области, начиная с дня после начального визита. Их инструктировали нанести тонкий слой лекарственного средства на пораженную кожу, положить руку на пораженную область и тщательно втереть в кожу дважды в сутки (утром и перед сном) в течение четырех дней подряд. Участники должны тщательно вымыть руки после каждого нанесения. Участники должны избегать воздействия природного или искусственного солнечного света (включая солярии, УФ-лампы и т.д.) в течение 4-дневного периода лечения и применять солнцезащитные средства SPF 50+ после нанесения лекарственного средства утром каждого дня (солнцезащитные средства были предоставлены участникам). Участникам выдавали дневник для записи даты и времени нанесения лекарственного средства, применения солнцезащитных средств и любых побочных эффектов. Участники возвращались в клинику для повторной оценки на 5 день, 2 (необязательно), 4 (необязательно) и 8 неделе. В клинике лечащие врачи подсчитывали количество пораженных актиническим кератозом участков у участников и фотографировали их в ходе каждого визита. Остальные участки, пораженные актиническим кератозом, отмечали на прозрачной пленке в ходе последнего визита (8 неделя). Кроме того, производили оценку на предмет эритемы и раздражения, с применением стандартной шкалы эритемы (табл. 2 [12]). С участниками, которые не посещали клинику на 2 и/или 4 неделе, связывались по телефону в этих временных точках для определения состояния обработанной кожи, участков биопсии и наличия любых побочных эффектов. Их просили выслать фотографии обработанной кожи по электронной почте (если они давали согласие на отправку сообщений электронной почтой). Основным конечным показателем исследования является процентное уменьшение по сравнению с начальным значением общего количества пораженных актиническим кератозом участков в каждой анатомической области через 8 недель. Для подтверждения индукции ТСЛП при лечении кальципотриолом мы измеряли экспрессию ТСЛП в образцах трепанобиопсии 4 мм до и после лечения актинического кератоза. Лечащие врачи получали и маркировали данные образцы кожи на основе уникального трехзначного идентификатора участников (например, "201"), сохраняя маскированный статус. Мы обрабатывали ткани для гистологического анализа с применением

стандартных способов.

Приготовление и хранение лекарственного средства: 5-фторурацил, 5% крем для местного применения (Efudex; Taro Pharmaceuticals USA Inc. Хоторн, Нью-Йорк) смешивали с 0,005% мазью кальцитриола для местного применения (кальцитрен, кальцитотриен, Dovonex; Taro Pharmaceuticals; тестовая группа) или вазелином (контрольная группа) с массовым соотношением 1:1. Смешивание двух препаратов проводили на оборудовании Отделения дерматологии в соответствии с указаниями Фарм. США 795 для нестерильных условий смешивания, под наблюдением Аптеки исследуемых препаратов онкологического центра Сайзмана. Продукт дополнительно маркировали в соответствии с требованиями закона штата Монтана. Емкости, содержащие 5-ФУ+кальцитотриол и 5-ФУ+вазелин, маркировали уникальным трехзначным кодом (например, "201").

На каждую отдельную емкость с исследуемым лекарственным средством дополнительно может быть нанесена следующая общая информация: идентификационный номер участника исследования; фраза "Только для местного применения", фраза "Хранить при контролируемой комнатной температуре 15-25°C (59-77°F)"; фраза "ОСТОРОЖНО: новое лекарственное средство - только для применения в исследованиях; не предназначено для офтальмологического или интравагинального применения" и фраза "Хранить в недоступном для детей месте". Лекарственные средства будут храниться под замком в шкафу, при контролируемой комнатной температуре (15-25°C), в помещении дерматологической клиники Вашингтонского университета. Содержимое емкостей будет замаскировано от лечащих врачей (с помощью маркировки уникальным трехзначным кодом).

Для целей разработки продукта концентрация кальцитотриола в комбинированном креме может быть повышена для достижения более выраженного противоопухолевого иммунного ответа, но концентрация 5-ФУ в существующей композиции (5%) является оптимальной, на основании наших экспериментальных данных.

