

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038631**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.27

(51) Int. Cl. **A61K 47/69** (2017.01)

(21) Номер заявки
201891159

(22) Дата подачи заявки
2016.12.20

(54) НАНОСИСТЕМЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО ТРАНСПОРТА АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО, ПРОГНОСТИЧЕСКОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

(31) **102015000085923**

(32) **2015.12.21**

(33) **IT**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/IB2016/057824**

(87) **WO 2017/109696 2017.06.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT); НАНОДЖЕТИК С.Л. (ES)

(72) Изобретатель:
Санчес Мартин Росарио Мария,
Пернагальо Сальваторе, Унсити
Бросета Хуан Диего (ES), Мессина
Лучано, Ваккаро Сузанна, Пилотто
Лаура (IT)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)

(56) US-A1-2015342883

RAJAN M. ET AL.: "Hyaluronidase enzyme core-5-fluorouracil-loaded chitosan-PEG-gelatin polymer nanocomposites as targeted and controlled drug delivery vehicles", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 453, no. 2, 21 June 2013 (2013-06-21), pages 514-522, XP028682709, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2013.06.030, cited in the application, the whole document

ZAHRA HAMI ET AL.: "Doxorubicin-conjugated PLA-PEG-Folate based polymeric micelle for tumor-targeted delivery: Synthesis and in vitro evaluation", DARU JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 22, no. 1, 6 March 2014 (2014-03-06), page 30, XP021182446, ISSN: 2008-2231, DOI: 10.1186/2008-2231-22-30, the whole document

(57) Изобретение относится к системе наночастиц для контролируемого транспорта активных молекул диагностического, прогностического и терапевтического назначения, которая содержит полимерные наночастицы, состоящие из синтетического полимера, связанного с гетероуглеродной цепью ковалентными связями между функциональными группами, присутствующими на полимере, и функциональными группами, присутствующими на указанной гетероуглеродной цепи, гиалуронидазы и одной или более активных молекул, ковалентно связанных с указанной гетероуглеродной цепью, где наночастицы имеют размер в диапазоне от 50 до 200 нм, синтетический полимер представляет собой полистирол, гетероуглеродная цепь выбрана из полиэтиленгликолевых цепей, активные молекулы выбраны из доксорубина, флуорофоров и антител. Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанную систему наночастиц.

B1

038631

038631

B1

В настоящем описании раскрыта система наночастиц, состоящая из полимерной подложки или основы в форме наночастиц, с которыми ковалентно связаны фермент гидролаза, способная расщеплять гиалуроновую кислоту, и одна или более биологически и/или фармакологически активных молекул, а также способ ее получения и ее применение в диагностической, прогностической и терапевтической областях.

Предшествующий уровень техники

Применение наночастиц для транспорта лекарственных средств через кровеносную систему является известным методом, который все более широко используется благодаря значительному технологическому прогрессу в данной области. Он дает существенные преимущества по сравнению с традиционными способами введения: при инъектировании в кровоток наночастицы, двигающиеся за счет гемодинамических эффектов, достигают сайта патологического процесса и после прикрепления к стенкам "больной" клетки высвобождают лекарственное средство локально в нужной дозе, и после этого они оказывают высокоселективное действие. Наночастицы представляют собой частицы наномерных размеров, которые обычно состоят из несущей структуры, содержащей лекарственное средство или, если брать шире, активную молекулу. Наночастицы должны быть сконструированы таким образом, чтобы независимо от выбранного пути введения высвобождение связанного с ними лекарственного средства было отрегулировано в количественном и в качественном выражении для обеспечения:

а) высокой селективности, обнаружения только больных клеток и действия только против них или, в общем, в сайте-мишени;

б) высокой эффективности, чтобы использовать минимальное эффективное количество активной молекулы;

в) низкой токсичности как прямого результата пункта (б).

Исследования, проведенные к настоящему времени с целью оценки систем наночастиц, демонстрируют, что *in vitro* они представляют собой эффективный путь введения лекарственных средств и/или активных молекул; однако *in vivo* необходимо учитывать способность наночастиц преодолевать барьеры, свойственные каждому пути введения, масштабы распределения, необходимые для достижения терапевтического эффекта, и главным образом токсичность, которая может иметь место; следовательно, размер, тип и композиция указанных частиц должны быть точно определены для намеченных применений. Для большинства обычных путей введения (пероральный, инъекционный) наиболее решающие факторы связаны с тем, что наночастицы могут высвободить слишком много или слишком мало активного ингредиента, становясь токсичными в первом случае и бесполезными во втором случае; более того, после перорального введения эффект первого прохождения через печень может значительно влиять на концентрацию в крови, необходимую для фармакологической активности.

Необходимость в большей степени напрямую контролировать и оптимизировать концентрацию лекарственного средства в крови привела к разработке альтернативных систем введения через кожу (трансдермальный путь) или слизистую оболочку (трансмуккозальный путь, который включает сублингвальный/трансбукальный, назальный, трахеальный и ректальный пути). Указанные системы делают возможным быстрое поступление лекарственного средства в кровоток, исключая риски и трудности, описанные выше, поскольку как кожа, так и слизистая оболочка имеют высокую плотность кровеносных сосудов, обеспечивающих быструю системную диффузию лекарственного средства. Однако даже в этих случаях необходимо учитывать естественный барьер, через который должны проходить наночастицы; например, чрескожный путь требует, чтобы наночастицы проникали в кожу, и на данный момент эта проблема была решена за счет совместного введения лекарственного средства с ферментами, стимулирующими указанное проникновение, такими как гиалуронидаза. Гиалуронидаза гидролизует гиалуроновую кислоту, присутствующую в тканях, деполимеризуя вязкоэластичную структуру подкожного интерстициального матрикса и тем самым увеличивая диффузию локально инъектированных наночастиц (Bookbinder et al., J. Contr. Rel. 2006, 28, 230-241). Некоторые технические решения, предусматривающие объединение активного ингредиента с гиалуронидазой и со свободными полимерами или с полимерами, организованными в микро- или наночастицы, уже известны; однако указанные решения характеризуются тем, что различные ингредиенты смешивают вместе, или, чаще всего, наночастицы включают в себя активные ингредиенты и/или фермент гиалуронидазу, которые вводят в частицы во время процесса формирования (WO 2013/151774; US 2013/302400; Rajan et al., Int. J. Pharmac., 2013, 453, 514-522). Однако очевидно, что при использовании этого процесса ингредиенты в целом не могут быть точно измерены с целью достижения постоянного, непрерывного высвобождения активного ингредиента в максимальных терапевтических дозах и с минимальной токсичностью. В любом случае указанные решения не гарантируют, что лекарственное средство и частица остаются связанными до тех пор, пока они не достигнут их сайта-мишени.

Описание изобретения

Настоящее изобретение решает текущие задачи использования уже структурированных наночастиц, которые связаны ковалентными связями с одним или более активными веществами в рассчитанных количествах, гарантирующих, что они будут выполнять желаемую функцию, и с ферментом гиалуронидазой, которая выполняет функцию стимулирования проникновения.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Схематическая структура наносистемы по изобретению, состоящая из полимерного ядра (наночастица), связанного с разветвленной углеродной цепью, содержащей одну или более групп, подходящих для ковалентного связывания активных молекул.

Фиг. 2. Типовая схема ковалентного связывания rHyal_sk с полистирольными наночастицами, имеющими размер 200 нм.

Фиг. 3. График, показывающий результаты ферментативной активности rHyalSk, ковалентно связанной с наночастицами (турбидиметрический анализ). Этот график показывает количество единиц HYAL, связанных с наночастицами.

Фиг. 4. Схема, изображающая ковалентную бифункционализацию наночастиц с rHyal_Sk и флуорофором или лекарственным средством.

Фиг. 5A. Схема, изображающая ковалентную бифункционализацию наночастиц с rHyal_Sk и анти-телом (Ab).

Фиг. 5B. Схема, показывающая ковалентную бифункционализацию наночастиц с rHyal_Sk и анти-телом (Ab) и подготовку для трифункционализации.

Фиг. 5C. Схема, показывающая ковалентную трифункционализацию наночастиц с флуорофором, rHyal_Sk и антителом (Ab).

Фиг. 6. Подтверждение наносистем, меченных Cy5 и Cy7: а) общая химическая структура; б) данные проточной цитофлуорометрии наносистем, меченных Cy5 и Cy7.

Фиг. 7. График, показывающий результаты ферментативной активности наносистем, бифункционализированных rHyal_Sk и флуорофорами (Cy5 и Cy7) (турбидиметрический анализ).

Фиг. 8. Данные проточной цитофлуорометрии по клеточной проницаемости для наносистем, полученных как описано в Примере 2, на линиях клеток (A) HUVEC и (B) HFF.

Фиг. 9. А) Подсчет количества Cy5-HyaluSpheres и Cy5-FluoroSpheres, присутствующих в нижней части вставки (Transwell). В) Модель Transwell in vitro с двумя монослоями HUVEC. С) Флуоресцентная микроскопия клеточной проницаемости монослоя HUVEC в нижней части вставки для Cy5-HyaluSpheres.

Фиг. 10. Цитотоксическая активность доксорубина, ковалентно связанного с наночастицами, на клеточной линии 4T1.

Фиг. 11. Цитотоксическая активность доксорубина, ковалентно связанного с наночастицами, на клеточной линии A549.

Фиг. 12. Подтверждение конъюгирования с моноклональным антителом на наносистемах, полученных, как описано в Примере 4B (тестирование методом электрофореза в агарозном геле).

Фиг. 13. Подтверждение конъюгирования с моноклональным антителом на наносистемах, полученных как описано в Примере 4C (тестирование методом электрофореза в агарозном геле).

Фиг. 14. Данные проточной цитофлуорометрии по клеточной проницаемости для наносистем, полученных как описано в Пример 4C, на клеточных линиях A549 и H520.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к системе наночастиц для контролируемого транспорта активных молекул диагностического, прогностического и терапевтического назначения, которая состоит из полимерной подложки или основы в форме наночастиц, состоящих из синтетического полимера, связанного с гетероуглеродной цепью ковалентными связями между функциональными группами, присутствующими на полимере, и функциональными группами, присутствующими на указанной гетероуглеродной цепи, фермента гидролазы, способного расщеплять гиалуроновую кислоту, (гиалуронидазы) и одной или более активных молекул, ковалентно связанных с указанной гетероуглеродной цепью; где наночастицы имеют размер в диапазоне от 50 до 200 нм, синтетический полимер представляет собой полистирол, гетероуглеродная цепь выбрана из полиэтиленгликолевых цепей, и активные молекулы выбраны из доксорубина, флуорофоров и антитела. Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанную систему наночастиц в смеси с фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Наночастицы по изобретению благодаря типу связи, посредством которой они прикреплены к целевым молекулам, представляют собой передовую систему для транспорта и выверенного контролируемого высвобождения активных ингредиентов, которая гарантирует одновременно высокую активность, высокую эффективность и низкую токсичность.

