(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201800477 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.28

(22) Дата подачи заявки
2018.08.28

(51) Int. Cl. ***A61K 9/10*** (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(54) ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(96) **2018000102 (RU) 2018.08.28**

(71) Заявитель:
ООО "НПК АЛЬФА-ОНКОТЕХНОЛОГИИ" (RU)

(72) Изобретатель:
Никольская Елена Дмитриевна, Терещенко Оксана Геннадьевна, Жунина Ольга Александровна, Круглый Борис Игоревич, Яббаров Никита Григорьевич, Северин Евгений Сергеевич (RU)

(74) Представитель:
Пустовалова М.Л., Котлов Д.В., Яремчук А.А. (RU)

(57) Изобретение описывает новый противоопухолевый препарат, представляющий собой стабильные наночастицы из биодеградирующего полимера, включающие два цитостатических агента с различными механизмами действия и векторную молекулу для адресной доставки частиц в опухолевые ткани. Предпочтительно в лекарственную композицию также входят поверхностно-активное вещество и криопротектор. В качестве цитостатиков используются винкристин и метотрексат, в качестве векторной молекулы для адресной доставки частиц в опухолевые ткани - С-концевой домен альфа-фетопротеина. Изобретение обеспечивает существенное повышение эффективности и безопасности указанных цитостатиков. Лекарственное средство представляет собой образец готовой формы препарата, который по параметрам растворения, однородности, пирогенности, уровню эндобактериальных токсинов, стабильности, стерильности соответствует стандартам использования стерильных лекарственных форм для медицинского применения у человека. Показаниями к применению препарата могут являться острый и хронический миелоидный лейкоз, лимфобластный лейкоз и другие онкологические заболевания мягких тканей.

201800477 A1

201800477 A1

Препарат для лечения онкологических заболеваний

Область техники

Данное изобретение относится к области медицины и биотехнологии, а именно к методам лечения опухолевых заболеваний при помощи синергидной комбинации двух цитостатических агентов, заключенных в биодеградируемые полимерные наночастицы.

Уровень техники

В настоящее время во всем мире остро стоят задачи по разработке новых адресных, высокоэффективных и низкотоксичных методов терапии онкологических заболеваний. Серьезным недостатком используемых в настоящее время низкомолекулярных противоопухолевых препаратов является их высокая общая токсичность. Химиотерапия онкологических заболеваний существующими сильнодействующими препаратами сопровождается выраженной интоксикацией организма больного и побочными эффектами, что существенно ограничивает возможности применения и использования в полной мере цитостатического и цитотоксического потенциала современных противоопухолевых средств. Возникновение токсических и побочных эффектов при проведении химиотерапии онкологических больных связано с низкой избирательностью существующих лекарств, необходимостью длительно поддерживать достаточно высокую терапевтическую дозу, что приводит к сильному отрицательному воздействию на здоровые органы и ткани.

Кроме того, серьезной проблемой, снижающей эффективность химиотерапии злокачественных новообразований, является также множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток. Одной из основных причин МЛУ является гиперэкспрессия трансмембранных белков, относящихся к семейству ABC-транспортеров (MDR1, MRP1, BCRP и др.), выбрасывающих химиопрепараты, в том числе молекулы противоопухолевых препаратов, из клетки [6,9].

Один из способов решения данных проблем связан с созданием систем адресной доставки лекарственных веществ путем их включения в полимерные частицы или липосомы, имеющие размеры не более 200 нм. Высокая терапевтическая активность наносомальных препаратов при лечении онкологических заболеваний определяется способностью наночастиц обеспечивать пассивный направленный транспорт связанных с ними лекарственных веществ в солидную опухоль или в опухолевые клетки, циркулирующие в кровотоке при лейкозах.

Возможно также создание механизма активного направленного транспорта «нанопрепаратов» с помощью присоединения к ним «молекулярного адреса» или вектора, обеспечивающего связывание данных частиц со специфическими

рецепторами на поверхности опухолевых клеток-мишеней. В качестве векторных молекул могут быть использованы антитела, РНК-, или пептидные аптамеры к поверхностным белкам, а также лиганды рецепторов, специфических для опухолевых клеток, или их фрагменты [2-4].

Наиболее интересные данные получены при использовании олигонуклеотидного вектора A10 PSMA для «адресной» доставки полимерных частиц с паклитакселом в клетки рака предстательной железы мышей LNCaP [4].

При использовании таких векторов препарат будет проникать внутрь клетки, после связывания с соответствующим рецептором, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза в составе окаймленного клатрином мембранного пузырька. Внутри такого пузырька препарат не обладает сродством к MDR-насосам. Таким образом, данный подход является одним из способов преодоления множественной лекарственной устойчивости.

Существующие на сегодняшний день терапевтические подходы для лечения миелоидных лейкозов, а также других злокачественных новообразований мягких тканей недостаточно эффективны. Несмотря на то, что в литературе описаны многие низкомолекулярные агенты, способные эффективно останавливать рост раковых клеток, их применение в клинике приводит к успеху в очень ограниченном числе случаев, в том числе из-за отсутствия специфичных способов доставки в клетки опухоли и быстрого возникновения резистентных раковых клеток. Данное изобретение обладает рядом свойств, необходимых для решения проблемы доставки низкомолекулярных агентов внутрь клеток, описывает их эффективную комбинацию, и поэтому расширяет круг имеющихся кандидатов для лечения широкого круга онкологических заболеваний, таких как острый и хронический миелоидный лейкоз, лимфобластный лейкоз и другие.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения являлось создание эффективного и безопасного препарата для лечения широкого круга онкологических заболеваний. Указанная задача решается путем создания новой комбинации известных антипролиферативных агентов с различными механизмами действия в сочетании с инновационным способом их доставки в опухолевые клетки. В изобретении используется белково-векторная доставка двух цитостатических агентов, инкапсулированных в биодеградируемые наночастицы, что обеспечивает значительный потенцирующий противоопухолевый эффект и повышенную безопасность для пациентов за счет использования сниженных доз препаратов. В качестве векторной молекулы для доставки наночастиц, содержащих цитостатические

агенты, был использован С-концевой домен (р3дАФП) онкофетального белка альфа-фетопротеина (АФП), а в качестве биодеградируемых наночастиц - сополимер молочной и гликолевой кислот (поли(молочная-согликолевая) кислота, или PLGA).

Указанная задача решается путем создания нового лекарственного препарата для лечения злокачественных новообразований, представляющего собой композицию из двух макромолекулярных компонентов, включающую (а) наночастицы со средним диаметром от 100 до 200 нм, состоящие по меньшей мере из биодеградируемого полимера, векторной молекулы и винкристина с массовой долей 0,4÷1,0 мас.%; (б) наночастицы со средним диаметром от 100 до 200 нм, состоящие по меньшей мере из биодеградируемого полимера, векторной молекулы и метотрексата с массовой долей 0,4÷1,0 мас.%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения данный лекарственный препарат характеризуется тем, что в качестве векторной молекулы используют полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения массовая доля полипептида в наночастицах составляет 0,1÷0,3 мас.%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения данный лекарственный препарат характеризуется тем, что в качестве биодеградируемого полимера в наночастицах используют сополимер молочной и гликолевой кислот, при этом соотношение мономеров молочной и гликолевой кислот в сополимере составляет 1:1. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения средняя молекулярная масса молекулы сополимера составляет от 10 до 20 кДа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения данный лекарственный препарат характеризуется тем, что массовая доля сополимера в наночастицах составляет 10,0÷50,0 мас.%, и наночастицы дополнительно содержат D-маннит, при этом массовая доля D-маннита составляет 60,0÷90,0 мас.%. В некоторых вариантах осуществления наночастицы дополнительно содержат поливиниловый спирт, при этом массовая доля поливинилового спирта составляет 3,5÷4,0 мас.%.

Указанная задача также решается путем создания нового способ лечения злокачественных новообразований у субъекта, включающий парентеральное введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеуказанного лекарственного препарата. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения данный способ характеризуется тем, что эффективное количество лекарственного препарата при введении субъекту составляет от 17,1/6,0 мкг/кг до 51,4/42,0 мкг/кг массы субъекта, где цифры А/Б обозначают количество инкапсулированного в полимерную оболочку винкристина/ количество инкапсулированного в полимерную оболочку метотрексата. В

некоторых вариантах осуществления изобретения данный способ характеризуется тем, что злокачественным новообразованием является острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, неходжкинские лимфомы, лимфогранулематоз (лимфома Ходжкина) или миелоидная саркома.