Биопсия кожи

До начала лечения (в ходе начального визита) проводили биопсию одного участка актинического кератоза на лице, волосистой части головы или верхней конечности методом пункционной биопсии на 4 мм. После 4-дневного периода лечения (в ходе визита на 5 день) проводили биопсию пролеченного участка актинического кератоза на лице, коже волосистой части головы или верхней конечности методом пункционной биопсии на 4 мм с целью определения индукции экспрессии гена и белка в результате нанесения кальцитотриола. Инструмент для пункционной биопсии на 4 мм применяли для удаления кожи, и два рассасывающихся шва накладывали для закрытия кожной раны. Участников инструктировали о необходимости избегать контакта с участком биопсии "0 дня" в течение 4-дневного периода лечения. Образцы кожи делили пополам. Одну половину использовали для получения РНК, а другую замораживали в среде оптимальной температуры для срезов (ОТС) или фиксировали в среде формальдегида, маркируя только идентификационным номером в исследовании, и выдерживали при -80°C в закрытой на замок морозильной камере или офисе до последующей обработки перманентным окрашиванием Г&Э и проведения иммуногистохимических анализов [13]. Участники получали устные и письменные инструкции по уходу за раной. Состояние участников определяли повторно через 5-10 дней с момента процедуры (визит на 5 день для первой биопсии; визит на 2 неделе для двух других, рекомендованных для этих пациентов), чтобы убедиться в полном заживлении раны и пролечить любые возможные осложнения.

Оценка поражения

Все участки, пораженные актиническим кератозом, оценивали и подсчитывали в ходе клинического осмотра. Клинические диагностические критерии включали толщину, шелушение или покрытые коркой розовые папулы на участках, подвергающихся воздействию солнечного света. Диагноз и количественные показатели документировали путем фотографирования в ходе каждого визита и отмечали на прозрачных пленках в ходе начального (0 день) и последнего (8 неделя) визитов.

Результаты

Демографические данные участников.

Количество подходящих пациентов составило 175, количество пациентов, которые начали и завершили участие в исследовании, составило 132, а их распределение на основе основной анатомической области проиллюстрировано на фиг. 2. Возраст, пол и количество использованного лекарственного средства (граммы) для обработки анатомической области приведены в табл.3. Значимые отличия между тестовой и контрольной группы для любого из перечисленных параметров отсутствовали.

Таблица 3. Демографические данные участников

		5-ФУ+ кальципотриол	5-ФУ+ вазелин
Возраст (среднее значение $\pm$ СО)		69 $\pm$ 7	70 $\pm$ 9
Пол	мужской, кол-во	52	55
	женский, кол-во	13	12
Использованное количество лекарственного средства		7,015	7,7224
(граммы на анатомическую область)			

Процентное снижение количества участков актинического кератоза
в каждой анатомической области

Лечение дважды в сутки в течение четырех дней комбинацией 5-ФУ+кальципотриол приводит к значительно более высокой степени очищения участков актинического кератоза (АК) по сравнению со стандартной схемой лечения (5-ФУ+вазелин) по данным наблюдения в ходе визита контрольного наблюдения через 8 недель ($p < 0,0001$ для всех анатомических областей, t-критерий Стьюдента; ВПК: верхняя правая конечность; ВЛК: верхняя левая конечность) (фиг. 3). Подробные результаты статистических анализов приведены в табл. 4.

Таблица 4. Процентное уменьшение размера пораженных участков для групп лечения кальципотриолом+5-фторурацилом против 5-фторурацила

	Лекарственное средство	Кол-во	Среднее значение	Станд. откл.	Станд. ошибка	Минимум	Максимум
Кожа волосистой части головы	А (кальципотриол+5-ФУ)	34	76,446 4	16,946 7	2,9063	42,857 1	100,0
	В (5-ФУ)	34	5,6929	28,543 2	4,8951	-104,8	62,96 30
	Разница (1-2)		<u>70,753</u> <u>5</u>	23,472 4	5,6929	<u>Значен</u> <u>ие Р</u>	<u><0,00</u> <u>01</u>
Лицо	А (кальципотриол+5-ФУ)	46	86,333 4	16,408 4	2,4193	18,750 0	100,0 0
	В (5-ФУ)	50	26,352 6	20,858 5	2,9498	- 21,052 6	57,14 29
	Разница (1-2)		<u>59,980</u> <u>8</u>	18,859 6	3,8530	<u>Значен</u> <u>ие Р</u>	<u><0,00</u> <u>01</u>
ВПК	А (кальципотриол+5-ФУ)	23	69,158 3	17,917 0	3,7360	16,666 7	100,0
	В (5-ФУ)	25	9,5808	24,916 1	4,9832	- 54,545 5	60,00 00
	Разница (1-2)		<u>59,577</u> <u>5</u>	21,850 3	6,3131	<u>Значен</u> <u>ие Р</u>	<u><0,00</u> <u>01</u>
ВЛК	А (кальципотриол+5-ФУ)	32	79,002 9	13,601 2	2,4044	50,000 0	100,0
	В (5-ФУ)	30	15,889 1	17,497 3	3,1946	- 27,586 2	50,00 00
	Разница (1-2)		<u>63,113</u> <u>8</u>	15,606 3	3,9661	<u>Значен</u> <u>ие Р</u>	<u><0,00</u> <u>01</u>