В отличие от систем, известных в настоящее время, все ингредиенты системы наночастиц по изобретению объединены посредством стабильных ковалентных связей с образованием единой наносистемы с активностью гиалуронидазы, способной связывать и транспортировать другие функционально активные молекулы; следовательно, ингредиенты больше не отделены механически друг от друга и функционируют как одна единица. Наносистема, описанная в данном документе, состоит из полимерного ядра (наночастица), связанного с разветвленной гетероуглеродной цепью, содержащей одну или более групп, способных связывать целевые активные составляющие с образованием единой активной молекулярной структуры, которая схематически иллюстрируется на фиг. 1.

Полимерное ядро.

Полимерное ядро в форме наносферы состоит из синтетического полимера, представляющего собой полистирол (PS), содержащего функциональные группы, способные взаимодействовать с функциональными группами гетероуглеродной цепи. Особенно подходящим для целей изобретения является полистирол, функционализированный аминогруппами, который получают, например, способом полимеризации в дисперсии (Sanchez-Martin et al., 2005, Chem. BioChem., 6, 1341-1345) из водных растворов а) стирола в качестве основного мономера; б) дивинилбензола (DVB), сшивающего агента, содержащего две виниловые группы; в) винилбензиламина гидрохлорида (VBAH) в качестве второго мономера, содержащего аминогруппу. Реакцию проводят при 80°C в инертной атмосфере с использованием сульфата магния в качестве стабилизирующего агента. Через 30 мин после начала реакции добавляют водорастворимый инициатор радикальной полимеризации 2-дигидрохлорид-2'-азо-бис-(2-метилпропионамид) (V-50). Реакция протекает в течение последующих 2 ч при перемешивании. Этим способом получают наночастицы, имеющие размеры в диапазоне от 50 до 2000 нм. Полистирольные наночастицы, имеющие размеры в диапазоне от 100 до 500 нм и, в частности, равные 200 нм, являются предпочтительными. Описанный синтез был оптимизирован с целью получения наночастиц размером 200 нм, функционализированных аминогруппами. Размеры диспергированных наночастиц проверяли с использованием методов лазерной дифрактометрии [Dynamic Light Scattering (динамическое светорассеяние) (DLS) Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments] и сканирующей электронной микроскопии (SEM, Hitachi, S-510).

Гетероуглеродная цепь.

Разветвленная гетероуглеродная цепь (далее именуемая "углеродной цепью") содержит одну или более групп, подходящих для образования ковалентной связи с активными молекулами, и одновременно создает пространство между наночастицей и указанными молекулами. Указанные цепи представляют собой цепи варьирующей длины, имеющие группы, способные образовывать ковалентные связи, в частности группы, ортогональные по отношению друг к другу, с которых в ходе синтеза различными методами удаляют защитные группы. Их присутствие улучшает биосовместимость и снижает взаимодействия между наночастицей и активными молекулами, тем самым увеличивая стабильность и функциональность последних. Примеры указанных цепей включают цепи полиэтиленгликолей, и особенно предпочтительной является N-Фмос-N-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекандиаминная цепь (PEG спейсер). При необходимости, длина цепи также может быть модифицирована (пространственный объем молекул, которые нужно связывать, реакционные условия и т.д.) присоединением спейсеров, и для этой цели обычно используют полиэтиленгликолевые (PEG) цепи.

Заместители: Группа X.

Группа X (фиг. 1) представляет собой ферментный компонент (гиалуронидазу), который может быть человеческого или животного происхождения, из позвоночных, бактерий, или полученный в рекомбинантной форме. Предпочтительной является гиалуронидаза, полученная бактериальной ферментацией или рекомбинантными методами, например гиалуронидаза из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в ее рекомбинантной форме, продуцированной согласно WO 2014/203133 (Hyal_Sk). Указанная гиалуронидаза имеет высокую стабильность и подходит для способов, которые требуются для ковалентного конъюгирования с наночастицами. Присутствие гиалуронидазы в группе X придает системе гидролитическую способность, специфическую в отношении гиалуроновой кислоты.

Заместители: Группы Y и Z.

Группы Y и Z представляют собой переменную часть системы, так как они различаются в зависимости от намеченного применения системы наночастиц. Согласно изобретению термин "активные молекулы" означает как небольшие молекулы, так и сложные молекулярные структуры (антитела). Группа Y представляет активные молекулы, которые могут представлять собой существующие лекарственные средства природного происхождения (такие как доксорубин), антитела и флуорофоры (такие как Cy3, Cy5, Cy7, флуоресцеин, родамин, нафтофлуоресцеин и т.д.). Группа Z может представлять собой водород (-H), алкильную цепь, полиэтиленгликолевую цепь, нацеливающие молекулы (антитела) (еще раз определенные как "активные молекулы") для придания наносистемам селективных свойств.

Группы Y и Z могут по-разному сочетаться друг с другом в зависимости от эффекта, который должна оказывать система наночастиц, ее назначения и ее применения.

Для ковалентного конъюгирования могут быть использованы различные функциональные группы и известные способы, например связывание, опосредованное молекулами глутаральдегида, активными сложными эфирами, связывание посредством малеимидных, дисульфидных групп и квадратной кислоты. Связывание посредством диэтилсварата является особенно предпочтительным для связывания с гиалуронидазой.

Схематически способ получения системы наночастиц по изобретению включает в себя следующее.

1. Функционализация полистирольных наночастиц подходящими функциональными группами, особенно первичными или третичными аминогруппами (-NH₂), карбоксильными группами, эпосигруппами, предпочтительно аминогруппами.

2. Функционализация полученных таким образом частиц соответственно выбранной гетероуглеродной цепью, которая благодаря ее ортогональным группам впоследствии приводит к точной, селек-

тивной функционализации; этим способом наночастицы получают две или три временно защищенные боковые цепи, которые после селективного удаления защитных групп готовы к присоединению активных молекул.

3. Функционализация наночастицы гиалуронидазой, предпочтительно рекомбинантного типа гHyal_Sk (группа X), в реакционной среде, имеющей значения pH в диапазоне от 7 до 11, в частности pH 10, и через ковалентную связь, предпочтительно через диэтилскварат. При таком значении pH достигаются значительные выходы для реализации в промышленных масштабах (фиг. 2).

4. Функционализация наночастицы одной (бифункционализация) или двумя (трифункционализация) соответственно выбранными активными молекулами с получением системы по изобретению.

Пункты 3 и 4 этого схематически проиллюстрированного способа можно осуществлять в обратном порядке в зависимости от размеров, природы молекул и их стабильности в условиях осуществления способа.

Далее, объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие полученные таким способом системы наночастиц, смешанные с фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Композиции по изобретению обычно находятся в подвергнутой сублимационной сушке форме для введения, представляют собой водную суспензию или гель, и их можно вводить подкожным, интрадермальным, интратекальным, внутримышечным, интраперитонеальным, внутривенным, внутриаортальным, трансдермальным, чрескожным трансмукозальным или ингаляционным путем введения, в частности подкожным, интрадермальным, чрескожным, трансдермальным, трансмукозальным или внутримышечным путем введения или ингаляцией.

В приведенных ниже примерах изобретение описано более подробно.

Пример 1. Функционализация наночастиц гиалуронидазой гHyal_Sk.

1. 1 мл функционализированных аминокетонами полистирольных наночастиц (содержание твердого вещества 2% в воде) центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл N,N-диметилформамида (DMF для пептидного синтеза, Scharlab).

2. N-Fmoc-N"-Сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамин (PEG спейсер, Sigma Aldrich) (75 экв.) в DMF смешивали с 75 экв. оксима (VWR) в течение 4 мин при комнатной температуре при непрерывном перемешивании (1400 об/мин). Затем добавляли 75 экв. N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC, Fluorochem) и полученную смесь перемешивали (1400 об/мин) в течение 2 мин при комнатной температуре.

3. Этот последний раствор (пункт 2) добавляли к наночастицам (пункт 1) и полученную смесь оставляли взаимодействовать под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C в течение 2 ч [фиг. 2(i)].

4. Наночастицы затем центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина (Sigma Aldrich) в DMF (сорта для пептидного синтеза, Scharlab) (2×1 мл) [фиг. 2(ii)].

5. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N'-диизопропилэтиламина (DIPEA, Sigma Aldrich) в смеси абсолютного этанола (Scharlab) и воды (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилскварат, Sigma Aldrich) и реакцию проводили при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч [фиг. 2(iii)].

6. После удаления надосадочной жидкости полученные наночастицы затем центрифугировали и промывали деионизированной водой (2×1 мл).

Наночастицы (пункт 6) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг гHyal_Sk [фиг. 2(iv)]. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10.

Конечную суспензию оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч. Наночастицы затем центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали (1) буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл), затем (2) 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) и 40 мМ этаноламином (Sigma) в буфере PBS (1 мл). Наночастицы консервировали в буфере PBS 1X при pH 7 при 4°C (1 мл).

Пример 2. Бифункционализация наночастиц гиалуронидазой (гHyal_Sk) и флуорофором (Cy5).

Присоединение к наночастицам углеродной цепи N-Fmoc-N"-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамина (PEG спейсер, Sigma Aldrich).

1. 1 мл функционализированных аминокетонами наночастиц (содержание твердого вещества 2% в воде), полученных, как описано выше, центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл N,N-диметилформамида (DMF сорта для пептидного синтеза, Scharlab).

2. M-Fmoc-N"-Сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамин (PEG спейсер, Sigma Aldrich) (75 экв.) в DMF смешивали с 75 экв. оксима (VWR) в течение 4 мин при комнатной температуре при непрерывном перемешивании (1400 об/мин). Затем добавляли 75 экв. N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC, Fluorochem) и полученную смесь перемешивали (1400 об/мин) в течение 2 мин при комнатной температуре.

3. Раствор, описанный в пункте 2, добавляли к наночастицам (пункт 1) и полученную смесь оставляли взаимодействовать под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C в течение 2 ч [фиг. 4(i)].

4. Наночастицы затем центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина (Sigma Aldrich) в DMF (сорта для пептидного синтеза, Scharlab) (2×1 мл) [фиг. 4(ii)].

5. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл) и метанолом (сорта для синтеза, Scharlab) (2×1 мл). Наночастицы хранили в деионизированной воде (1 мл) при 4°C.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

6. 1 мл наночастиц с PEG спейсером, полученных, как описано в предыдущем пункте (содержание твердого вещества 2% в воде) (пункт 5), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF.

7. Fmoc-Lys (Dde)-OH (GLBiochem) (75 экв.) в DMF смешивали с 75 экв. оксима (VWR) в течение 4 мин при комнатной температуре при непрерывном перемешивании (1400 об/мин). Затем добавляли 75 экв. DIC (Fluorochem) и полученную смесь перемешивали (1400 об/мин) в течение 2 мин при комнатной температуре.

8. Этот последний раствор (пункт 7) добавляли к наночастицам (пункт 5) и полученную смесь оставляли взаимодействовать под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C в течение 2 ч [фиг. 4(iii)].

9. Наночастицы затем центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в безводном DMF (2×1 мл).