При осуществлении изобретения достигается следующий технический результат: создан новый эффективный лекарственный препарат для лечения широкого круга онкологических заболеваний, состоящий из двух макромолекулярных компонентов, и обеспечивающий более эффективный и безопасный для пациента цитотоксический эффект по отношению к клеткам опухоли по сравнению с входящими в его состав цитотоксическими агентами.

Краткое описание рисунков

Рис. 1. Исследование противоопухолевой активности по критерию удлинение продолжительности жизни (УПЖ) конъюгатов нанометотрексата с р3дАФП и нановинкристина, а также их композиции.

Рис. 2. Исследование противоопухолевой активности по критерию торможение роста опухоли (ТРО) конъюгатов нанометотрексата с р3дАФП и нановинкристина, а также их композиции.

Рис. 3. Исследование противоопухолевой активности по критерию удлинение продолжительности жизни (УПЖ) различных соотношений композиции конъюгатов нанометотрексата с р3дАФП и нановинкристина.

Рис. 4. Исследование противоопухолевой активности по критерию торможение роста опухоли (ТРО) различных соотношений композиции конъюгатов нанометотрексата с р3дАФП и нановинкристина.

Рис. 5. Выживаемость мышей самок DBA_2 с солидной моделью лимфолейкоза Р388 в остром эксперименте при воздействии композиции препаратов Метотрексат-Тева и Винкристин, нано-метотрексата и нано-винкристина, конъюгированных с р3дАФП.

Рис. 6. Структура рекомбинантного С-концевого домена белка альфа-фетопротеина (р3дАФП).

Рис. 7. Сравнительная цитотоксическая активность препаратов Метотрексат-Тева, Винкристин-Эбеве, нано-метотрексат и нано-винкристин конъюгированных с р3дАФП в отношении клеток меланомы В-16.

Подробное раскрытие изобретения

В описании данного изобретения термины «включает», «включающий» и «включает в себя» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из». Под «субъектом» следует понимать человека или другое млекопитающее. Если не определено отдельно, технические и научные термины в данной заявке имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе.

Термин «биодеградируемые наночастицы», которые могут быть использованы для доставки цитотоксических агентов в опухолевые клетки, обозначает любые фармацевтически приемлемые синтетические частицы с линейным размером от 50 до 500 нанометров, состоящие, предпочтительно, из алифатических полиэфиров. Примерами таких частиц могут служить полимеры полилактида, полигликолида, сополимеры полилактида-полигликолида и их блок-сополимеры с полиэтиленгликолем. Сополимерами называют разновидность полимеров, цепочки молекул которых состоят из двух или более различных структурных звеньев. Блок-сополимер — это линейный сополимер, макромолекула которого состоит из регулярно или статистически чередующихся гомополимерных блоков, различающихся по составу или строению. Биодеградируемые полимеры могут иметь средний молекулярный вес от 1 000 до 200 000 Дальтон.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель» относится к таким носителям, растворителям и/или наполнителям, которые, являясь неактивными ингредиентами, в рамках проведенного медицинского заключения, пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.д. и отвечают разумному соотношению пользы и риска. «Неактивные ингредиенты» входят в состав лекарственного средства или вакцинного препарата для улучшения его растворимости и/или стабильности, а также для улучшения фармакокинетики и более эффективной доставки к специфическим органам или тканям. Неактивные ингредиенты включают в себя множество веществ, известных специалистам в области фармацевтики, таких как вещества для контроля pH или осмотического давления, антибактериальные агенты, антиоксиданты, поверхностно активные вещества (например, полисорбат 20 или 80), криостабилизаторы, консерванты, растворители, загустители, наполнители, носители (микро- или нано-частицы) и другие вещества. Примерами фармацевтически приемлемых растворителей в рамках настоящего изобретения могут быть стерильная

вода для инъекций, 5 % раствор декстрозы (глюкозы) в воде (D5W), физиологический раствор, в частности, изотонический физиологический раствор, и другие.

Под терапевтически эффективным количеством, или терапевтической дозой, подразумевается количество лекарственной субстанции (или лекарственного препарата), вводимой или доставляемой пациенту, при котором у пациента с наибольшей вероятностью проявится ожидаемый терапевтический эффект. Точное требуемое количество может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста, массы тела и общего состояния пациента, тяжести заболевания, методики введения препарата, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п.

Под парентеральным введением в настоящем документе подразумевается внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, внутрикостное, внутрисуставное, подкожное или интратекальное введение. Введение может осуществляться путем инъекций малого объёма (до 100 мл) или инфузией, в частности, путем внутривенной капельной инфузии (внутривенного капельного вливания).

Предпочтительный способ введения субъекту наночастиц по настоящему изобретению – парентеральный. Введение наночастиц субъекту, нуждающемуся в лечении, осуществляется в дозе, достаточной для достижения терапевтического эффекта. При проведении лечения введение может осуществляться как разово, так и несколько раз в неделю (или другой временной интервал). Кроме того, лекарственное средство может вводиться в организм пациента ежедневно в течение определенного периода дней (например, 2-10 дней), после которого следует период без приема лекарственного средства (например, 1-30 дней). Схема лечения, а также длительность лечения также могут варьировать от пациента к пациенту и составлять от минимального курса лечения до проведения лечения курсами на протяжении всей жизни пациента.

При осуществлении настоящего изобретения в качестве метотрексата использовали метотрексат компании Тева (Метотрексат-Тева), а в качестве винкристина винкристин компании Эбеве (Винкристин-Эбеве).

В зависимости от формы и тяжести заболевания возможны нижеследующие режимы введения. Например, при рабдомиосаркоме в качестве неоадъювантной терапии возможно введение внутривенно капельно медленно в 400 мл изотонического раствора в дозе 6,4/6.0 мг/м^2 тела 1 раз в 7 дней, 5-10 введений на курс лечения (цифры А/Б обозначают количество инкапсулированного в полимерную оболочку винкристина/ количество инкапсулированного в полимерную оболочку метотрексата). При остром лимфобластном лейкозе для индукции ремиссии возможно введение

внутривенно капельно в 400 мл изотонического раствора в дозе 2.15/0,76 мг/м^2 1 раз в 48 часов (через день), 5-10 введений.

В настоящем изобретении был разработан способ получения полимерных частиц (ПЧ), содержащих противоопухолевые препараты метотрексат и винкристин, а также высокомолекулярной конструкции препарата адресной доставки на их основе. В качестве векторной молекулы для доставки цитостатиков использовали рекомбинантный С-концевой домен белка альфа-фетопротеина (р3дАФП), структура и последовательность которого приведена на рис.6. Рецепторы альфа-фетопротеина во взрослом организме не обнаруживаются в норме, но возникают на поверхности клеток при развитии некоторых видов опухолей, таких как рак печени, легкого, молочной железы и другие [10]. Альфа-фетопротеин представляет собой крупный гликопротеин (70 кДа), состоящий из одной полипептидной цепи, и является одним из основных циркулирующих белков, обнаруживаемых у млекопитающих в процессе развития эмбриона и плода. Он считается также онкофетальным маркером, поскольку секретируется различными опухолями. АФП состоит из полипептидной цепи размером 590 аминокислотных остатков, разделенной на три домена примерно по 195 аминокислот каждый. Селективность связывания и эндоцитоза С-концевого домена АФП опухолевыми клетками была продемонстрирована как in vitro, так и in vivo. Патентные исследования показали, что на основе АФП разработаны, в том числе и авторами, ряд препаратов и способов их получения из природных источников, а также способы лечения этими препаратами [1,2,4,10].

Для использования АФП в терапевтических целях необходимы значительные количества белка, которые трудно обеспечить выделением из природных источников. Получение рекомбинантного белка сильно осложнено его сложной структурой. Кроме того, недостатком использования полноразмерного АФП является увеличение размера комбинированной молекулы, что может создавать затруднения при рецептор-опосредованном эндоцитозе.

Избежать этих затруднений удается при использовании генно-инженерных конструкций, обеспечивающих получение не цельного АФП, а его активных фрагментов, что, во-первых, значительно упрощает и удешевляет процедуру получения препарата, а во-вторых, облегчает эндоцитоз препарата в опухолевые клетки. В данной изобретении использовали С-концевой домен альфа-фетопротеина (р3дАФП), описанный ранее [1,2], для получения конъюгатов с наночастицами, с инкорпорированными в них цитостатическими агентами – метотрексатом и винкристином. Исходя из электрофореграммы, молекулярная масса фрагмента белка составляет приблизительно 23 кДа. По данным масс-спектрометрического анализа она оказалась равной 22480 Да. Также на масс-спектре виден пик, соответствующий 22620

Да. Он может соответствовать целевому белку с добавлением N-концевого метионина. Селективность связывания и эндоцитоза С-концевого домена АФП опухолевыми клетками была продемонстрирована как in vitro, так и in vivo [1,2]. Данное свойство указывает на перспективность использования полученного рекомбинантного белка в качестве векторной молекулы для адресной доставки противоопухолевых веществ как в виде конъюгатов, так и в составе полимерных наночастиц.