Побочные эффекты

Эритема представляет собой единственный побочный эффект, который наблюдался в данном исследовании, что соответствует уровню иммунной активации (т.е., воспаление) в коже. У участников, наносивших 5-ФУ+кальципотриол дважды в сутки в течение 4 дней, развивалось заметное воспаление, центрированное вокруг участков актинического кератоза, что можно было наблюдать непосредственно после последнего нанесения лекарственного средства (5 день), причем через 10 дней после лечения эта реакция исчезала (2 неделя)

Фиг. 4. Такое воспаление является ожидаемым на основе нашей гипотезы о том, что кальципотриол индуцирует атаку АК иммунной системой в коже. Процент участников с баллами эритемы 0, 1 и 2 для каждой обработанной анатомической области приведен на фиг. 5. Необходимо отметить, что из-за короткой продолжительности курса лечения у участников не возникало эритемы с баллами 3 или 4, которая обычно наблюдается у пациентов, получавших 5-ФУ дважды в сутки в течение 2-3 недель (стандартная схема лечения).

Образец кожи, полученный из участка актинического кератоза

(АК) использовали для определения механизма действия 5-ФУ+кальципотриола при АК.

Окрашенные гематоксилином и эозином (Г&Э) срезы АК до и после лечения представлены на фиг. 6. Изображения демонстрируют аккумуляцию лимфоцитов в верхней дерме, в основном на участке АК,

после лечения (Тх), у участника, получавшего 5-ФУ+кальципотриол (стрелка). Дополнительно иммунофлуоресцентное окрашивание срезов АК до и после лечения демонстрирует устойчивую экспрессию ТСЛП на участке АК после лечения у участника, получавшего 5-ФУ+кальципотриол, включая накопление CD3+ Т-клеток около границы дермы и эпидермиса. Большинство из этих Т-клеток представляли собой CD4+ Т-хелперных клеток (вставка). K14 обозначает кератиноциты кожи.

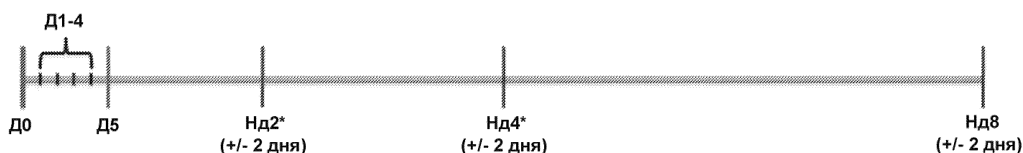
Примерные ссылки.