10. PEG спейсер затем присоединяли в положение, ранее защищенное группой Fmoc, повторяя стадии, описанные в пунктах 1-4 [фиг. 4(iv-v)].

Конъюгирование флуорофора Cy5 с наночастицами.

11. 1 мл наночастиц, бифункционализированных группами Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил) и Dde (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексидил)этил), полученных, как описано в пунктах 1-10 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль) (Acros)/имидазолом (1,35 ммоль) (Acros) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч. Затем добавляли 75 экв. сульфо-NHS эфира Cy5 (Lumiprobe) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч в темноте [фиг. 4(vi-vii)].

12. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл). В заключение, наночастицы хранили в деионизированной воде (1 мл) при 4°C в темноте.

Конъюгирование gHyal_Sk с наночастицами.

13. После конъюгирования наночастиц с Cy5 удалял группу Fmoc. Наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в DMF (2×1 мл) [фиг. 4(viii)].

14. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N'-диизопропилэтиламина (DIPEA, Sigma Aldrich) в смеси абсолютного этанола (Scharlab) и воды (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-дизтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилкварат, Sigma Aldrich) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч в темноте [фиг. 4(ix)].

15. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали деионизированной водой (1 мл).

16. Наночастицы (пункт 15) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 mM растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг gHyal_Sk [фиг. 4(x)]. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1n. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч в темноте. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали (1) буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл), затем (2) 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA,

Sigma) и 40 мМ этаноламином (Sigma) в буфере PBS (1 мл). В заключение наночастицы хранили в буфере PBS 1X при pH 7 при 4°C (1 мл) в темноте.

Идентичная методика может быть использована для связывания флуорофора Cy7 с получением аналогичного результата.

Пример 3А. Бифункционализация наночастиц gHyal_Sk и капецитабином.

Присоединение углеродной цепи N-Fmoc-N"-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамина к наночастицам.

См. Пример 2, пункты 1-5.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

См. Пример 2, пункты 6-10.

Конъюгирование капецитабина с наночастицами.

11. 1 мл полистирольных наночастиц, бифункционализированных Fmoc и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-10 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль)/имидазолом (1,35 ммоль) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч [фиг. 4(vi)]. Затем добавляли эквимольный раствор янтарного ангидрида (75 экв.) и DIPEA (75 экв.) и диспергировали под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C в течение 2 ч. В заключение наночастицы промывали DMF (2×1 мл).

12. Полученные таким образом наночастицы (янтарный ангидрид-NP (наночастица)) активировали инкубированием с 200 мкл эквимольного раствора оксима (50 экв.) и DIC (50 экв.) в течение 4 ч при комнатной температуре при перемешивании при 1400 об/мин. Затем добавляли капецитабин (Sigma Aldrich) (1 экв., 1 мг/100 л DMF) и DMAP (Sigma) (0,5 мл) при перемешивании (1400 об/мин) при комнатной температуре в течение 12 ч [фиг. 4(vii)]. После взаимодействия наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл) и метанолом (2×1 мл). Наночастицы хранили в деионизированной воде (1 мл) при 4°C.

Конъюгирование gHyal_Sk с наночастицами.

13. После конъюгирования наночастиц с капецитабином удаляли группу Fmoc. Наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в безводном DMF (2×1 мл) [фиг. 4(viii)].

14. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в смеси этанол:вода (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилскварат, Sigma Aldrich) и полученную смесь оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч [фиг. 4(ix)].

15. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали деионизированной водой (1 мл).

16. Наночастицы (пункт 15) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг gHyal_Sk. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию затем оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч [фиг. 4(x)]. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл), затем 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 40 мМ этаноламином в буфере PBS (1 мл). Наночастицы хранили в буфере PBS 1 X при pH 7 при 4°C (1 мл).

Пример 3В. Бифункционализация наночастиц gHyal_Sk и доксорубицином (Дохо-Hyaluspheres).

Присоединение углеродной цепи N-Fmoc-N"-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамина к наночастицам.

См. Пример 2, пункты 1-5.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

См. Пример 2, пункты 6-10.

Конъюгирование доксорубицина с наночастицами.

11. 1 мл наночастиц, бифункционализированных Fmoc и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-10 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль)/имидазолом (1,35 ммоль) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч [фиг. 4(vi)]. Затем добавляли эквимольный раствор янтарного ангидрида (75 экв.) и DIPEA (75 экв.) и диспергировали под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C

в течение 2 ч. В заключение наночастицы промывали DMF (2×1 мл).

12. Полученные таким образом наночастицы (янтарный ангидрид-NP) активировали инкубированием с 200 мкл эквимольного раствора оксима (75 экв.) и DIC (75 экв.) в течение 4 ч при комнатной температуре при перемешивании при 1400 об/мин. Наночастицы затем центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в растворе гидразингидрата (55%-ный раствор в воде), 75 экв. в 1 мл DMF. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч.

13. После взаимодействия наночастицы промывали DMF, метанолом и PBS при pH 7,4.

14. Наночастицы (пункт 13) затем промывали PBS при pH 6 (3×1 мл) и ресуспендировали в растворе доксорубина (5 экв.) в PBS при pH 6 (1 мл). Наночастицы затем диспергировали под воздействием ультразвука и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1000 об/мин) при 50°C в течение 15 ч.

15. После взаимодействия наночастицы центрифугировали и промывали PBS pH 7,4 (2×1 мл). Наночастицы хранили в PBS pH 7,4 (1 мл) при 4°C [фиг. 4(vii)].

Конъюгирование gHyal_Sk с наночастицами.

16. После конъюгирования наночастиц с доксорубином удаляли группу Fmoc. Наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в безводном DMF (2×1 мл) [фиг. 4(viii)].

17. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в смеси этанол:вода (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилскварат, Sigma Aldrich) и полученную смесь оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч [фиг. 4(ix)].

18. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали деионизированной водой (1 мл).

19. Наночастицы (пункт 18) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг gHyal_Sk. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию затем оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч [фиг. 4(x)]. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл), затем 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 40 мМ этаноламином в буфере PBS (1 мл). Наночастицы хранили в буфере PBS 1X при pH 7 при 4°C (1 мл).

Пример 4А. Бифункционализация наночастиц gHyal_Sk и антителом против EGF-рецептора (рецептора эпидермального фактора роста).

Присоединение углеродной цепи N-Fmoc-N-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамина к наночастицам.

См. Пример 2, пункты 1-5.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

См. Пример 2, пункты 6-10.

Конъюгирование gHyal_Sk с наночастицами.

11. 1 мл наночастиц, бифункционализированных Fmoc и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-10 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль)/имидазолом (1,35 ммоль) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч [фиг. 5(vi)]. Наночастицы затем центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в смеси этанол:вода (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилскварат, Sigma Aldrich) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч [фиг. 5(vii)].

12. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали водой (1 мл).

13. Наночастицы (пункт 12) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг gHyal_Sk [фиг. 5(viii)]. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию затем оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч.

14. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл) и затем 1%-ным раствором бычьего

го сывороточного альбумина (BSA) и 40 мМ этаноламином в буфере PBS (1 мл). В заключение наночастицы хранили в буфере PBS 1X при pH 7 при 4°C (1 мл).

Конъюгирование антитела против EGF-рецептора с наночастицами.

15. После конъюгирования наночастиц с гHyal_Sk удаляли группу Fmoc. Наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в DMF (2×1 мл).

16. 1 мл наночастиц (содержание твердого вещества 2% в воде) центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука 1 мл DMF. Затем добавляли следующие растворы: (а) LC-SPDP (сукцинил-6-(3-(2-пиридилдитио)пропионамидо)гексаноат) (Thermo Scientific) 1 мг/мл в DMF (диспергированный под воздействием ультразвука), затем (б) 20 экв. DIPEA. Полученную смесь перемешивали (1400 об/мин) при 25°C в течение 12 ч. Через 12 ч добавляли 1 М раствор DTT (дитиотреitol) и полученную смесь далее инкубировали в течение 3 ч при 25°C при перемешивании (1400 об/мин).

17. После 3-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали водой (2×1 мл).

18. Затем добавляли активированное SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексано-1-карбоксилат) антитело (моноклональное антитело против EGF-рецептора, Sigma Aldrich) в концентрации 1,5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C [фиг. 5(ix)].

19. После взаимодействия с антителом наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали водой (2×1 мл). Наночастицы хранили в деионизированной воде (1 мл) при 4°C.

Характеристики полученных наносистем определяли методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуорометрии (когда они содержали флуорофор) и активность гиалуронидазы измеряли методом турбидиметрического анализа с целью выявления каких-либо любых изменений присущих им свойств, как описано в приведенных ниже примерах.

Пример 4В. Бифункционализация наночастиц гHyal_Sk и антителом против EGF-рецептора и подготовка для трифункционализации.

Присоединение углеродной цепи N-Fmoc-N-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамина к наночастицам.

См. Пример 2, пункты 1-5.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

См. Пример 2, пункты 6-10.

Конъюгирование (1R,8S,9S)-(1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил-N-сукцинимидил-карбоната (BCN-NHS) для трифункционализации.

11. 1 мл наночастиц, бифункционализированных Fmoc и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-10 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Fmoc затем селективно удаляли путем обработки 20%-ным пиперидином в DMF (2×1 мл) [фиг. 5B(vi)].

12. Наночастицы промывали DMF (2 раза) и диспергировали под воздействием ультразвука, центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин и надосадочную жидкость удаляли.

13. Готовили раствор BCN-NHS (Sigma Aldrich) (2 экв.) и DIPEA (1 экв.) в DMF [фиг. 5B(vii)].

14. Раствор (пункт 13) добавляли к наночастицам, полученным в пункте 12, и полученную смесь обрабатывали ультразвуком и оставляли взаимодействовать при перемешивании при 1400 об/мин при 25°C в течение ночи [фиг. 5B(viii)].

15. После взаимодействия (пункт 14) наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF, метанолом и водой.

Конъюгирование гHyal_Sk с наночастицами.

16. 1 мл наночастиц, бифункционализированных BCN и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-15 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль)/имидазолом (1,35 ммоль) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч. Наночастицы затем центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в смеси этанол:вода (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилсварат, Sigma Aldrich) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч [фиг. 5B(ix)].

17. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости промывали водой (1 мл).

18. Наночастицы (пункт 17) затем центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наноча-

стицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг гHyal_Sk. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию затем оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч [фиг. 5B(x)].

19. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали буфером PBS 1 X при pH 7,4 (1 мл) и затем 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 40 мМ этаноламином в буфере PBS (1 мл). В заключение, наночастицы хранили в буфере PBS 1 при pH 7 при 4°C (1 мл).

Конъюгирование антитела против EGF-рецептора с наночастицами.

20. Наночастицы, полученные в пункте 19, центрифугировали и надосадочную жидкость удаляли. В этой точке добавляли раствор ранее активированного Ac-N₃ моноклонального антитела против EGF-рецептора (Sigma Aldrich). Смесь инкубировали в течение 15 ч при перемешивании (1000 об/мин) при 25°C.