В предпочтительных вариантах изобретения используют наносомальную форму композиции из двух цитотоксических препаратов разного механизма действия (винкристина, блокирующего фазу митоза путем воздействия на тубулин микротрубочек, и метотрексата – антиметаболита, антагониста фолиевой кислоты), на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-COOH 50/50 с вязкостью 0,4 дл/г), содержащая пептидный вектор р3дАФП, для адресной доставки лекарства в опухолевые клетки.

Механическая прочность полимера PLGA зависит от физических свойств, таких как показатели молекулярной массы и полидисперсности. Эти свойства также влияют на способность выступать в качестве устройства доставки лекарственного средства и могут контролировать скорость деградации частиц. Исследования показали, что тип инкапсулированных в полимере PLGA молекул также влияет на скорость высвобождения. Механическая прочность полимера PLGA, его скорость набухания, склонность к гидролизу и скорость биодеградации полимера непосредственно зависят от степени кристалличности PLGA, которая далее зависит от типа и молярного соотношения отдельных мономерных компонентов в цепи сополимера. Как правило, более высокое содержание PGA в составе PLGA приводит к более быстрым темпам деградации, за исключением соотношения 1:1 для PLA:PGA, которое демонстрирует наиболее быструю деградацию (Makadia HK и Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers (Basel). 2011 Sep 1;3(3):1377-1397). Биораспределение и фармакокинетика полимеров PLGA показывают нелинейные и дозозависимые профили. Более того, период жизни в кровотоке и поглощение мононуклеарной фагоцитарной системой будет зависеть от дозы и состава PLGA частиц (Makadia HK и Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers (Basel). 2011 Sep 1;3(3):1377-1397). Соответственно, способ приготовления и состав частиц PLGA (в том числе карго) будет влиять на их тропность к определенным органам и тканям в организме человека.

В предпочтительных вариантах изобретения разрабатываемый лекарственный препарат представляет собой композицию из двух макромолекулярных компонентов, каждый из которых представляет собой стабильные наночастицы и включает

цитостатик, биодеградирующий полимер, векторную молекулу для адресной доставки частиц в пораженные органы и ткани, а также, предпочтительно, поверхностно-активное вещество и криопротектор. Сочетанное действие этих компонентов сильно отличается от композиции чистых цитотоксических препаратов разного механизма действия (винкристина, блокирующего фазу митоза путем воздействия на тубулин микротрубочек, и метотрексата – антиметаболита, антагониста фолиевой кислоты). По параметрам протестированной противоопухолевой эффективности (ТРО и УПЖ) сочетанное действие двух макромолекулярных компонентов описывается как потенцирующее. Исходя из анализа спектра противоопухолевого действия активных компонентов препарата, он может быть показан при следующих нозологиях: острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, неходжкинские лимфомы, лимфогранулематоз (лимфома Ходжкина) или миелоидная саркома.

Использование одновременно двух цитостатических агентов с разным механизмом антинеопластического действия, а именно: ингибирование синтеза ДНК и РНК, путем блокировки активности дигидрофолатредуктазы (метотрексат) и нарушение митотической активности за счет полимеризации тубулина (винкристин) приводит к потенцированию противоопухолевого действия, что позволяет использовать более низкие эффективные терапевтические дозы. Такое решение в данной ситуации имеет ключевое значение, поскольку эффективная доставка больших дозировок этих препаратов невозможна из-за ограниченного включения их в наночастицы.

Нижеследующие примеры приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Примеры получения полимерных частиц (ПЧ) и инкапсуляции цитотоксических препаратов.

ПЧ получали методом нанопреципитации [4] в качестве полимерной матрицы использовали сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA-COOH 50/50 с вязкостью 0,4 дл/г). Удаление избытка поверхностно-активного вещества (0,5% поливиниловый спирт) и не включенного метотрексата и винкристина проводились помощью эксклюзионной гель-хроматографии на носителе Superose 6. Средний диаметр полученных частиц составлял 120-170 нм, эффективность включения метотрексата составила 56%, а винкристина -65% - соответственно. Полученные полимерные частицы далее конъюгировали с р3дАФП.

Для производства ПЧ использовали разработанную авторами технологию инкапсуляции винкристина в полимерные частицы: навеску 10 мг винкристина растворяли в 5 мл ацетона, перемешивая на магнитной мешалке (Variomag Multipoint, США). Затем в раствор добавляли 50 мг полимера PLGA50/50-COOH и перемешивали до полного растворения. С помощью инсулинового шприца при интенсивном перемешивании к 25 мл 0,5% поливинилового спирта добавляли винкристин и полимер в ацетоне. Перемешивали 30 мин. Далее удаляли органический растворитель на роторном испарителе Laborota 4000 Efficient (Германия) при вакууме 0,9–1 кгс/м^2 и температуре водяной бани 35°С. С целью удаления поливинилового спирта полученную смесь вращали на центрифуге J2–J21 (Beckman, США) в течение 20 мин при 14 000 об/мин. Полученный осадок отделяли от супернатанта и ресуспендировали на виброподвесе Vibrofix VF1 Electronic (IKA, ФРГ), предварительно добавив 5 мл дистиллированной воды. После этого смесь подвергали низкочастотной соникации на ультразвуковой бане Transsonic 420 (Elma, Германия) в течение 2 мин. Затем смесь пропускали через стеклянный фильтр (класс ПОР 40–110 мкм) в круглодонную колбу на 250 мл. Колбу с фильтратом дополнительно вакуумировали с помощью водоструйного насоса. К полученному раствору добавляли 100 мг криопротектора — Д-маннита — и замораживали в бане с жидким азотом. Колбу сушили на лиофильной сушке ALFA 1-5 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) в течение 20 ч, после чего хранили при 4°С.

Инкапсуляцию метотрексата производили следующим образом: навеску 20 мг метотрексата растворяли в 5 мл ацетона, перемешивая на магнитной мешалке (Variomag Multipoint, США). Затем в раствор добавляли 50 мг полимера PLGA50/50-COOH и перемешивали до полного растворения. С помощью инсулинового шприца при интенсивном перемешивании к 25 мл 0,5% поливинилового спирта добавляли метотрексат и полимер в ацетоне. Перемешивали 30 мин. Далее удаляли органический растворитель на роторном испарителе Laborota 4000 Efficient (Германия) при вакууме 0,9–1 кгс/м^2 и температуре водяной бани 35°С. С целью удаления поливинилового спирта полученную смесь вращали на центрифуге J2–J21 (Beckman, США) в течение 20 мин при 14 000 об/мин. Полученный осадок отделяли от супернатанта и ресуспендировали на виброподвесе Vibrofix VF1 Electronic (IKA, ФРГ), предварительно добавив 10 мл дистиллированной воды. После этого смесь подвергали низкочастотной соникации на ультразвуковой бане Transsonic 420 (Elma, Германия) в течение 2 мин. Затем смесь пропускали через стеклянный фильтр (класс ПОР 40–110 мкм) в круглодонную колбу на 250 мл. Колбу с фильтратом дополнительно вакуумировали с помощью водоструйного насоса. К полученному раствору добавляли 100 мг криопротектора — Д-маннита — и замораживали в бане с жидким азотом. Колбу

сушили на лиофильной сушке ALFA 1-5 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) в течение 20 ч, после чего хранили при 4°С.

Пример получения препарата белково-векторной доставки.

Получение р3дАФП проводили путем конструирования плазмидного вектора и экспрессия рекомбинантного пептидного препарата (фрагмента АФП) в клетках *E. coli* [2]. Очистку и выделение р3дАФП осуществляли на аффинной колонке (мышиные антитела 4а3, смола BrCN-Sepharose), достигая чистоты конечного продукта 95% (по данным электрофореза и иммуноблоттинга).

Для осуществления конъюгации ПЧ с белковым вектором для доставки может быть использована следующая технология: 15 мг полимерных частиц, содержащих винкристин, и 15 мг полимерных частиц, содержащих метотрексат, суспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (Phosphate-Buffered Saline, PBS), после чего к раствору добавляли 240 мкл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) и N-гидроксисукцинимида (N-hydroxysuccinimide, NHS) из стокового раствора в PBS с концентрацией 5 мг/мл и перемешивали 20 мин; затем добавляли 3 мкл β-меркаптоэтанола (β-mercaptoethanol, BME) и перемешивали еще 10 мин, после чего к реакционной массе добавляли 10 мг рекомбинантного 3д АФП; полученную смесь перемешивали еще 30 мин. Для остановки реакции к полученному конъюгату добавляли 3 мкл этаноламина. Проводили гель-фильтрацию реакционной массы на сорбенте Superose 12 (GE Healthcare, США). Фракцию с целевым продуктом лиофилизировали на лиофильной сушке ALFA 1-5 в течение 20 ч, после чего хранили при -20°С.