1. Kim, R.H. and A.W. Armstrong, *Nonmelanoma skin cancer*. Dermatol Clin, 2012. **30**(1): p. 125-39, ix.
2. Fenske, N.A., J. Spencer, and F. Adam, *Actinic keratoses: past, present and future*. J Drugs Dermatol, 2010. **9**(5 Suppl ODAC Conf Pt 1): p. s45-9.
3. Warino, L., et al., *Frequency and cost of actinic keratosis treatment*. Dermatol Surg, 2006. **32**(8): p. 1045-9.
4. Devaux, S., et al., *Topical vitamin D analogues alone or in association with topical steroids for psoriasis: a systematic review*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. **26** Suppl 3: p. 52-60.
5. Li, M., et al., *Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11736-41.
6. Ziegler, S.F. and D. Artis, *Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 289-293.
7. Demehri, S., et al., *Elevated epidermal thymic stromal lymphopoietin levels establish an antitumor environment in the skin*. Cancer Cell, 2012. **22**(4): p. 494-505.
8. Di Piazza, M., et al., *Loss of Cutaneous TSLP-Dependent Immune Responses Skews the Balance of Inflammation from Tumor Protective to Tumor Promoting*. Cancer Cell, 2012. **22**(4): p. 479-93.
9. Tanghetti, E.A., *The role of topical vitamin D modulators in psoriasis therapy*. J Drugs Dermatol, 2009. **8**(8 Suppl): p. s4-8.
10. Lebwohl, M., et al., *Ingenol mebutate gel for actinic keratosis*. N Engl J Med, 2012. **366**(11): p. 1010-9.
11. Davis, S.A., et al., *Top dermatologic conditions in patients of color: an analysis of nationally representative data*. J Drugs Dermatol, 2012. **11**(4): p. 466-73.
12. Fullerton, A., et al., *Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis*. Contact Dermatitis, 1996. **35**(1): p. 1-10.
13. Soumelis, V., et al., *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 673-80.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения предракового поражения кожи, включающий местное применение на пораженном участке композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция содержит от около 2 до около 5% 5-ФУ.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция содержит от около 0,002 до около 0,005% кальципотриола.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что предраковое поражение кожи представляет собой актинический кератоз.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что композицию применяют дважды в сутки в течение 4-6 дней.
6. Способ предотвращения перехода предракового поражения кожи в рак кожи, включающий:
 - а) идентификацию субъекта с одним или более предраковым поражением кожи; и
 - б) местное применение на участке (участках) предракового (предраковых) поражения (поражений) кожи композиции, содержащей цитотоксический агент и индуктор ТСЛП, где цитотоксический агент представляет собой 5-фторурацил (5-ФУ) и где индуктор тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП) представляет собой кальципотриол.
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что предраковое поражение кожи представляет собой актинический кератоз, а рак кожи представляет собой плоскоклеточную карциному.
8. Способ по п.6, отличающийся тем, что композиция содержит от около 2 до около 5% 5-ФУ.
9. Способ по п.6, отличающийся тем, что композиция содержит от около 0,002 до около 0,005% кальципотриола.
10. Способ по п.6, отличающийся тем, что композицию применяют дважды в сутки в течение 4-6 дней.



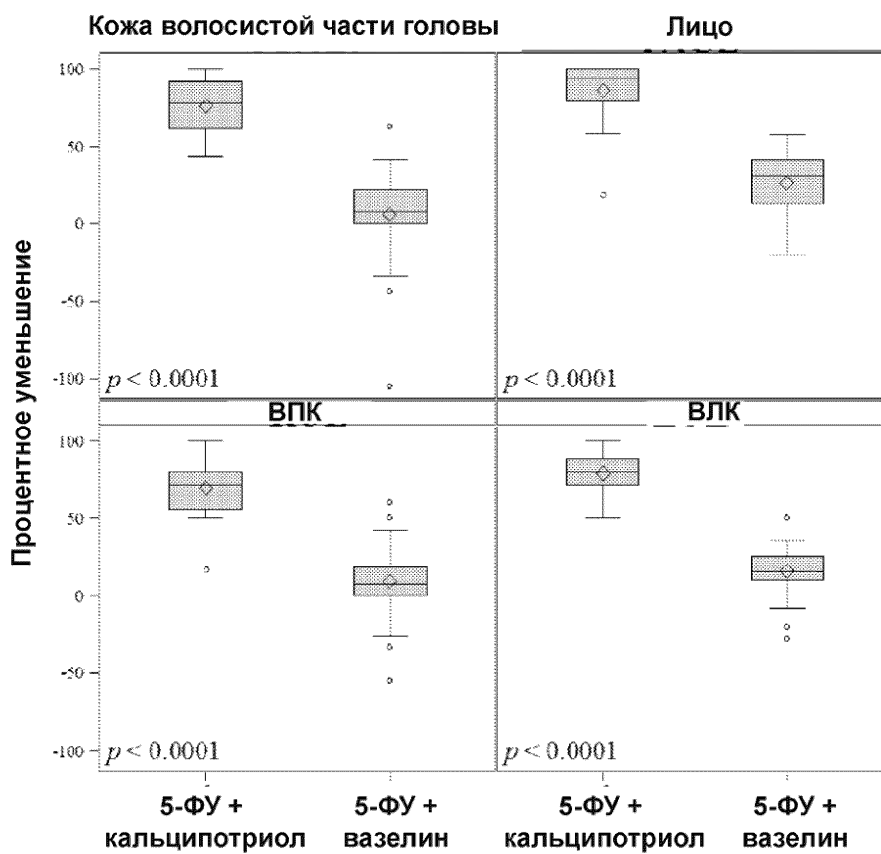
- D0 (начальный визит): согласие, начальный подсчет участков актинического кератоза, прозрачные пленки, фотографирование, назначение лечения и биопсия одного участка кожи (необязательно)
- D1-4 (период лечения): местное нанесение назначенного лекарственного средства дважды в сутки в течение 4 дней
- D5 (1-й визит контрольного наблюдения): подсчет участков актинического кератоза, фотографирование, оценка побочных эффектов и биопсия двух участков кожи (необязательно)
- Нд2,4,8 (визиты контрольного наблюдения): подсчет участков актинического кератоза, фотографирование, прозрачные пленки (только Нд8) и оценка побочных эффектов