21. После взаимодействия с антителом наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали PBS (2×1 мл). Наночастицы хранили в PBS (1 мл) при 4°C [фиг. 5B(xi)].

Характеристики полученных наносистем определяли методами гель-электрофореза и проточной цитофлуорометрии в отношении связывания и специфичности антитела и методом турбидиметрического анализа в отношении активности гиалуронидазы с целью выявления любых изменений присущих им свойств согласно приведенным ниже примерам.

Пример 4C. Трифункционализация наночастиц флуорофором, гHyal_Sk и антителом против EGF-рецептора.

Присоединение углеродной цепи N-Fmoc-N"-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекан-диамин к наночастицам.

См. Пример 2, пункты 1-5.

Бифункционализация группами Fmoc и Dde.

См. Пример 2, пункты 6-10.

Конъюгирование (1R,8S,9S)-(1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил-N-сукцинимидил-карбоната (BCN-NHS) для трифункционализации.

См. Пример 4B, пункты 11-15.

16. 1 мл полистирольных наночастиц, бифункционализированных BCN и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-15 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль)/имидазолом (1,35 ммоль) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч [фиг. 5C(ix)].

17. Fmoc-Lys (Dde)-OH (GLBiochem) (75 экв.) в DMF смешивали с 75 экв. оксима (VWR) в течение 4 мин при комнатной температуре при непрерывном перемешивании (1400 об/мин). Затем добавляли 75 экв. DIC (Fluogochem) и полученную смесь перемешивали (1400 об/мин) в течение 2 мин при комнатной температуре.

18. Этот последний раствор (пункт 17) добавляли к наночастицам (пункт 16) и оставляли взаимодействовать под воздействием ультразвука и при перемешивании (1400 об/мин) при 60°C в течение 2 ч [фиг. 5C(x)].

Конъюгирование флуорофора Cy5 с наночастицами.

19. 1 мл наночастиц, трифункционализированных Fmoc и Dde, полученных, как описано в пунктах 1-18 (содержание твердого вещества 2% в воде), центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл DMF. Группу Dde затем селективно удаляли путем обработки гидроксилamina гидрохлоридом (1,80 ммоль) (Acros)/имидазолом (1,35 ммоль) (Acros) в смеси NMP:DMF (5:1) и перемешивания (1400 об/мин) при 25°C в течение 1 ч. Затем добавляли 75 экв. сульфо-NHS эфира Cy5 (Lumiprobe) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч в темноте [фиг. 5C(xi-xii)].

20. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл). В заключение наночастицы хранили в деионизированной воде (1 мл) при 4°C в темноте.

21. Конъюгирование гHyal_Sk с наночастицами.

22. После конъюгирования наночастиц с Cy5 удаляли группу Fmoc. Наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали DMF (2×1 мл). После промывок группу Fmoc удаляли с использованием 20%-ного раствора пиперидина в DMF (2×1 мл) [фиг. 5C(xiii)].

23. После удаления защитной группы наночастицы центрифугировали при 13400 об/мин в течение 6 мин, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл 1%-ного раствора N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA, Sigma Aldrich) в смеси абсолютного эта-

нола (Scharlab) и воды (1:1) (об./об.). Затем добавляли 75 экв. 3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-диона (диэтилскварат, Sigma Aldrich) и оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение 15 ч в темноте [фиг. 5C(xiv)].

24. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали деионизированной водой (1 мл). Наночастицы (пункт 22) затем снова центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы ресуспендировали в 50 мМ растворе бората натрия (1 мл), содержащем 100 мкг гHyal_Sk [фиг. 5C(xv)]. Наночастицы диспергировали под воздействием ультразвука и добавляли 1н. раствор NaOH для поддержания среды при pH 10. Конечную суспензию затем оставляли взаимодействовать при перемешивании (1400 об/мин) при 25°C в течение последующих 15 ч в темноте. После 15-часового взаимодействия наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали (1) буфером PBS 1X при pH 7,4 (1 мл), затем (2) 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) и 40 мМ этаноламином (Sigma) в буфере PBS (1 мл). В заключение, наночастицы хранили в буфере PBS 1X при pH 7 при 4°C (1 мл).

Идентичные способы могут быть использованы для связывания флуорофора Cy7 с получением аналогичного результата.

Конъюгирование антитела против EGF-рецептора с наночастицами.

25. Наночастицы, полученные в пункте 23, центрифугировали и надосадочную жидкость удаляли. В этой точке добавляли ранее активированный раствор Ac-N₃ моноклонального антитела против EGF-рецептора (Sigma Aldrich). Смесь инкубировали в течение 15 ч при перемешивании (1000 об/мин) при 25°C. После взаимодействия с антителом наночастицы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и наночастицы промывали PBS (2×1 мл). Наночастицы хранили в PBS (1 мл) при 4°C [фиг. 5C(xvi)].

Характеристики полученных наносистем определяли методом гель-электрофореза в отношении связывания с антителом и методом проточной цитофлуориметрии в отношении специфичности антитела и флуоресценции (связывание флуорофора). Активность гиалуронидазы измеряли турбидиметрическим анализом с целью выявления любых изменений присущих наносистемам свойств согласно приведенным ниже примерам.

Пример 5. Оценка ферментативной активности гHyal_Sk после функционализации наночастиц, как описано в Примере 1.

Ферментативную активность наносистемы измеряли турбидиметрическим определением, которое проводили на избытке надосадочной жидкости, выделенной на стадиях получения Примера 1, согласно нижеследующему протоколу.

Приготовление реакционных буферов.

1. Субстратный буфер (0,05%-ный раствор гиалуроновой кислоты (мас./об.)).

Готовят раствор гиалуроновой кислоты 0,5 мг/мл в 300 мМ фосфатном буфере (pH 5,35). Нагревают этот раствор до 95°C при перемешивании при 500 об/мин в течение 30 мин (время, необходимое для солиubilизации гиалуроновой кислоты). Затем раствор охлаждают до 37°C и поддерживают его температуру 37°C (до использования).

Буфер для разведения (фермента).

Фосфатный буфер (30 мМ), содержащий 0,82% хлорида натрия (pH 7,0, 37°C).

2. Раствор лошадиной сыворотки.

24 мМ ацетата натрия и 79 мМ уксусной кислоты, содержащей 30% (об./об.) лошадиной сыворотки (pH 3,75, 25°C).

А. Получение стандартной кривой.

Используемый пустой контроль получают с использованием смеси 100 мл субстратного буфера и 100 мкл буфера для разведения фермента (см. пункты 1 и 2 выше).

Раствор-хозяин получают путем добавления 4 мкл стандартной бычьей гиалуронидазы (1 единица/мл) к 196 мкл буфера для разведения фермента. Для получения кривой осуществляют шесть последовательных разведений 1:1 (об./об.).

В. Получение суспензии наносистемы (наночастицы, ковалентно конъюгированные с ферментом гHyal_sk).

10 мкл суспензии смешивают с 90 мкл буфера для разведения фермента и 100 мл субстратного буфера.

С. Инкубируют в течение 30 мин при 37°C, перемешивая при 500 об/мин.

Д. Добавляют 400 мкл раствора лошадиной сыворотки (пункт 3).

Е. Инкубируют в течение 30 мин при 37°C, перемешивая при 500 об/мин. Измеряют оптическую плотность при 640 нм.

Результаты турбидиметрического анализа демонстрируют, что фермент сохраняет активность гиалуронидазы примерно на 97%. Это подтверждает эффективность системы и демонстрирует высокую стабильность гHyal_Sk даже после связывания с наночастицами.

Пример 6. Оценка активности наносистемы, полученной в Примере 2 (гHyal_Sk и флуорофор Cy5).

Оценивали флуоресценцию и активность гиалуронидазы наносистемы Примера 2 (фиг. 6А).

1 мл суспензии наносистемы центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл воды. 5 мкл послед-

него раствора разводили в 100 мкл для исследований методом проточной цитометрии. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра FACSCanto II (Becton Dickinson & Co., NJ, USA), используя лазер возбуждения при 633 нм. Неконъюгированные наночастицы использовали в качестве отрицательного контроля. Систему конфокального лазерного микроскопа Nikon A1R+/A1+ использовали для анализа методом конфокальной микроскопии (<http://www.nikoninstruments.com/Information-Center/Confocal>). Неконъюгированные наночастицы использовали в качестве отрицательного контроля.

Данные микроскопии и проточной цитометрии демонстрируют высокий уровень флуоресценции наносистемы (фиг. 6B и C). Более того, турбидиметрические данные показывают высокий уровень активности гиалуронидазы меченых наносистем (фиг. 7). Из данных обоих типов можно сделать вывод, что два ингредиента, ковалентно связанные с одной и той же наночастицей, сохраняют их соответствующие исходные активности флуоресценции и фермента. Аналогичные данные получены с использованием наносистемы, несущей на себе gHyal_Sk и флуорофор Cy7.

Пример 7. Оценка проникновения соединений, описанных в Примере 2, в клеточных моделях *in vitro*.

Три разные модели использовали для имитации подкожного всасывания наносистем.

Модель 1: Проницаемость клеточных монослоев.

В этом исследовании тестировали наночастицы, полученные, как описано в Примере 2 (Cy5-HyaluSpheres), и в качестве контроля использовали наночастицы, конъюгированные только с флуорофором Cy5 (Cy5-FluoroSpheres). Использовали клетки, которые играют решающую роль в процессах подкожного всасывания, а именно фибробласты и эндотелиальные клетки. Фибробласты являются самыми многочисленными клетками в соединительной ткани, должным образом так называемой. Их функция заключается в продуцировании волокон и макромолекулярных составляющих внеклеточного матрикса (включая гиалуроновую кислоту). Эндотелиальные клетки составляют клеточный монослой, который выстилает кровеносные сосуды и действует в качестве селективного барьера прохождению молекул из тканей в кровь.

Эти исследования проводили в монослойных клеточных моделях для более прямого определения способности каждой использованной линии клеток захватывать наночастицы Cy5-HyaluSphere. Использовали эндотелиальные клетки HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) и фибробласты крайней плоти человека (HFF), и всасывание оценивали методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии по отображению флуорофора Cy5.

10 клеток на лунку высевали на 24 ч в 24-луночный планшет с 500 мкл среды RPMI, в которую были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотики. Клетки оставляли прикрепляться в течение 24 ч в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Культуральную среду затем аспирировали и заменяли свежей средой, содержащей наночастицы Cy5-HyaluSphere в следующих концентрациях: 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000 наночастиц на клетку. Точное количество наночастиц на клетку определяли спектрофотометрическим методом (J.D. Unciti-Broceta, et al. 2015, Scientific Reports 5, 10091). Cy5-FluoroSpheres использовали в качестве контролей для исследования.