Цитотоксическую активность полученного препарата (р3дАФП -МТХ + р3дАФП - ВНК) подтверждали на опухолевых клетках меланомы В-16 после 72 ч. инкубации с композицией субстанций МТХ+ Винкристин и смеси их конъюгатов с рАФП (см. рис.7).

Примеры доклинического изучения лекарственного препарата.

Изучение сравнительной противоопухолевой активности композиции препаратов Метотрексат-Тева + Винкристин–Эбеве (МТХ + ВНК) и коньюгатов нано-Метотрексата с р3дАФП и наноВинкристина с р3дАФП (нМТ3Д+ нВН3Д) проводили на солидной модели лимфолейкоза Р388 у мышей самок DBA/2.

Исследование проводили на экспериментальной модели перевиваемого лимфолейкоза мышей Р388. Лимфолейкоз Р388 прививали мышам линии DBA/2 подкожно (экспериментальная солидная модель) суспензией клеток, полученных из асцита, в прививочной дозе 10^6 клеток на особь, объем инъекции составлял или 0,1 мл на особь (экспериментальная солидная модель). При исследования противоопухолевой активности препаратов использовали внутривенный способ

введения препарата.

В качестве штамма опухолевых клеток использовали штамм лимфолейкоза мыши Р388. Источник культуры клеток – Российский онкологический научный центр им. Блохина РАМН, Москва. Клетки хранили при температуре жидкого азота. Штамм поддерживали на мышах линии DBA/2. После разморозки клеток Р388, суспензию клеток предварительно перевивали внутрибрюшинно 2-3 мышам линии DBA/2.

Подготовка культуры клеток для перевивки опухоли.

Использовали штамм лимфолейкоза мыши Р388 для экспериментальной модели перевиваемого лейкоза мышей. Клетки хранили при температуре жидкого азота. После размораживания клетки Р388 предварительно перевивали внутрибрюшинно 2-3 мышам линии DBA/2. Для проведения экспериментов опухолевый материал в виде суспензии опухолевых клеток берут из асцитной жидкости. Подсчет жизнеспособных опухолевых клеток проводят в камере Горяева с помощью микроскопа. Асцитную жидкость разводят в стерильном физиологическом растворе до концентрации $1x10^7$ клеток/мл и перевивают мышам линии DBA/2 внутрибрюшинно или подкожно.

Перевивка опухоли.

Для развития солидной опухоли клетки лимфолейкоза Р388 прививали мышам линии DBA/2 подкожно путем введения суспензии клеток под кожу в правую подлопаточную область в дозе 10^6 клеток на особь, объем инъекции 0,2 мл на особь. День перевивки опухолевых клеток считался днем окончания пассажа и являлся днем исследования «0».

Распределение по группам.

После перевивки опухолевых клеток животных рандомизировали, формировали экспериментальные группы по 10 животных (самцов) и наносили индивидуальные метки насыщенным раствором пикриновой кислоты. Животных распределяли по группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 10% от средней массы животных одного пола.

Процедура введения препаратов.

Внутривенное введение проводили путем инъецирования препарата одноразовым шприцем объемом 1 мл фиксированной мыши в латеральную хвостовую вену. Вводимый объем – 0,2 мл, в соответствии с методическими рекомендациями.

Методы исследования

Ежедневный осмотр

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных.

Внешний вид и падеж в течение периода введения.

Наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья и смертности проводили постоянно, в течение всего эксперимента.

Взвешивание животных.

Взвешивание животных осуществлялось через 24 часа на поверенных весах фирмы «Sartorius GMBH», определялась динамика изменения массы тела.

Определение размеров опухоли.

С помощью штангенциркуля, у каждого животного в группе производили определение 3 размеров солидной опухоли.

Вскрытие (некропсия).

Проводилась некропсия и паталогоанатомический анализ павших и забитых после эксперимента животных.

Статистика.

Анализ полученных данных проводился в соответствии с Методическими рекомендациями по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств [5].

Оценка эффективности противоопухолевого действия лекарственных средств

Для оценки противоопухолевого эффекта по торможению роста опухоли проводится определение 2–3 размеров опухоли у каждого животного в группе, после чего вычисляется объем (V, мм^3) опухоли по формулам:

$V = a \times b \times c$ или $V = (a \times b)2/2$,

где a, b и c — длина, ширина и высота опухолевого узла. Затем вычисляется средний объем опухоли в группе Vср.

Степень торможения роста опухоли определяется по показателям ТРО и Т/С [4, 8, 9], вычисляемым по формулам:

ТРО (%) = (Vконтроля – Vопыта)/ Vконтроля × 100;

Т/С (%) = (Vопыта / Vконтроля) × 100,

где V — средний объем опухоли (мм^3) в получавшей препарат и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок; Т — леченая группа; С — контрольная группа, Т/С —величина, обратная ТРО, используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли.

Допустимо определять ТРО и Т/С, используя в качестве показателя среднюю

массу опухоли у погибших и забитых в различные сроки исследования животных. ТРО и Т/С рассчитываются на 1, 7 и 14 сутки после окончания лечения. Значимый противоопухолевый эффект должен сохраняться не менее 7 суток.

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на опухолях животных были следующие:

ТРО<20% - 0

ТРО<20 — 50% ±

ТРО<51 — 80% +

ТРО<81 — 90% ++

ТРО<91 — 100%+<50% ПР/излечения +++

ТРО<91 — 100%+>50% ПР/излечения ++++

Количественные критерии оценки активности на ксенографтах опухолей человека были следующие:

Т/С=51 — 100% 0

Т/С=36 — 50% +

Т/С=21 — 35% ++

Т/С=6 — 20% +++

Т/С<5% ++++

Минимальные значения для трех обязательных для изучения чувствительных к препарату солидных опухолей или подкожно перевитых лейкозов:

ТРО≥70%, Т/С≤30%.

Минимальные значения для единственной чувствительной к препарату опухоли из всего спектра обязательных для изучения опухолей:

ТРО≥90%, Т/С≤10%.

Оценка эффективности в комбинации противоопухолевых препаратов

Изучаемое вещество вводят в комбинации с доступными наиболее эффективными и широко используемыми в клинической онкологии препаратами (циклофосфаном, доксорубицином, цисплатином, метотрексатом, таксолом, гемзаром и пр.). Целесообразно использовать чувствительную и резистентную к известному препарату опухоли и вводить комбинанты в дозах, составляющих половину от МПД и максимальной эффективной дозы, если таковые не совпадают. В качестве положительного контроля вещество и препарат вводят в полных или удвоенных дозах, что позволяет при равном противоопухолевом эффекте в сравниваемых группах оценить терапевтический эффект комбинации (ЭК):

Аддитивный эффект – ЭК меньше суммы эффектов комбинантов, но больше эффекта более активного комбинанта: А + В > ЭКАВ> Эmax (А или В).

Синергический эффект – ЭК меньше суммарного эффекта равных по эффекту

комбинантов, но больше, чем при введении одного из них А или В< ЭКАВ < ЭΣ (А + В).

Суммационный эффект — ЭК равен суммарному эффекту комбинантов: ЭКАВ = ЭΣ (А + В).

Потенцирующий эффект — ЭК больше суммарного эффекта комбинантов: ЭКАВ >ЭΣ (А + В).

Снижение эффекта — ЭК меньше эффекта более активного комбинанта: ЭКАВ <Эmax (А или В).

Отсутствие эффекта — ЭК меньше минимального критерия эффективности: ЭКАВ <Эmin.

Экспериментальные группы и схемы лечения, использовавшиеся при осуществлении изобретения, представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные группы и схемы лечения.