Фиг. 1В

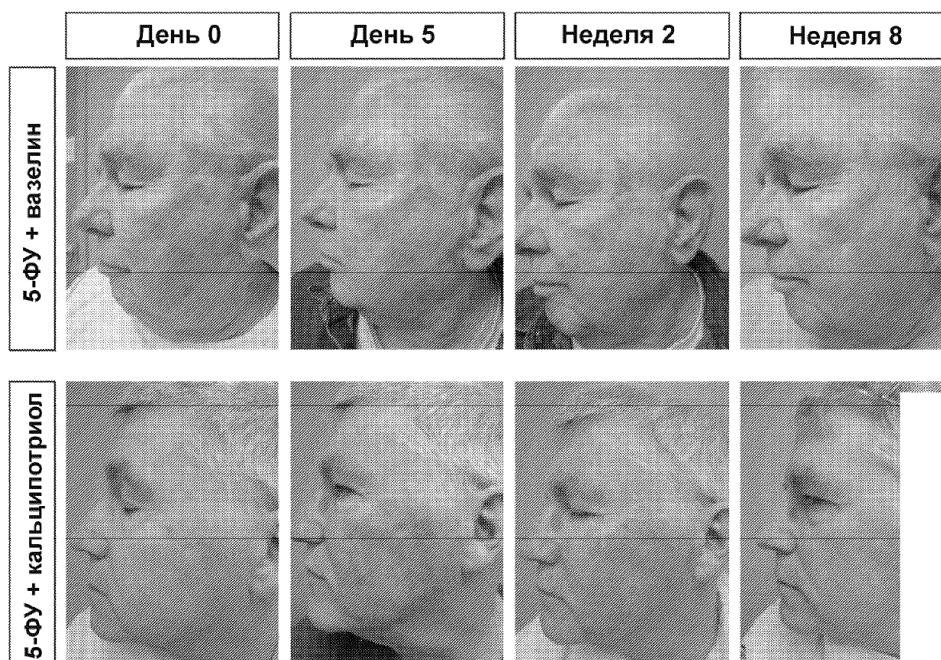
Скрининг пациентов проводили
в дерматологических клиниках
Вашингтонского университета
и Сент-Луиса, Вирджиния