Было определено, что при использовании концентрации 1:1000 примерно 100% клеток HUVEC интернализуют Cy5-HyaluSpheres [фиг. 8A]. В случае HFF, когда концентрация составляет 1:1000, интернализация наночастиц Cy5-HyaluSphere не наблюдается [фиг. 8B]. При увеличении концентрации наночастиц на клетку до 1:10000 только 35% клеток HFF интернализировали наночастицы Cy5-HyaluSphere [фиг. 8B]. Эти результаты имеют особое значение, поскольку они демонстрируют, что Cy5-HyaluSpheres 1) не легко интернализуются фибробластами и, следовательно, могут проходить сквозь соединительную ткань; 2) могут проникать в эндотелиальные клетки и легко поступать в кровоток.

Модель 2: Проникновение в клетки в трехмерных (3D) моделях.

В этом исследовании тестировали наночастицы, полученные, как описано в Примере 2 (Cy5-HyaluSpheres), и в качестве контроля использовали наночастицы, конъюгированные только с Cy5 (Cy5-FluoroSpheres). Использовали трехмерные (3D) клеточные модели, которые имитируют окружение подкожной ткани. Для исследования использовали гель матригель (Matrigel® Basement Membrane Matrix, Corning). Состав указанного матрикса характеризуется присутствием белков, таких как ламинин, коллаген IV, гепарансульфатные протеогликаны, гликопротеин энтактин/нидоген и различные факторы роста, такие как эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста, фактор роста фибробластов, активаторы тканевого плазминогена и другие факторы роста. Для этого исследования гиалуроновую кислоту в определенной концентрации добавляли к матригелю. Количество наночастиц, добавленных к матригелю, составляло 10000 на клетку.

Кратко, монослой эпителиальных клеток (HUVEC) в концентрации 5000 клеток на лунку высевали на монослой раствора желатина типа B (SIGMA). Матригель смешивали в соотношении 1:2 с культуральной средой и добавляли гиалуроновую кислоту в концентрации 3 мг/мл. Когда матригель становился полутвердым, на полутвердый слой матригеля добавляли наночастицы Cy5-FluoroSphere (контроль) и Cy5-HyaluSpheres в концентрации 10000 наночастиц на клетку и инкубировали в течение 24 ч (в разных лунках). Эффективность интернализации Cy5-HyaluSpheres оценивали методом конфокальной микроскопии, определяя разницу в клеточной адсорбции наночастиц после прохождения сквозь матригелевый

компонент. Только Cy5-HyaluSpheres проходят сквозь матригель и, следовательно, интернализируются клетками HUVEC, в отличие от контролей, которые не способны проходить сквозь слой матригеля и, следовательно, не интернализируются клетками HUVEC.

Модель 3: Проникновение в клетки в моделях с использованием системы Transwell.

Для оценки способности наночастиц, полученных, как описано в Примере 2 (Cy5-HyaluSpheres), проходить сквозь эндодермальный слой проводили два эксперимента на вставках для клеточных культур Transwell® (Corning). Эти вставки представляют собой устройства в виде проницаемых подложек, которые удобно использовать для создания среды для клеточных культур, очень сходной с состоянием *in vivo*.

Кратко, толстый слой эндотелиальных клеток HUVEC высевали на вставку с конфлюэнтностью 90%, чтобы имитировать эндотелиальный слой, где клетки вплотную сцеплены. После этого слой матригеля, смешанного с 3 мг/мл гиалуроновой кислоты, помещали на слой клеток (50000 клеток на лунку). Cy5-HyaluSpheres и Cy5-FluoroSpheres добавляли на слой матригеля и инкубировали в течение 72 ч. После периода инкубирования наночастицы в нижних лунках (под вставкой) собирали и количество выделенных наночастиц измеряли методом проточной цитометрии. Результаты демонстрируют, что присутствие гиалуронидазы дает возможность Cy5-HyaluSpheres проходить сквозь слой матригеля легче, чем Cy5-FluoroSpheres (фиг. 9А). Во втором эксперименте два слоя клеток HUVEC высевали во вставке (над ней и под ней) для тестирования способности Cy5-HyaluSpheres интернализироваться эндотелиальными клетками (под вставкой) после прохождения сквозь слой матригеля и первый слой клеток [фиг. 9В]. Слой матригеля, смешанный с 3 мг/мл гиалуроновой кислоты, помещали на первый слой HUVEC.

Cy5-HyaluSpheres и Cy5-FluoroSpheres добавляли на слой матригеля и инкубировали в течение 72 ч. Анализ методом конфокальной микроскопии (фиг. 9С) продемонстрировал, что Cy5-HyaluSpheres эффективно интернализируются клетками HUVEC, высеянными под вставкой, после прохождения сквозь слой матригеля с гиалуроновой кислотой и первый монослой клеток.

Пример 8. Оценка активности наносистемы, полученной, как описано в Примере 3В.

В этом исследовании оценивали активность лекарственного средства доксорубинина и гиалуронидазы, которые оба связаны с наносистемами по настоящему изобретению, полученными, как описано в Примере 3В (далее Doxo-Hyalosphere).

Цитотоксическую активность Doxo-Hyalosphere тестировали на опухолевых линиях клеток 4Т1 (рак молочной железы) и А549 (рак легкого), используя МТТ-тест *in vitro*.

Для тестирования линию клеток 4Т1 культивировали в среде RPMI (Gibco) и А549 культивировали в DMEM (Gibco). 10% FBS (фетальная бычья сыворотка, Gibco), 1% L-глутамин (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco) добавляли в обе культуральные среды при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂.

Клетки высевали в 24-луночные микропланшеты (Nunc) (50000 клеток на лунку в 500 мкл среды). Для исследования в различных условиях через 12 ч в каждую лунку добавляли 100 мкл культуральной среды, содержащей:

- 1) наночастицы с PEG (PEG-NP);
- 2) наночастицы с rHyal_Sk (Hyal-NP);
- 3) доксорубинин в растворе (Free DOX);
- 4) доксорубинин, связанный с наночастицами (DOX-NP);
- 5) Doxo-HyaluSpheres (DOX-Hyal-NP).

Концентрации наночастиц устанавливали на уровне 40000 на клетку и планшеты инкубировали в течение 24 и 96 ч. Вещества, содержащие доксорубинин, подготавливали в концентрации, эквивалентной 3 нМ лекарственного (1,6 нг/мл). Лунки промывали PBS (забуференный фосфатами физиологический раствор) и затем добавляли 100 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид [МТТ] (0,5 мг/мл в бесцветной среде). Планшеты инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 4 ч. МТТ затем удаляли и добавляли 100 мкл раствора Triton X 100, изопропанола и 37% HCl (12 М).

Метаболическую активность оценивали через 30 мин путем регистрации оптической плотности (OD) на спектрофотометре ELISA Reader (Bio-Rad) при длине волны 570 нм. Каждый образец подготавливали в трех повторях, в трех независимых экспериментах. Долю живых клеток определяли по соотношению между средней оптической плотностью обработанных образцов и средней оптической плотностью необработанного контрольного образца.

Как показывают графики на фиг. 10А и В, опухолевые клетки 4Т1, обработанные только наночастицами (PEG-NP) и наночастицами, конъюгированными с rHyal_sk и без лекарственного средства (Hyal-NP), не демонстрируют токсичность и сохраняют жизнеспособность примерно 100% (при использовании клеток, обработанных физиологическим раствором в качестве контролей). Обработка линии клеток 4Т1 свободным лекарственным средством (Free-DOX, фиг. 10А, В) не приводила к гибели клеток; однако когда такое же количество лекарственного средства, как в модели Free-DOX, связано с наносистемой, тогда его способность уничтожать 4Т1 значительно увеличивается в случае как Dox-NP, так и DOX-Hyal-NP, которые приобретают значительную цитотоксическую активность. После обработки в течение 24 ч выживаемость опухолевых клеток составляет 34%, и этот показатель падает до 10% после

обработки в течение 96 ч. Количественно идентичные результаты были получены при использовании свободного доксорубина в количестве 0,75 мкг/мл (фиг. 10А-С), т.е. при использовании намного более высокой дозы лекарственного средства. Это означает, что системы по изобретению являются исключительно эффективными и позволяют использовать доксорубин в намного более низких концентрациях, чем концентрации, известные в настоящее время.

Сходные результаты были получены с использованием опухолевой линии A549 (фиг. 11).

Ферментативную активность полученной наносистемы измеряли путем турбидиметрического определения, которое проводили согласно протоколу, описанному в Примере 5. Для исследования использовали 2×10^9 наночастиц, что соответствует активности 1 ед. гиалуронидазы. Результаты демонстрируют, что фермент сохраняет 97,5% активности гиалуронидазы. Это подтверждает эффективность системы и демонстрирует высокую стабильность гHyal_Sk, даже после процесса связывания, используемого для получения наносистем, описанных в данном документе.

Следовательно, очевидно, что две составляющие, ковалентно связанные с одной и той же наночастицей, сохраняют их соответствующую исходную противоопухолевую активность и ферментативную активность.

Пример 9. Оценка активности наносистемы, полученной, как описано в Примере 4В.

Наносистема, содержащая гHyal_Sk и антитело к рецептору EGF (Ab-HyaluSpheres), была получена, как описано в Примере 4В.

Ферментативную активность наносистемы измеряли путем турбидиметрического определения, которое проводили согласно протоколу, описанному в Примере 5. Результаты демонстрируют, что фермент сохраняет гиалуронидазную активность примерно на $98,8 \pm 2,5\%$. Это подтверждает высокую стабильность гHyal_Sk после процесса связывания, использованного для получения наносистем, как описано в Примере 4В.

Конъюгирование с моноклональным антителом против EGFR подтверждали тестированием методом электрофореза в агарозном геле (Lee J. et al., 2010, Bioconjugate Chem., 21, 940-946).

Кратко, 10 мкл образца [(8 мкл наносистем (Пример 4) и 2 мкл буфера 5x DNA Loading Buffer Blue (BioLine)] наносили на 0,8% агарозный гель и погружали в буферный раствор, состоящий из 89 мМ Tris, 89 мМ бората и 2 мМ EDTA, pH 8,0 (TBE). Образцы испытывали в течение 30 мин под напряжением 70 мВ. Гель окрашивали согласно стандартным протоколам кумасси синим в конце выполнения геле-электрофореза. Солокализация наносистем, окрашенных кумасси синим, свидетельствует о связывании наносистем с моноклональным антителом против EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).

Метод основан на неподвижности наносистем в агарозном геле. Наносистемы не способны перемещаться из лунок, тогда как свободные антитела мигрируют в направлении отрицательного электрода, так как они имеют слабый положительный заряд. Поэтому эффективность конъюгирования оценивали, анализируя сохранение антитела в лунке с гелем. Фиг. 12 показывает полученный гель, считывание которого демонстрирует эффективное конъюгирование Ab с наночастицами (линии 3-5, фиг. 12). Двумя контролями были линия 1: Ab в растворе без связывания с наночастицами; линия 2: наночастицы без Ab.

Пример 10. Оценка активности наносистемы, полученной, как описано в Примере 4С.