Группа	**Препарат/введение**	**Объем опухоли (X±m) см³**	**Торможение роста опухоли, %**	**СПЖ (дни)**	**УПЖ%**
Контроль	Через 24 часа после прививки опухоли 0,2 мл физ. р-ра в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	20,3±4,2		20,6	
I опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТ3Д 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	17,6±1,9	13,3	23,2	112,6
II опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТ3Д 1,0 мг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	14,4±1,1	29,1	25,2	122,3
III опытная	Через 24 часа после прививки опухоли ВК3Д 130 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	10,3±0,9	49,3	28,3	137,4
IV опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нВК3Д 260 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	8,4±0,9	58,6	30,3	147,1

V опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 130 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	7,3±0,9	64,0	52,3	253,9
VI опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 1,0 мг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 130 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	4,2±0,6	79,3	58,2	282,5
VII опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 260 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	3,6± 0,5	82,3	60,3	292,7
VIII опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 1,0 мг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 260 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	2,9±0,4	85,7	61,0	296,1

Как показано на Таблице 1 и на Рис. 1 и 2, сочетанный противоопухолевый эффект исследуемой комбинации субстанций по критериям эффективности и безопасности в общем существенно превышает таковой при воздействии каждой из этих субстанций по отдельности. При этом уровень ТРО комбинации 64,0 -85,7 находится в диапазоне «положительного эффекта» (диапазон ТРО <51 — 80%) и «выраженного эффекта», тогда как этот показатель у каждой из субстанций по отдельности колеблется от «отсутствия эффекта» до «сомнительного эффекта».

По критерию «УПЖ» у композиции (значение 253,9-296,1) входит в диапазон <201–301%, то есть выраженного эффекта, тогда как эффективность каждой из субстанций оказалась от отсутствия таковой до сомнительной.

При этом:

1. По критерию ТРО, композиция 350/130 ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=13,3%, В=49,3% ЭКАВ=64,0 т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

По критерию УПЖ, соответственно: ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=112,6%, В=137,4%, ЭКАВ= 253%, т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

2. По критерию ТРО, композиция 1000/130 ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=29,3%, В=49,3% ЭКАВ=79,3 т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

По критерию УПЖ, соответственно: ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=122,3%, В=137,4%, ЭКАВ= 259,7%, т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

3. По критерию ТРО, композиция 350/260 ЭКАВ> Э∑(А+В), где А= А=13,3%, В=58,6% ЭКАВ=82,3 т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

По критерию УПЖ, соответственно: ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=112,6%, В=147,1%, ЭКАВ= 292,7%, т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

4. По критерию ТРО, композиция 1000/260 ЭКАВ<Э∑(А+В), где А= А=29,3%, В=58,6% ЭКАВ=85,7 т.е. комбинация оказывает синергический эффект.

По критерию УПЖ, соответственно: ЭКАВ> Э∑(А+В), где А=112,6%, В=147,1%, ЭКАВ= 296,1%, т.е. комбинация оказывает потенцирующий эффект.

Таблица 2. Исследование противоопухолевой активности по критериям торможение роста опухоли (ТРО) и удлинение продолжительности жизни (УПЖ) различных соотношений композиции конъюгатов нанометотрексата с р.ЗдАФП и нановинкристина.

Группа	**Препарат/ введение**	**Объем опухоли (X±m) см³**	**Торможение роста опухоли, %**	**СПЖ (дни)**	**УПЖ%**
Контроль	Через 24 часа после прививки опухоли 0,2 мл физ. р-ра в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	20,3±4,2		20,6	
I опытная	Через 24 часа после прививки опухоли МТХ 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + Винкристин 130 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	10,3± 3,2	49,3	25,2	122,3
II опытная	Через 24 часа после прививки опухоли МТХ 350 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра + Винкристин 390 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	8,1±2,2	60,1	27,3	132,5
III опытная	Через 24 часа после прививки опухоли МТХ				

	350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + Винкристин 780 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	3,4±0,5	83,3	19,3	165,0 (у 20% выживших животных)
IV опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 130 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	7,3±0,9	64,0	52,3	253,9
V опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 350 мкг/кг веса 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 390 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	3,1±0,7	84,7	58,4	283,5
VI опытная	Через 24 часа после прививки опухоли нМТЗД 350 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра + нВКЗД 780 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	1,9±0,09	90,6	73,7	357,8

Переносимость терапии препаратами МТХ + ВНК и нМТЗД+ нВНЗД животными

После введения композиции препаратов **МТХ + ВНК** наблюдалось угнетение двигательной активности животных, которое прогрессировало при повторных введениях. Кроме этого, через некоторое время после введения наблюдалась дозозависимая местная реакция – отек, иногда очаги некроза. Введение **нМТЗД+ нВНЗД** животные переносили значительно лучше, седация и местная реакция практически отсутствовали.

Как показано на Таблице 2 и рис. 3,4, в группах животных, получавших композицию **нМТЗД+ нВНЗД,** гибели животных не зарегистрировано. В группе животных, получавших композиции препаратов **МТХ + ВНК** в дозе 350 мкг/кг/130, гибели животных не отмечалось; в группе животных, получавших композиции препаратов **МТХ + ВНК** в дозе 350 мкг/кг/360 к 20 дню, погибло 2 животных из 10 (20%); в дозе 350 мкг/кг/780 – 8 из 10 (80%). Впоследствии у выживших животных возобновился рост опухоли, и они погибли на 34 день от начала эксперимента.

Выживаемость мышей самок DBA_2 с солидной моделью лимфолейкоза Р388.

Таблица 3. Изучение сравнительной противоопухолевой активности композиции препаратов Метотрексата + Винкристина (МТХ + ВНК) и конъюгата нано-Метотрексата с р3дАФП и наноВинкристина с р3дАФП (нМТ3Д+ нВН3Д) на солидной модели лимфолейкоза Р388 у мышей самок DBA_2.

Группа	Препарат/введение	Пало всего	ЛД мкг/кг веса
10 животных			
контроль	0,2 мл 10% раствора реополиглюкина (в хвостовую вену) 1 раз через 5 дней после перевивки опухоли.	0/10	
I опытная гр.	Через 5 дней после прививки опухоли МТХ 1мг/кг веса + Винкристин 780 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз.	2/10	ЛД16=1000/750
II опытная гр.	через 5 дней после перевивки опухоли МТХ 1мг/кг веса + Винкристин 1170 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз.	6/10	ЛД50=1000/1150
III опытная гр.	через 5 дней после перевивки опухоли МТХ 1мг/кг веса + Винкристин 1560 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз в 4 дня всего 5 введений.	8/10	ЛД84= 1000/1600
IV опытная гр.	Через 24 часа после прививки опухоли нМТ3Д 1 мг/кг веса + нВК3Д 1560 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз	0/10	
V опытная гр.	Через 5 дней после прививки опухоли нМТ3Д 1 мг/кг веса + нВК3Д 3120 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз	2/10	ЛД16=1000/3060

VI опытная гр.	Через 5 дней после прививки опухоли нМТ3Д 1 мг/кг веса + нВК3Д 4680 мкг/кг веса в хвостовую вену 1 раз	6/10	ЛД50=1000/4500

Как показано на Таблице 3 и Рис. 5, острая токсичность препарата конъюгата нано-Метотрексата с ЗДАФП и наноВинкристина с ЗДАФП (нМТ3Д+ нВН3Д) уменьшается в 3,9 раза (LD_{50} (МТХ + ВК) /LD_{50} (нМТ3Д+ нВН3Д)= 3,9).

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

Источники информации.

1. Годованный А.В., и др. Изучение противоопухолевой активности in vitro конъюгата рекомбинантного С-концевого домена АФП // Молекулярная медицина, 2011, № . 1, с.44-48.
2. RU 2285537 C; опубл. 20.10.2006.
3. Караулов А.В, и др. "Характеристика моноклональных антител к рецептору афп в сравнении с афп по их взаимодействию с опухолевыми клетками человека" Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2001.-N 3.-С.19-25
4. Круглый Б.И., и др. "Сравнительные исследования противоопухолевой активности и безопасности нового препарата белково-векторной доставки актиномицинового ряда на экспериментальных опухолевых моделях у мышей" Онкопедиатрия, т.3/№ 3, стр.188-199, 2016.
5. Ред. Миронов А.Н., Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
6. Петров Р.В., и др. "Направленный транспорт противоопухолевых и антибактериальных препаратов". Аллергология и иммунология. 2003. 4(№3):91-96
7. RU 2105567 C1, опубл. 27.02.1998.
8. RU 2154468 C1; опубл. 09.11.1999.
9. Северин Е.С., и др. «Разработка новых технологий создания лекарственных препаратов избирательного действия». Аллергология и иммунология, 16(4): 347-350, 2015.
10. Северин Е.С, и др. "Противоопухолевая активность конъюгатов альфа-фетопротеина с доксорубицином в отношении клеток карциномы яичника человека in vitro". Акушерство и гинекология, 1998.-N 3.-С.45-47.

Формула изобретения

1. Лекарственный препарат для лечения злокачественных новообразований, представляющий собой композицию из двух макромолекулярных компонентов, включающую

(а) наночастицы со средним диаметром от 100 до 200 нм, состоящие по меньшей мере из биодеградируемого полимера, векторной молекулы и винкристина с массовой долей 0,4÷1,0 мас.%;

(б) наночастицы со средним диаметром от 100 до 200 нм, состоящие по меньшей мере из биодеградируемого полимера, векторной молекулы и метотрексата с массовой долей 0,4÷1,0 мас.%.