Фиг. 2

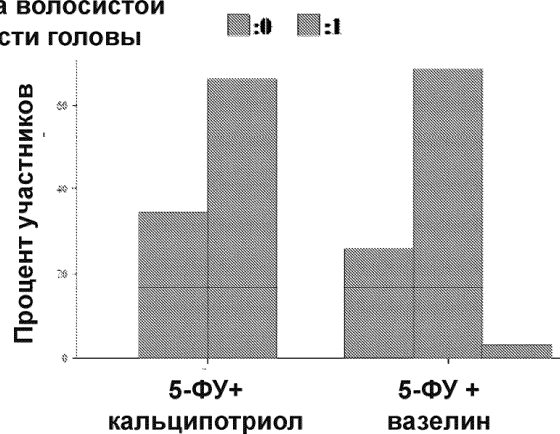


Фиг. 3



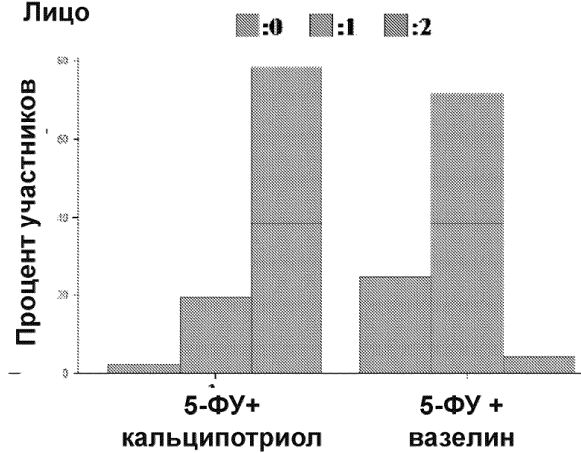
Фиг. 4

Кожа волосистой
части головы

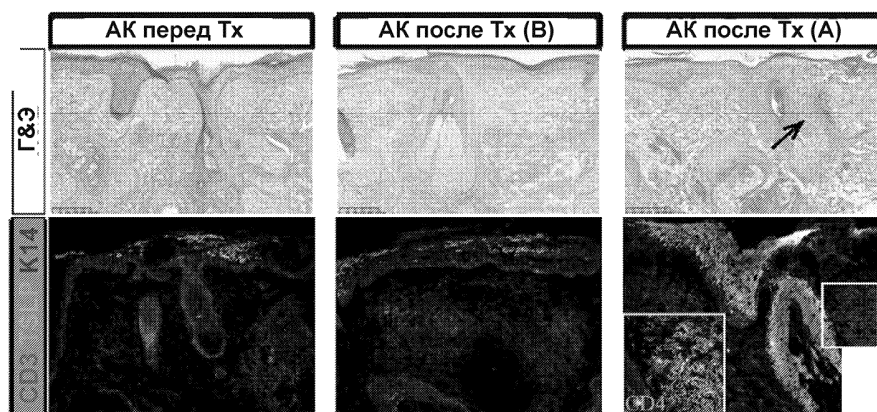
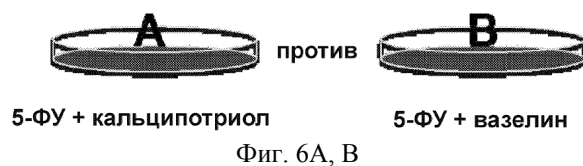
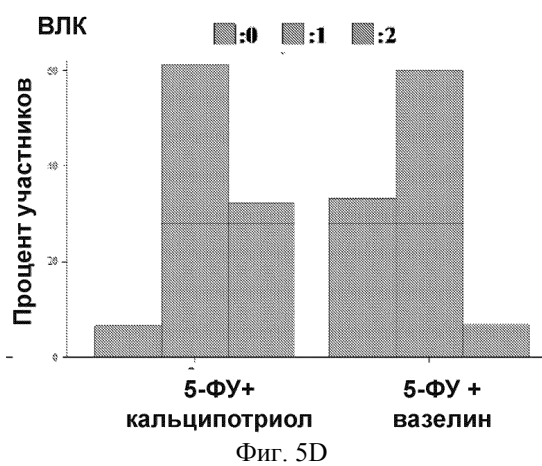
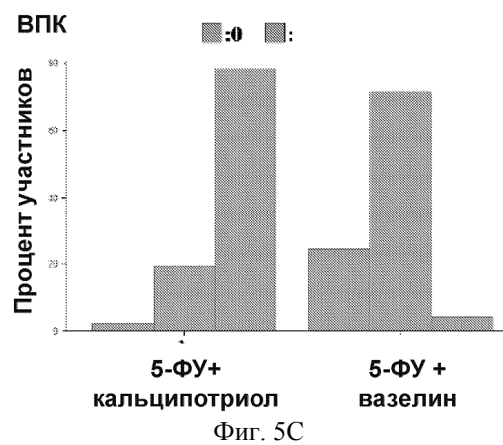


Фиг. 5A

Лицо



Фиг. 5B



Фиг. 6С