Наносистема, трифункционализирующая флуорофором, гHyal_Sk и антителом к рецептору EGF (Cy5-Ab-HyaluSpheres), была получена, как описано в Примере 4С.

Ферментативную активность наносистемы измеряли путем турбидиметрического определения, которое проводили согласно протоколу, описанному в Примере 5. Результаты демонстрируют, что фермент сохраняет гиалуронидазную активность примерно на $98,8\%$. Это подтверждает высокую стабильность гHyal_Sk после процесса связывания, использованного для получения наносистем, как описано в Примере 4С.

Эффективность конъюгирования антитела с наносистемой оценивали методом электрофореза в агарозном геле и окрашивания кумасси синим, как описано в Примере 9. На фиг. 13 показаны полученные результаты: линия 1 (контроль): свободное Ab; линия 2 (контроль) соответствует только наночастицам; линии 3-5: разные концентрации Ab, конъюгированного с наночастицами. Большинство интенсивных полос наблюдалось в лунках 3, 4 и 5, которые соответствуют градиенту увеличения концентраций. Полосы количественно определяли анализом изображений с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health).

Связывание флуорофора и селективность AntiEGFR-Cy5-HyaluSpheres исследовали, осуществляя мониторинг их всасывания в клетки с использованием метода проточной цитометрии. Исследование проводили путем сравнения результатов по интернализации наночастиц AntiEGFR-Cy5-HyaluSphere на опухолевых линиях клеток A549 и H520. Линия клеток A549 имеет сверхэкспрессию рецептора EGFR, а линия H520 имеет низкую экспрессию рецептора EGFR. На фиг. 14 показаны результаты проточной цитометрии. AntiEGFR-Cy5-HyaluSpheres проявляли (как и ожидалось) более высокую способность проникать в клетки A549 со сверхэкспрессией рецептора EGFR (примерно 99%) и более низкую способность проникать в линию клеток с низкой экспрессией рецептора (примерно 22%). Это свидетельствует о том, что антитело селективно ориентирует проникновение наночастиц в направлении EGFR антигена

(фиг. 14В и С). Наночастицы Су5-HyaluSpheres использовали в качестве контроля. Примеры возможных областей применения данного изобретения включают:

а) Иммунокрашивание (*in vitro*): наносистемы конъюгируют с флуорофорами и специфическими направляющими антителами и с гиалуронидазой, которая увеличивает их проникновение при добавлении в клеточные культуры. Антитела направляют наносистемы в участки молекулярного распознавания, связывания с антигеном или в участки-мишени, содержащие антиген. Этим методом указанные участки высвечиваются флуорофорами.

б) Отслеживание одиночной частицы (*in vivo*): наносистемы, конъюгированные с флуорофорами и специфическими к мембранным рецепторам связующими (антителами), связываются с ними вне клетки и делают их видимыми. Гиалуронидаза обеспечивает их поступление в кровоток при подкожном введении. Перемещения и траектории рецептора можно отслеживать по отображению меченых наносистем.

в) Направленное фармакологическое лечение, конкретно противоопухолевое лечение: в этом случае наносистема транспортирует противоопухолевое лекарственное средство. Если распознавание опухолевых клеток происходит посредством мембранных рецепторов, то антитела могут быть использованы, чтобы обеспечить направленную доставку наносистемы предпочтительно в больные клетки со сверхэкспрессией рецепторов.

Системы по изобретению особенно подходят для опухолей, характеризующихся аккумулярованием гиалуроновой кислоты в тканях. Опухоли, которые служат причиной аномального аккумулярования гиалуроновой кислоты, которая посредством компрессии окружающих сосудов препятствует или по меньшей мере замедляет транспорт введенных лекарственных средств в сайт-мишень, особенно поражают такие органы, как молочная железа, поджелудочная железа, ободочная кишка и предстательная железа. Избыток аккумулярованной гиалуроновой кислоты также снабжает опухоль превосходным ростовым субстратом. В таких ситуациях важно иметь систему, которая доставляет лекарственное средство и одновременно дает ему возможность действовать в полной мере за счет устранения основного механического и биологического препятствия. При распознавании опухолевых клеток гиалуронидаза увеличивает их проницаемость, разрушая слои гиалуроновой кислоты, защищающие опухолевую среду. После прохождения сквозь слой гиалуроновой кислоты наносистемы высвобождают противоопухолевое лекарственное средство, которое действует более эффективно. В этом виде применения наносистема действует в качестве направляющего носителя, обеспечивающего селективное действие противоопухолевого лекарственного средства. Более того, присутствие гиалуронидазы позволяет осуществлять подкожное введение.

Следовательно, наносистемы, описанные в данном документе, дают преимущества в том, что они являются инертными, биосовместимыми и легко могут быть синтезированы и могут быть функционализированы молекулой любого типа. Они также сохраняют исходные свойства молекул, связанных с ними, и, в случае некоторых молекул, обеспечивают альтернативы используемым традиционным путям введения.

Следовательно, наносистемы по изобретению представляют собой мультипотентные, гибкие, воспроизводимые, легко масштабируемые системы, которые могут быть использованы в качестве переносчиков в диагностических, прогностических и терапевтических целях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система наночастиц для контролируемого транспорта активных молекул диагностического, прогностического и терапевтического назначения, содержащая полимерные наночастицы, состоящие из синтетического полимера, связанного с гетероуглеродной цепью ковалентными связями между функциональными группами, присутствующими на полимере, и функциональными группами, присутствующими на указанной гетероуглеродной цепи, гиалуронидазы и одной или более активных молекул, ковалентно связанных с указанной гетероуглеродной цепью, где

наночастицы имеют размер в диапазоне от 50 до 200 нм;

синтетический полимер представляет собой полистирол;

гетероуглеродная цепь выбрана из полиэтиленгликолевых цепей;

активные молекулы выбраны из доксорубина, флуорофоров и антитела.

2. Система наночастиц по п.1, где функциональные группы, присутствующие на полимере, выбраны из первичных или третичных аминов, эпоксидов и карбоксилатов, предпочтительно первичных или третичных аминов.

3. Система наночастиц по любому из пп.1 или 2, где наночастицы имеют размер 200 нм.

4. Система наночастиц по п.1, где фермент гиалуронидаза является ферментом человеческого, животного, растительного, бактериального или рекомбинантного происхождения, предпочтительно является рекомбинантным.

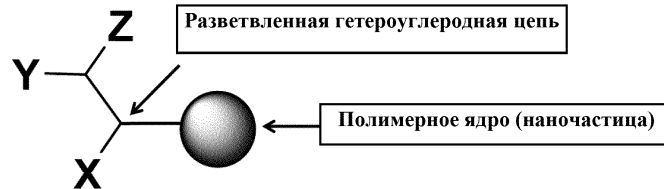
5. Система наночастиц по п.1, где гетероуглеродная цепь представляет собой N-Фмос-N-сукцинил-4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин.

6. Система наночастиц по п.1, где функциональные группы гетероуглеродной цепи выбраны из глутаральдегида, малеимида, активных сложных эфиров, дисульфидных групп и квадратной кислоты.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая системы наночастиц по любому из пп.1-6 в смеси с фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

8. Фармацевтическая композиция по п.7 в лиофилизированной форме для разведения или в форме суспензии или геля.

9. Фармацевтическая композиция по п.7 для подкожного, интрадермального, интратекального, внутримышечного, интраперитонеального, внутривенного, внутриартериального, трансдермального, чрескожного, трансмукозального или ингаляционного введения, предпочтительно подкожного, интрадермального, чрескожного, трансдермального, трансмукозального или внутримышечного введения или введения ингаляцией.

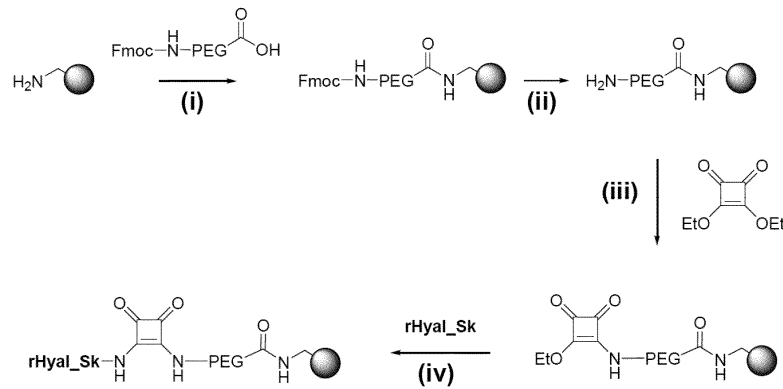


X = ингредиент фермент (гиалуронидаза)

Y и Z = заместители/вариабельные группы

Фиг. 1

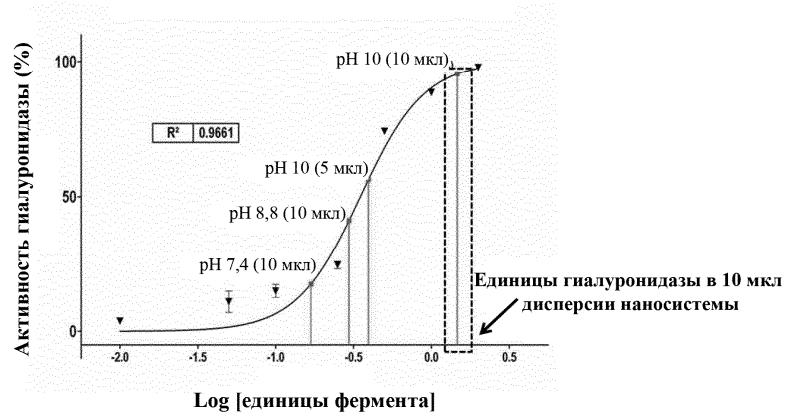
Типичная схема ковалентного связывания rHyal_Sk с полистирольными наночастицами



Фиг. 2

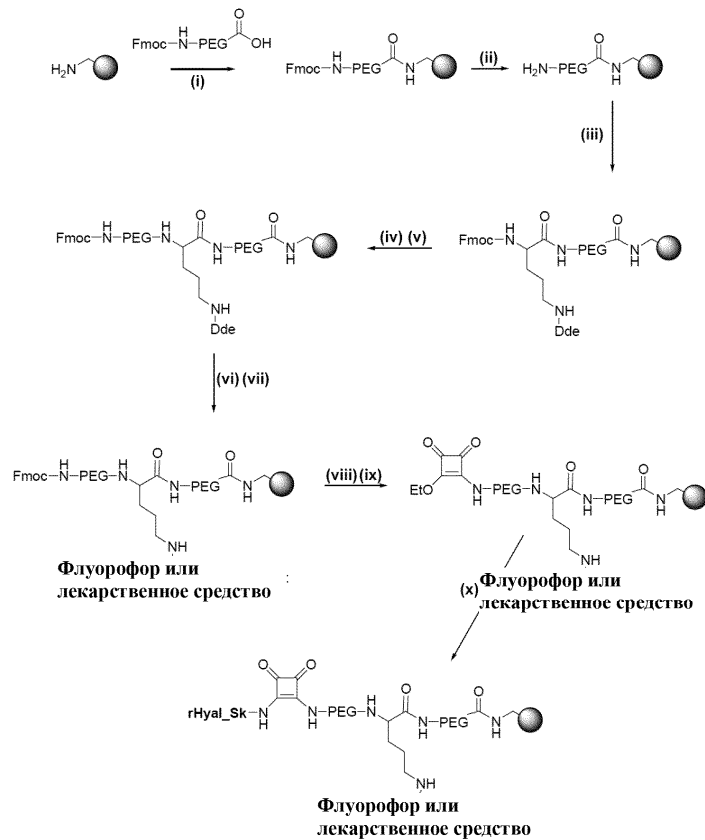
Ферментативная активность rHyal_Sk, ковалентно связанной с наночастицами (турбидиметрический анализ)