2. Лекарственный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве векторной молекулы используют полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

3. Лекарственный препарат по п. 2, характеризующийся тем, что массовая доля полипептида в наночастицах составляет 0,1÷0,3 мас.%.

4. Лекарственный препарат по п. 2, характеризующийся тем, что в качестве биодеградируемого полимера в наночастицах используют сополимер молочной и гликолевой кислот, при этом соотношение мономеров молочной и гликолевой кислот в сополимере составляет 1:1.

5. Лекарственный препарат по п. 4, характеризующийся тем, что средняя молекулярная масса молекулы сополимера составляет от 10 до 20 кДа.

6. Лекарственный препарат по п. 4, характеризующийся тем, что массовая доля сополимера в наночастицах составляет 10,0÷50,0 мас.%.

7. Лекарственный препарат по п. 4, характеризующийся тем, что наночастицы дополнительно содержат D-маннит, при этом массовая доля D-маннита составляет 60,0÷90,0 мас.%.

8. Лекарственный препарат по п. 7, характеризующийся тем, что наночастицы дополнительно содержат поливиниловый спирт, при этом массовая доля поливинилового спирта составляет 3,5÷4,0 мас.%.

9. Способ лечения злокачественных новообразований у субъекта, включающий парентеральное введение субъекту терапевтически эффективного количества лекарственного препарата по п. 1.

10. Способ по п. 9, характеризующийся тем, что эффективное количество лекарственного препарата при введении субъекту составляет от 17,1/6,0 мкг/кг до 51,4/42,0 мкг/кг массы субъекта.

11. Способ лечения по п. 10, характеризующийся тем, что злокачественным новообразованием является острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, неходжкинские лимфомы, лимфогранулематоз (лимфома Ходжкина) или миелоидная саркома.

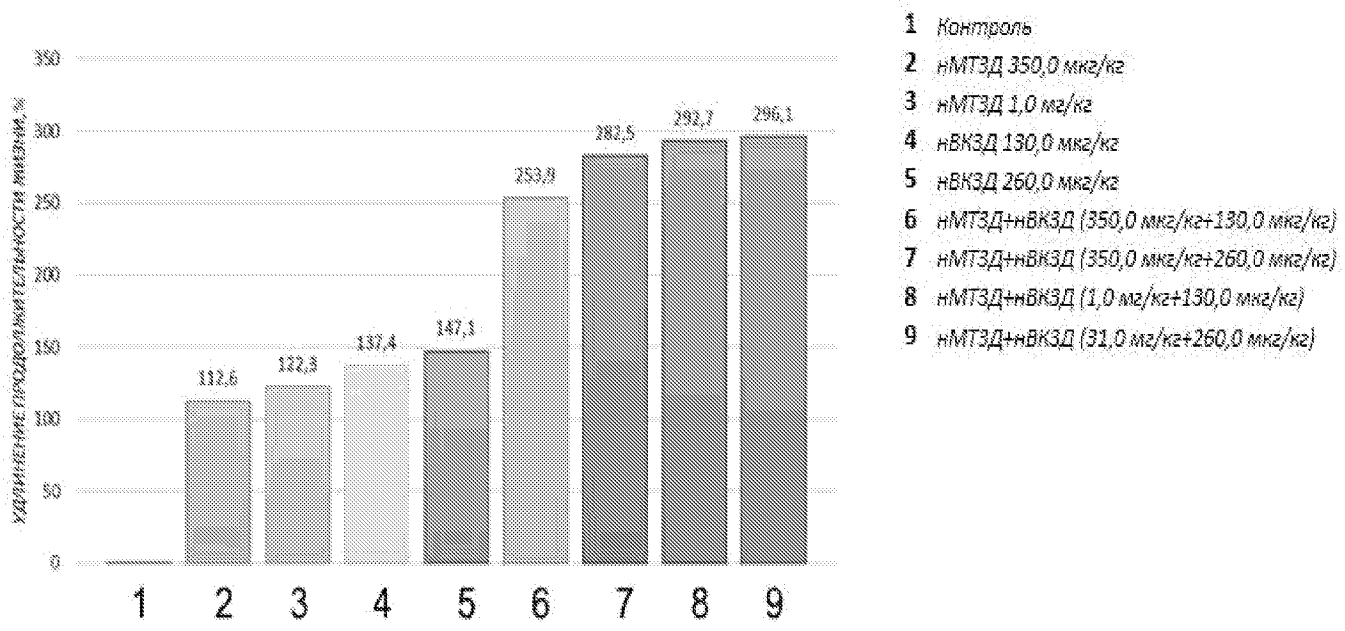
УДЛИНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ, %
350
300
250
200
150
100
50
0
112,6
122,3
137,4
147,1
253,0
282,5
291,7
296,1
1 2 3 4 5 6 7 8 9
1 Контроль
2 нМТЗД 350,0 мкг/кг
3 нМТЗД 1,0 мг/кг
4 нВКЗД 130,0 мкг/кг
5 нВКЗД 260,0 мкг/кг
6 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
7 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+260,0 мкг/кг)
8 нМТЗД+нВКЗД (1,0 мг/кг+130,0 мкг/кг)
9 нМТЗД+нВКЗД (31,0 мг/кг+260,0 мкг/кг)

Рис. 1

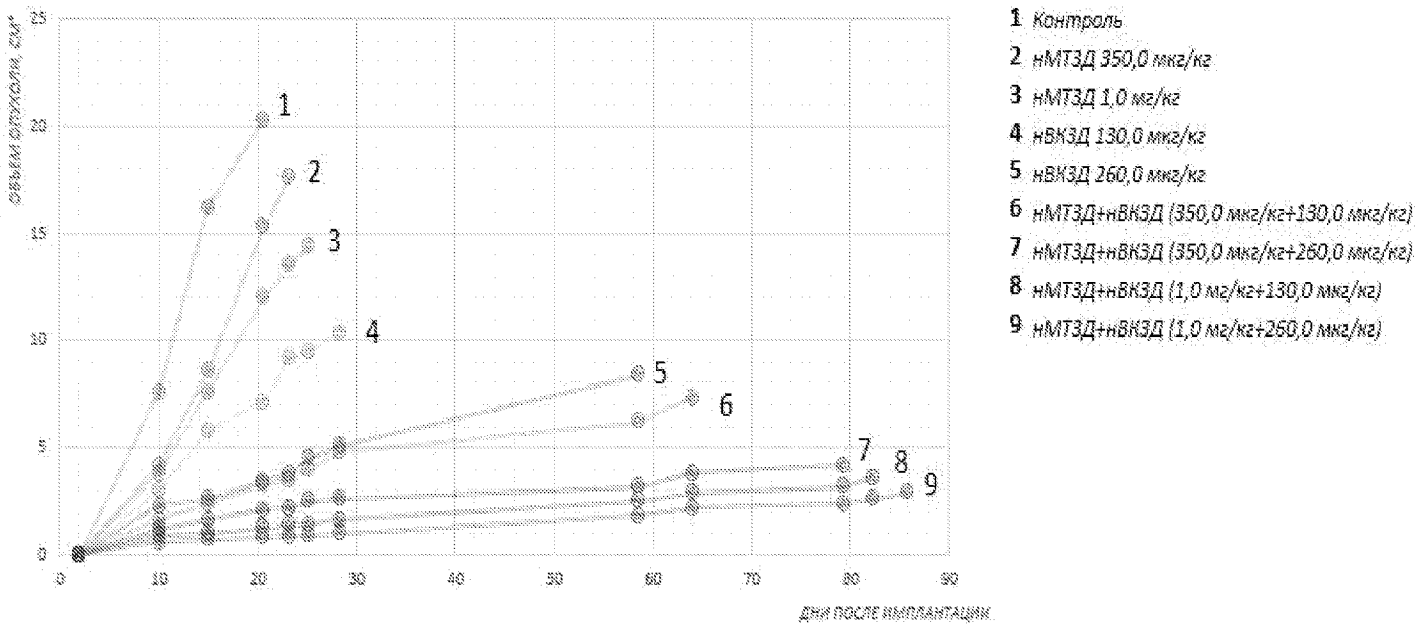
объем опухоли, см³
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
дни после имплантации
1
2
3
4
5
6
7
8
9
1 Контроль
2 нМТЗД 350,0 мкг/кг
3 нМТЗД 1,0 мг/кг
4 нВКЗД 130,0 мкг/кг
5 нВКЗД 260,0 мкг/кг
6 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
7 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+260,0 мкг/кг)
8 нМТЗД+нВКЗД (1,0 мг/кг+130,0 мкг/кг)
9 нМТЗД+нВКЗД (1,0 мг/кг+260,0 мкг/кг)

