

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038657**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.29

(21) Номер заявки
201900220

(22) Дата подачи заявки
2016.10.12

(51) Int. Cl. **A61K 9/16** (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)

(54) **ХИМИОЭМБОЛИЗИРУЮЩИЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

(43) **2019.09.30**

(86) **РСТ/RU2016/000694**

(87) **WO 2018/070894 2018.04.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ" (RU)**

(56) EP-A1-2926806
US-A1-7442385
WO-A1-2015174763
US-A1-20090117196
US-A1-20120141379
US-A1-20050106119

(72) Изобретатель:

**Лозинский Владимир Иосифович,
Рябев Андрей Николаевич, Иванов
Роман Викторович, Хитрин Кирилл
Сергеевич (RU)**

(57) Изобретение относится к фармацевтике и медицине и касается частиц для химиоэмболизации, характеризующихся тем, что их трехмерная полимерная сетка представляет собой криогель, включающий в себя поливиниловый спирт, сульфосодержащий гликозаминогликан и противоопухолевый агент, при этом массовое соотношение поливинилового спирта и сульфосодержащего гликозаминогликана составляет от 3:1 до 50:1. Частицы характеризуются высокой биосовместимостью, сорбционной емкостью, возможностью сорбции противоопухолевого агента после получения готовых частиц и простой технологией получения. Полученные по изобретению частицы могут применяться для лечения солидных опухолей.

B1

038657

038657

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к фармацевтике и медицине, более конкретно - к химиоэмболизирующим частицам, способу их получения и к их применению для лечения солидных опухолей.

Уровень техники

Химиоэмболизация как метод лечения некоторых видов солидных опухолей и их метастаз применяется более двух десятилетий. Первые препараты для химиоэмболизации разрешены к применению в России с 2003 года.

До настоящего времени в мире наиболее широко использовались микросферы Contour из поливинилового спирта (ПВС) от Target Corp. (США), и Ivalon от Laboratoire Ingenor (Франция). Недостаток коммерчески доступных микросфер из ПВС состоит в трудности получения однородных частиц и в их низкой абсорбционной способности.

Из EP 1263803 B1, EP 1592405 B1 и EP 1985286 A1 известны эмболизирующие микросферы из ПВС с добавлением различных сополимеров. При получении этих микросфер используют токсичные растворители, в связи с чем необходимо очищать производственные стоки от растворителя и требуется организовывать контроль остаточного содержания растворителя в готовом продукте. Кроме того, гранулометрический состав получаемых частиц далек от оптимального, в связи с чем выход целевой фракции невелик.

Из публикации международной заявки № 2004071495 A1 известны химиоэмболизирующие частицы на основе поливинилового спирта (ПВС), содержащие доксорубин. Поскольку адсорбционная способность поверхности микросфер из ПВС слишком мала, в известном решении пытаются обойти этот недостаток посредством встраивания доксорубина непосредственно в полимерную матрицу в процессе кросс-сшивки. Это не только усложняет технологию получения частиц, но и существенно изменяет фармакокинетические показатели доксорубина. Ввиду большой чувствительности такого способа к изменению условий технологического процесса очень трудно получить частицы с хорошо воспроизводимым в каждой партии содержанием доксорубина.

Известны попытки найти альтернативу микросферам из ПВС. В частности, в заявке США № 20150224221 A1 описана попытка улучшить однородность микросфер за счет замены ПВС другими известными полимерами, среди которых предлагаются: (1) хорошо известные синтетические биосовместимые полимеры (такие как полиэтиленгликоль, поли(L-молочная кислота), поли(D,L-молочная кислота), полигликолевая кислота, поликапролактон, сополимер молочной и полигликолевой кислоты, сополимер молочной кислоты и капролактона, сополимер гликолевой кислоты и капролактона и др.); (2) гликозаминогликаны, выделенные из природных источников, в том числе сульфосодержащие (хондроитинсульфат, дерматансульфат, гепарин, кератансульфат и др.); а также (3) полусинтетические, т.е. химически модифицированные биополимеры, включая целлюлозы сульфат.

Эмболизирующие частицы из биополимеров (хитозана и хитина) также известны из международной публикации 2003013552 A1 (см. также корейский патент № 10-1157260) и множества других.