Нелинейная кривая % активности гиалуронидазы/Log [единицы фермента]: интерполированные значения X



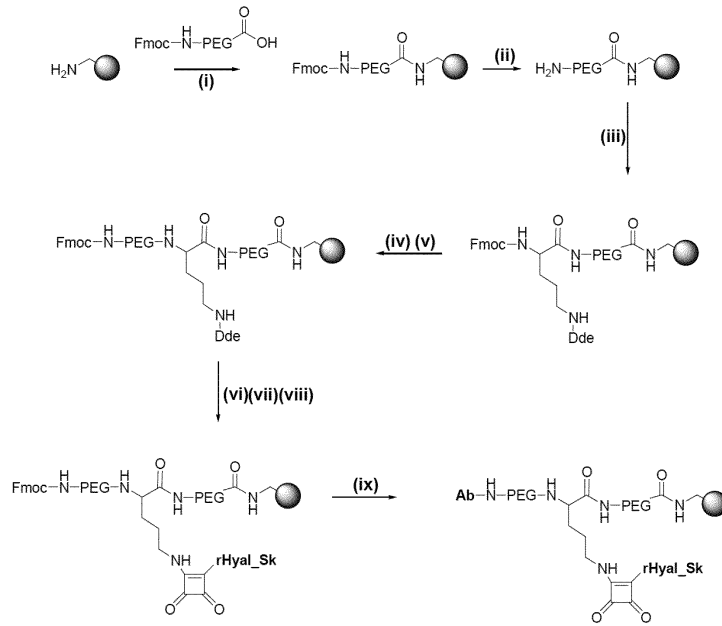
Фиг. 3

Ковалентная бифункционализация наночастиц rHyal_Sk и флуорофором или лекарственным средством

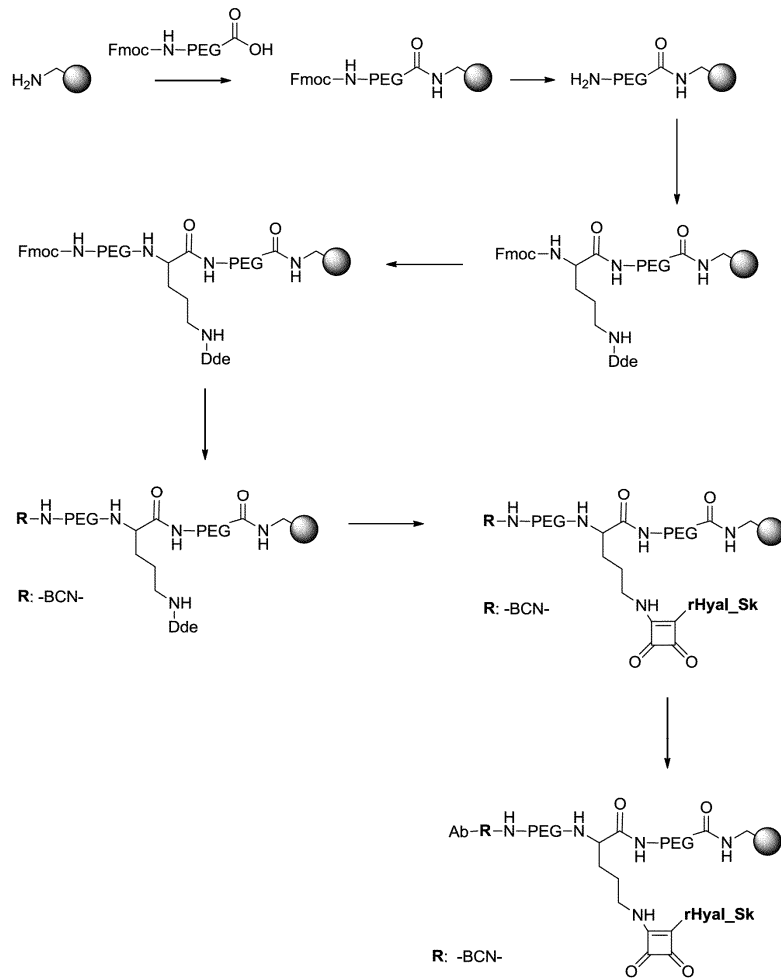


Фиг. 4

Ковалентная бифункционализация наночастиц rHyal_Sk и антителом (Ab)

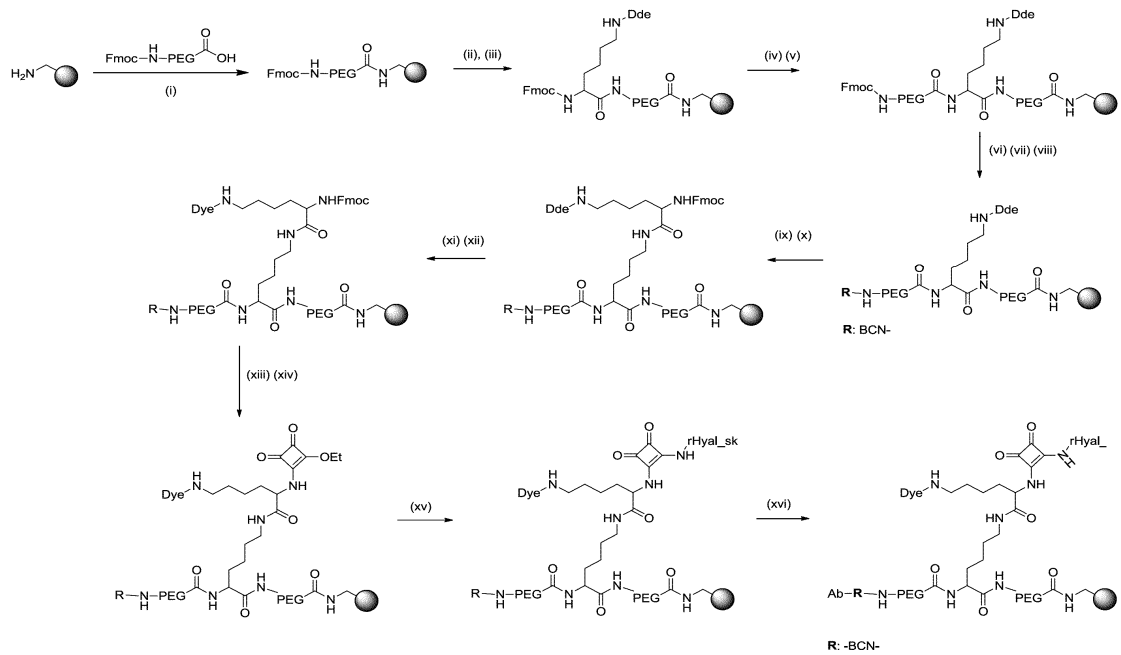


Фиг. 5А

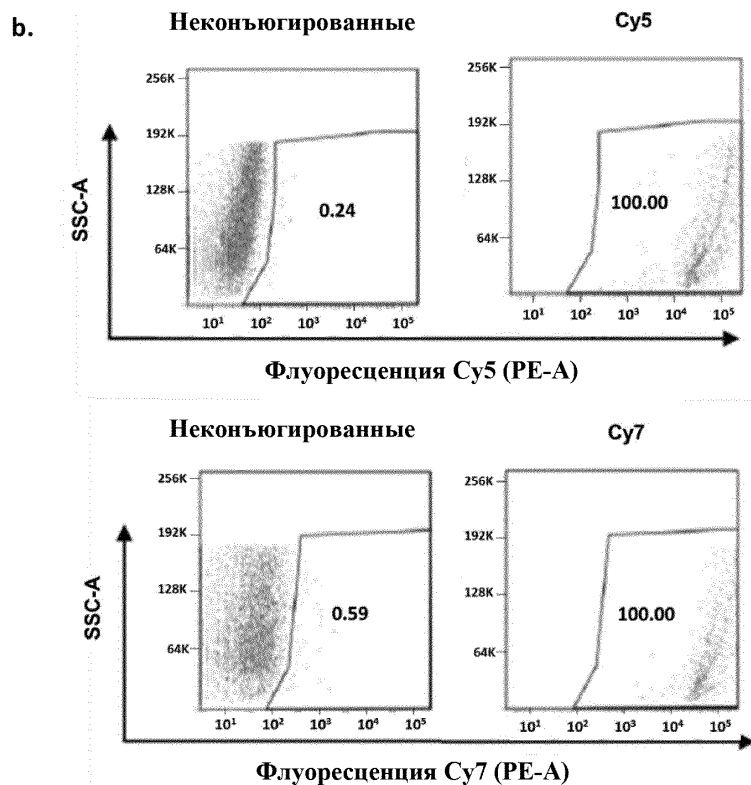
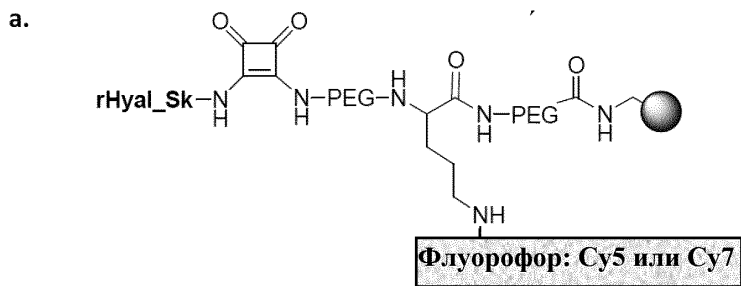