Рис. 2

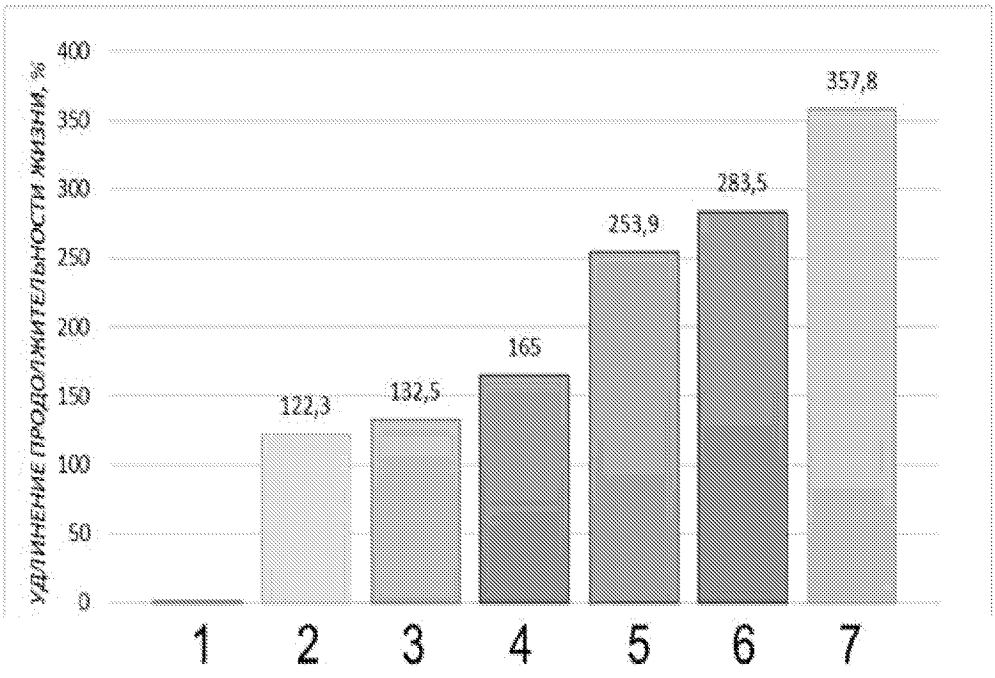
УДЛИНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ, %
400
350
300
250
200
150
100
50
0
122,3
132,5
165
253,9
283,5
357,8
1
2
3
4
5
6
7
1 Контроль
2 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
3 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+390,0 мкг/кг)
4 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+780,0 мкг/кг)
5 нМТ3Д+нВК3Д (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
6 нМТ3Д+нВК3Д (350,0 мкг/кг+390,0 мкг/кг)
7 нМТ3Д+нВК3Д (350,0 мкг/кг+780,0 мкг/кг)

Рис. 3

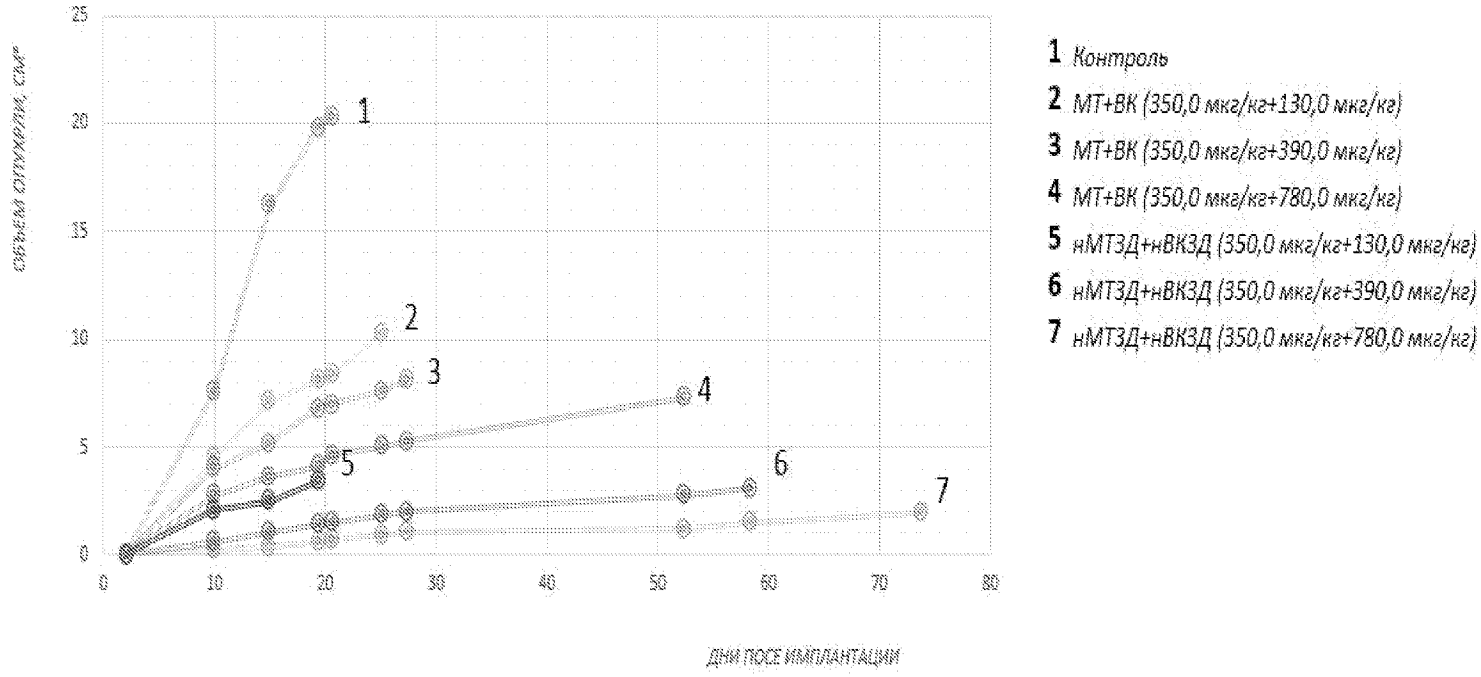
ОБЪЕМ ОПУХОЛИ, СМ³
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
ДНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ
1
2
3
4
5
6
7
1 Контроль
2 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
3 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+390,0 мкг/кг)
4 МТ+ВК (350,0 мкг/кг+780,0 мкг/кг)
5 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+130,0 мкг/кг)
6 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+390,0 мкг/кг)
7 нМТЗД+нВКЗД (350,0 мкг/кг+780,0 мкг/кг)

Рис. 4

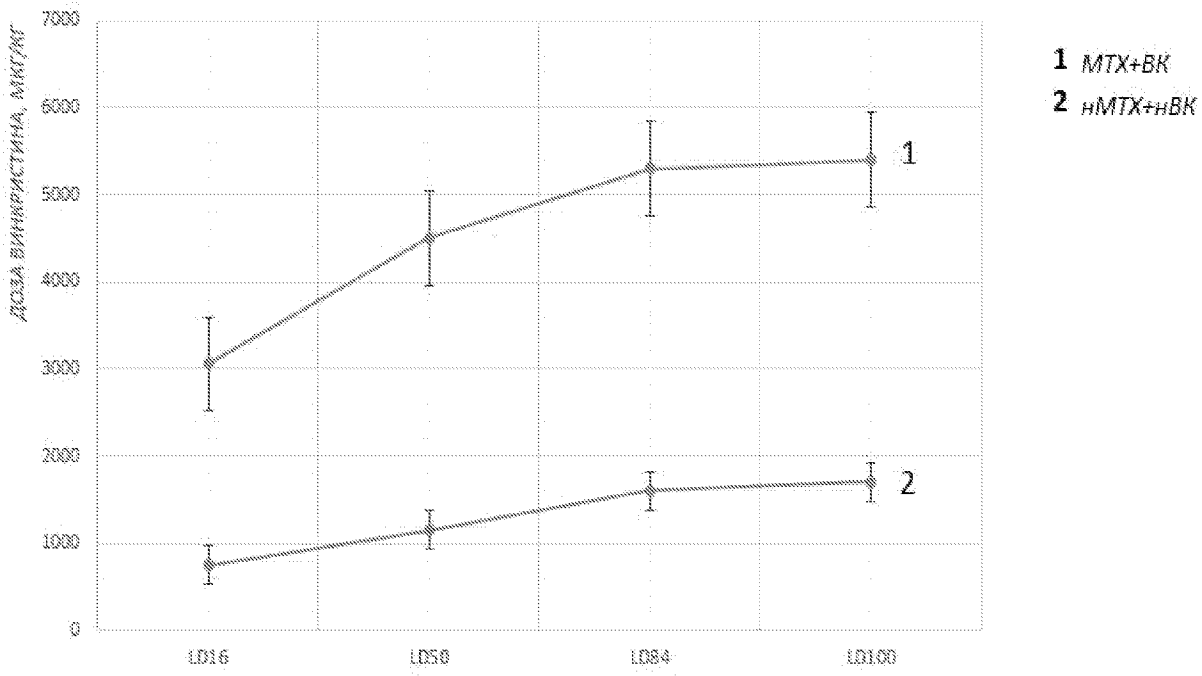
ДОЗА ВИНКРИСТИНА, МКГ/КГ
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
LD16
LD50
LD84
LD100
1
2
1 MTX+BK
2 нMTX+нBK