Однако известные частицы, не содержащие ПВС, а состоящие только из одного полимера (только из синтетических полимеров или только из биополимеров), либо обладают недостаточной емкостью в отношении противоопухолевых агентов (что характерно для синтетических полимеров, как правило, в силу того, что их поверхность или слишком мала, или лиофобна, или имеет недостаточный отрицательный заряд при физиологических значениях pH), либо имеют неудовлетворительные механические, и/или технологические свойства, и/или воспроизводимость свойств (что характерно для биополимеров, свойства которых могут сильно варьировать в зависимости от исходного сырья).

Известны также комбинированные частицы, полученные из полимеров разного типа, в том числе содержащие ПВС. В частности, из публикации китайской заявки № 105148327 A известны микросферы для эмболизации из ПВС и полисахаридов (хитозана, амилопектина, карбоксиметилцеллюлозы). Технология получения этих микросфер очень сложна и предусматривает на первом этапе приготовление раствора смеси ПВС и полисахарида в массовом соотношении компонентов 1:0,001-0,333. Далее этот раствор делят на две неравные части, к большей из которых прибавляют ПАВ и эмульгируют водную фазу в парафиновом масле, затем вводят химический сшивающий агент и нагревают при перемешивании. После этого к реакционной системе прибавляют оставшуюся часть исходного раствора полимеров для дополнительного покрытия ими уже образовавшихся частиц. По окончании этой стадии суспензию выливают в избыток изопропанола, полученный осадок частиц промывают изопропанолом и затем этанолом. Промытые таким образом гранулы сушат при 50-60°C, после чего рассеивают на фракции по размеру частиц. Возможность применения этих частиц для доставки противоопухолевых агентов в указанной публикации даже не предполагается, что легко объяснимо, т.к. использованные биополимеры не придают частицам дополнительный отрицательный заряд, необходимый для улучшения сорбции.

Таким образом, все еще существует потребность в создании эмболизирующих частиц, которые обладали бы способностью хорошо сорбировать противоопухолевый агент и были бы свободны от недостатков известных частиц, упомянутых выше.

Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является создание химиоэмболизирующих частиц, обладающих совокупностью следующих качеств:

- А) биосовместимостью;
- Б) высокой сорбционной емкостью;
- Г) возможностью сорбции противоопухолевого агента после получения готовых частиц;
- Д) простой технологией получения.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к частицам для химиоэмболизации, включающим в себя следующие компоненты:

- (а) поливиниловый спирт;
- (б) сульфосодержащий гликозаминогликан;
- (в) противоопухолевый агент, при этом массовое соотношение компонентов (а) и (б) составляет 3-50:1.

Далее вышеупомянутые частицы, охарактеризованные в самых общих категориях, поясняются на примере некоторых особенно предпочтительных форм выполнения, обеспечивающих получение дополнительных преимуществ.

В одной из предпочтительных форм выполнения трехмерная полимерная сетка упомянутых частиц представляет собой криогель поливинилового спирта. Неожиданно было обнаружено, что объединение криогеля поливинилового спирта с сульфатированными гликозаминогликанами позволило повысить способность частиц сорбировать малорастворимые противоопухолевые агенты.

В еще одной предпочтительной форме выполнения вышеупомянутый сульфосодержащий гликозаминогликан выбран из группы, включающей хондроитинсульфат натрия, дерматансульфат и гепарансульфат.

В другой предпочтительной форме выполнения частицы имеют, по существу, сферическую форму.

В одной из предпочтительных форм выполнения частицы имеют размеры от 50 до 1000 мкм.

В еще одной предпочтительной форме выполнения содержание противоопухолевого агента в частицах составляет, самое большее, 45 мас. %.