Фиг. 5В

038631

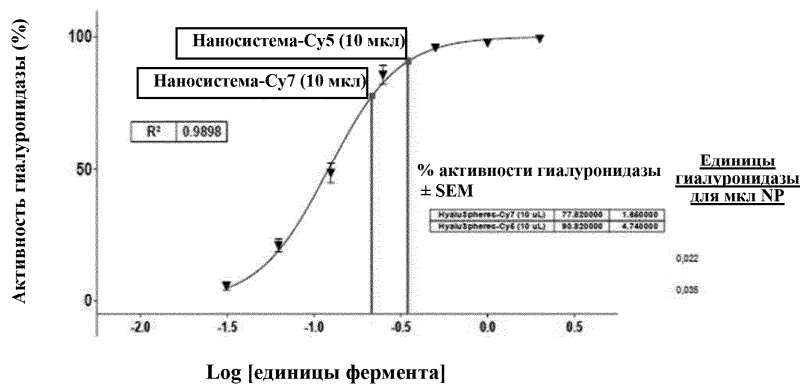


Фиг. 5С



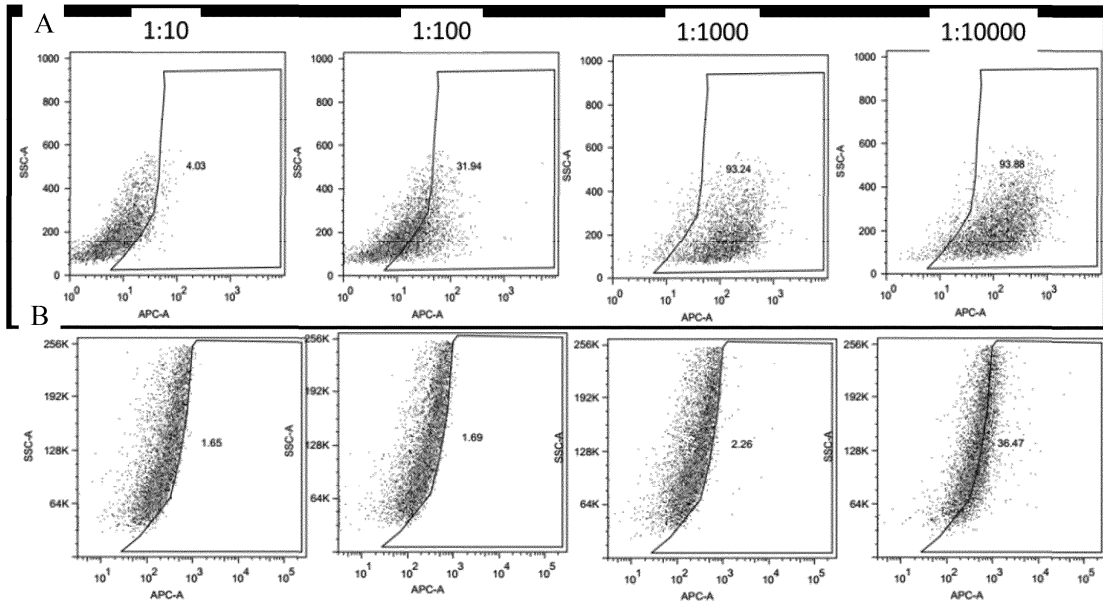
Фиг. 6

Нелинейная кривая % активности гиалуронидазы/Log [единицы фермента]: интерполированные значения X

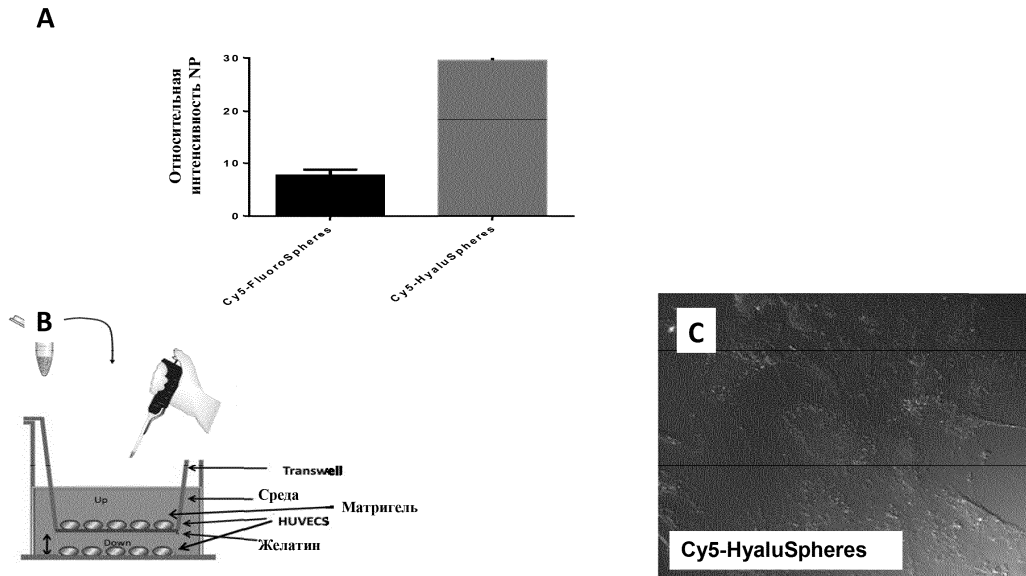


(NP – наночастица)

Фиг. 7



Фиг. 8



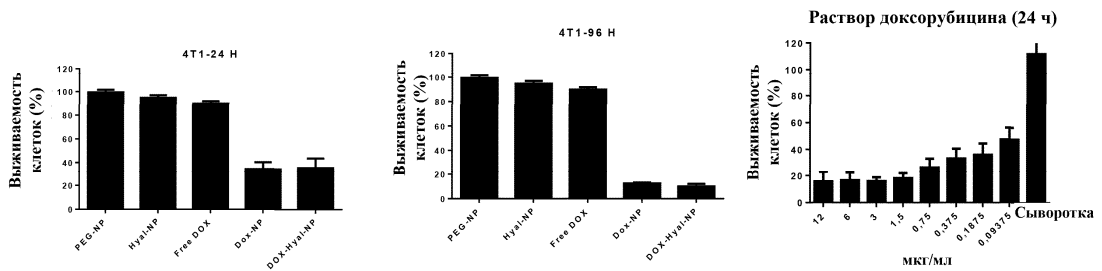
Фиг. 9

4T1

А. 24 часа

В 96 часов

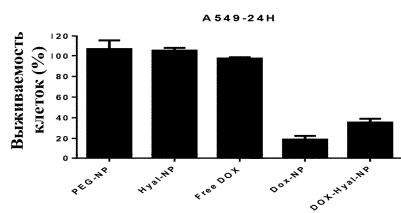
С



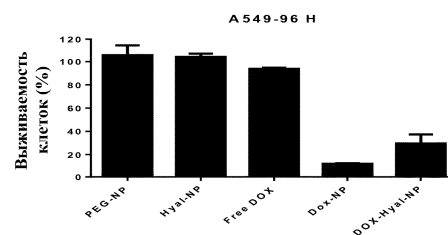
Фиг. 10

A549

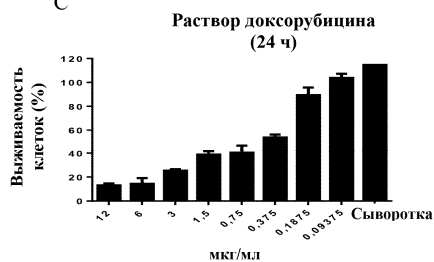
А. 24 ч



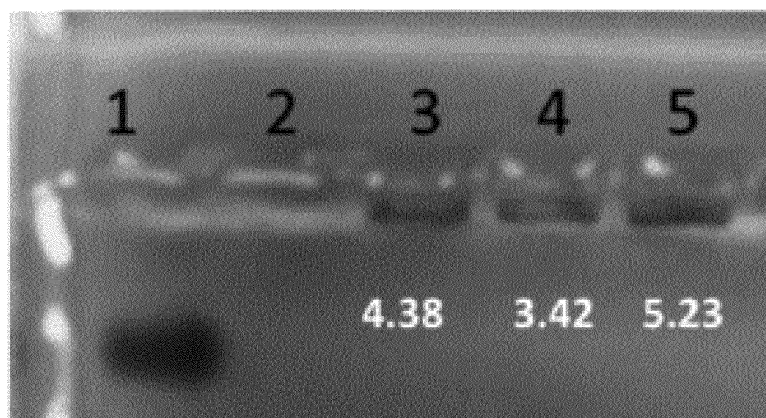
В. 96 ч



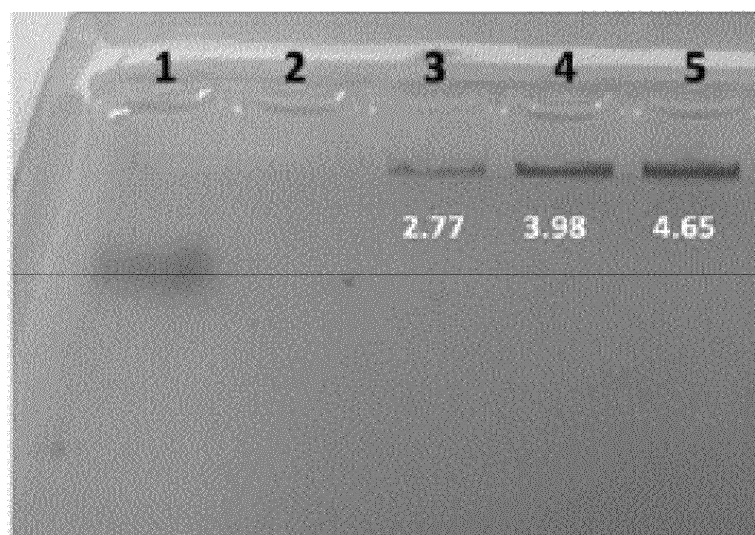
С



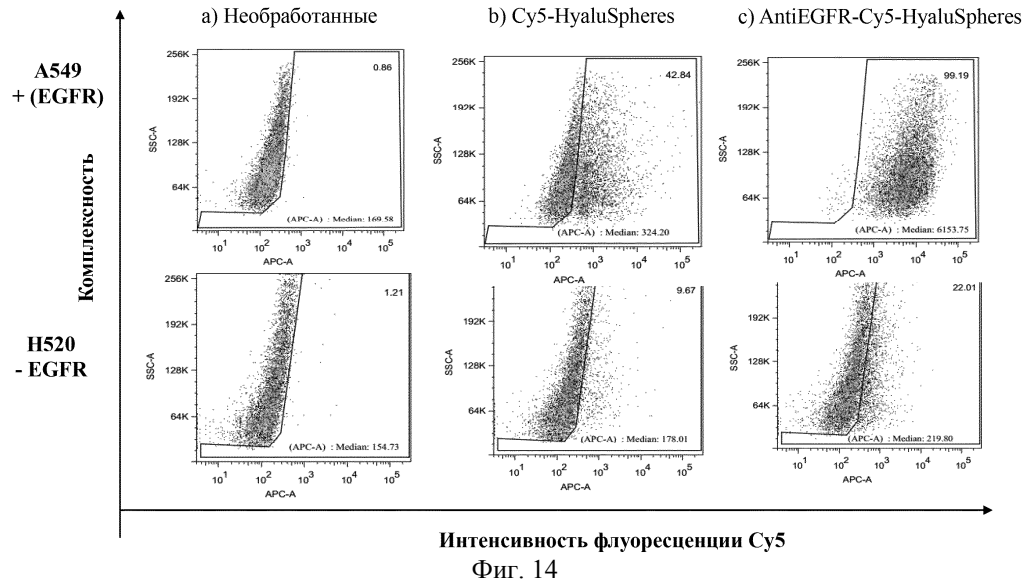
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