Рис. 5

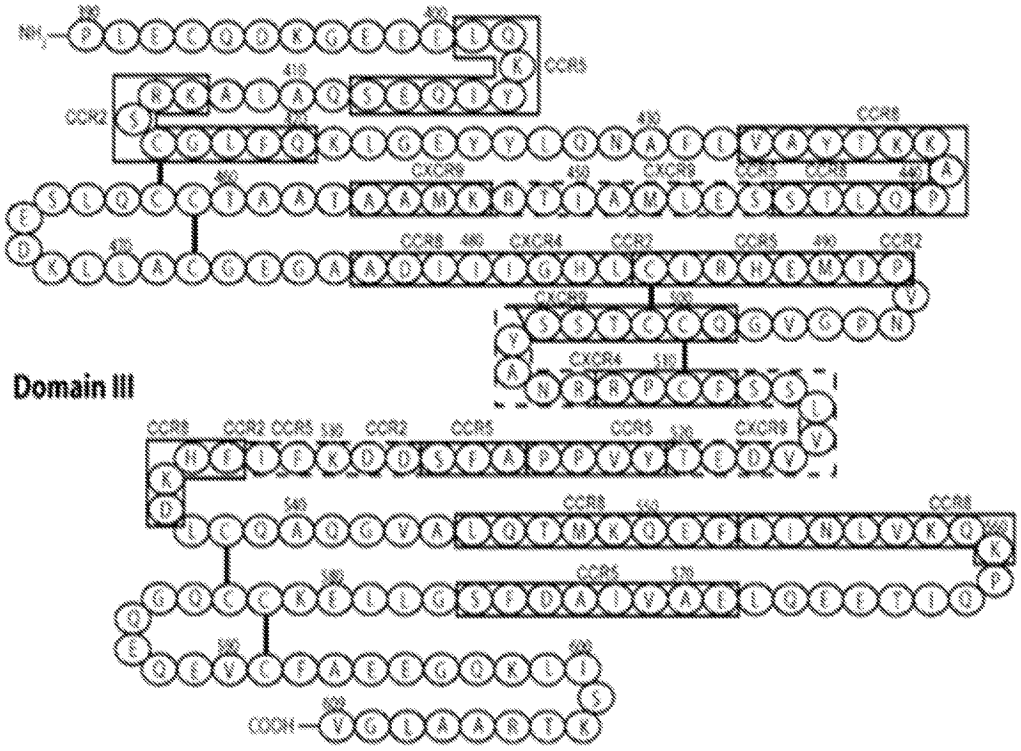

Рис. 6

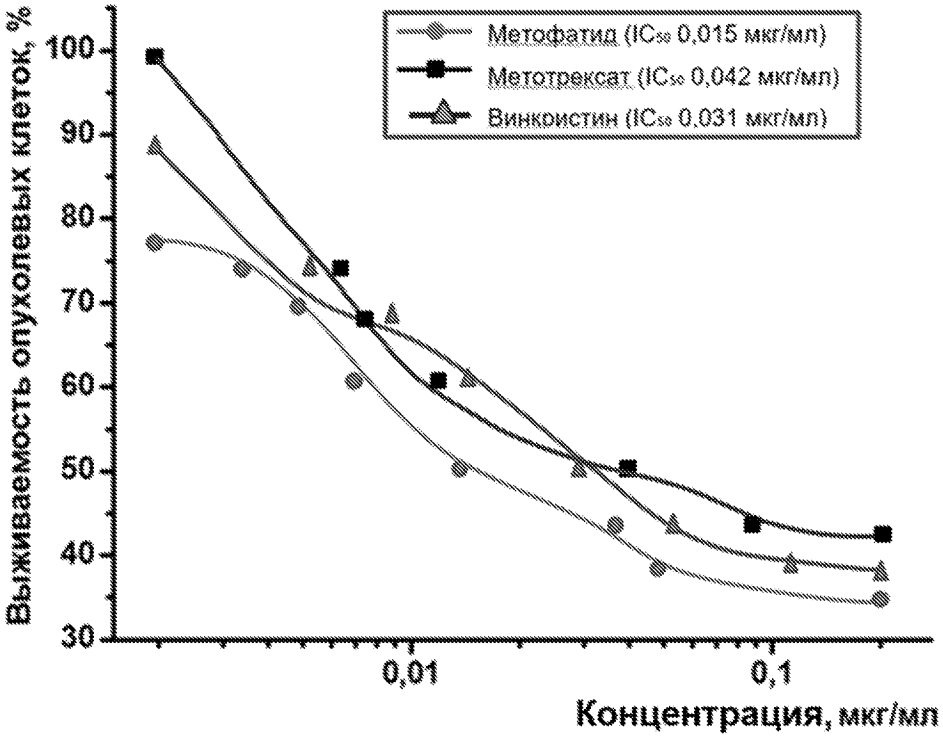
Метофатид (IC50 0,015 мкг/мл)
Метотрексат (IC50 0,042 мкг/мл)
Винкристин (IC50 0,031 мкг/мл)
Выживаемость опухолевых клеток, %
100
90
80
70
60
50
40
30
0,01
0,1
Концентрация, мкг/мл

Рис. 7

ЕВРАЗИИСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки: 201800477

Дата подачи: 28 августа 2018 (28.08.2018) | Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: Препарат для лечения онкологических заболеваний

Заявитель: ООО "НПК АЛЬФА-ОНКОТЕХНОЛОГИИ"

☐ **Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)**

☐ **Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)**

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК: *см. дополнит.лист* СПК: *см. дополнит.лист*

Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

A61K 9/00, 9/14, 31/00, 31/475, 31/519, 47/00, 47/30, 47/34, A61P 35/00, B82B 1/00, B82Y 5/00, A61K 9/10, 9/51

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2015/0342896 A1 (AMRITA VISHWA VIDYAPEETHAM UNIVERSITY) 03.12.2015, реферат, параграфы [0053], [0060] - [0062], [0074], пп. 1, 2, 5, 7, 11, 13 формулы	1-11
Y	RU 2451509 C1 (АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ "ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ") 27.05.2012, реферат, с. 3, абзацы 1-5 снизу, с. 4, абзац 1 сверху, с. 5, абзацы 2-3 снизу, формула	1-11
Y	MULDER J.H. et al. Vincristine-Methotrexate Combination Chemotherapy and the Influence of Weight Loss on Experimental Tumour Growth. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1979, V. 3, pp. 111-116, реферат	1-11
Y	RU 2630974 C1 (АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ "ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ") 15.09.2017, реферат, с. 9, строки 37-38, с. 10, строки 20-21, 43, 45, п. 1 формулы	2-8

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"A" документ, определяющий общий уровень техники

"E" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"O" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"T" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 22 января 2019 (22.01.2019)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
Федеральный институт промышленной собственности
РФ, 125993,Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1.Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо :
В.В. Евстигнеев
Телефон № (499) 240-25-91

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:
201800477

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК:	СПК:
A61K 9/10 *(2006.01)*	***A61K 9/10*** *(2017.08)*
A61K 9/14 *(2006.01)*	***A61K 9/14*** *(2013.01)*
A61K 9/51 *(2006.01)*	***A61K 9/5153*** *(2013.01)*
A61K 31/475 *(2006.01)*	***A61K 31/475*** *(2013.01)*
A61K 31/519 *(2006.01)*	***A61K 31/519*** *(2013.01)*
A61K 47/34 *(2017.01)*	***A61K 47/34*** *(2017.08)*
A61P 35/00 *(2006.01)*	***A61P 35/00*** *(2018.01)*
B82Y 5/00 *(2011.01)*	***B82B 1/00*** *(2017.08)*
	B82Y 5/00 *(2017.08)*

Дополнительный лист