В другой предпочтительной форме выполнения противоопухолевый агент представляет собой химическое вещество, предпочтительно выбранное из группы, включающей гемцитабин, доксорубицин, иринотекан и мелфалан или их фармацевтически приемлемые соли.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения вышеупомянутых частиц, который характеризуется тем, что в нем:

(1) получают водный раствор компонентов (а) и (б);

(2) замораживают раствор, полученный на стадии (1), при (-6)-(-30)°С в виде капель посредством криогранулирующего устройства;

(3) выдерживают замороженные частицы, полученные на стадии (2), 12-72 ч при (-5)-(-2)°С;

(4) замороженные частицы высушивают лиофильно с получением сухих частиц,

(5) фракционируют частицы, полученные на стадии (4) по размерам; и

(6) насыщают противоопухолевым агентом частицы, полученные на стадии (5).

В одном из вариантов осуществления способ согласно настоящему изобретению включает в себя стадию радиационной стерилизации.

В другом варианте осуществления способа согласно настоящему изобретению сухие частицы, полученные на стадии (5), насыщают противоопухолевым агентом посредством обработки раствором противоопухолевого агента, после чего частицы отделяют и высушивают.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению вышеупомянутых частиц для химиоэмболизации солидных опухолей.

Вышеупомянутые солидные опухоли предпочтительно выбраны из группы, включающей в себя первичный и вторичный рак печени, злокачественные новообразования поджелудочной железы, злокачественные новообразования почки, злокачественные новообразования шейки и тела матки, злокачественные новообразования предстательной железы.

В одном из вариантов применения перед введением в кровеносный сосуд человека частицы суспендируют в растворе.

В одном из предпочтительных вариантов применения упомянутый раствор дополнительно включает в себя контрастное вещество.

Получение и применение частиц по изобретению иллюстрируется на фиг. 1-3 на примере частных и конкретных вариантов воплощения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приводятся микрофотографии фракций ненагруженных частиц размером 45-55 мкм (а), 480-520 мкм (б) и 950-1050 мкм (в);

на фиг. 2 - микрофотографии фракций частиц, нагруженных доксорубицином, размером 45-55 мкм (а), 480-520 мкм (б) и 950-1050 мкм (в) частиц;

на фиг. 3 - кинетическая кривая высвобождения доксорубицина из частиц в водном растворе 0,9% NaCl. По оси абсцисс - степень высвобождения доксорубицина из частиц, %. Ось ординат - время, ч.

Осуществление изобретения

Ниже приводится типичный пример реализации изобретения, который иллюстрирует, но не ограни-

чивает его объем.

Пример 1. Получение химиоэмболизирующих частиц (на примере частиц с доксорубицином).

Стадия 1. Получение частиц.

Готовят водный раствор ПВС марки PVA 28-99 Emprove® exp JPE (Merck KGaA, Германия). В полученном растворе растворяют хондроитинсульфат натрия (ХСН) (партия № 15/0022; BIOBERICA S.A., Испания) в массовом соотношении ПВС:ХСН 5:1. Полученный раствор посредством криогранулирующего устройства, описанного в патенте РФ на изобретение № 2104866, замораживают при -15°C в виде мелких капель, выдерживают замороженные гранулы 24 ч при -3°C , после чего лиофильно высушивают на лиофилизаторе ALPHA 1-2 LD plus (Martin Christ, Германия). Сухие частицы фракционируют по размерам с использованием рассеивающей машины SLS 200 (Seibtechnik, Германия). Размер частиц в полученных фракциях частиц определяют с помощью светового стереомикроскопа SMZ1000 (Nikon, Япония). Изображения полученных частиц приводятся на фиг. 1.

Стадия 2. Насыщение частиц противоопухолевым агентом.

Водно-этанольный раствор доксорубицина гидрохлорида (ДРГ) (партия № 7000AO02413, Sicor, Teva API Division, Италия) с концентрацией 5 мас.% добавляют к фракции 480-520 мкм сухих частиц, полученных на стадии 1, инкубируют 3 ч при перемешивании, надосадочную жидкость отделяют, а частицы высушивают в вакууме при 10-20 мм рт.ст. Изображение полученных частиц, нагруженных доксорубицином, приводится на фиг. 2.

Стадия 3. Стерилизация частиц.

Стерилизацию частиц, полученных на стадии 2, проводят на промышленной установке радиационной стерилизации (МРТИ РАН, Россия). Установка состоит из линейного сверхвысокочастотного ускорителя электронов, транспортной системы с подвесным непрерывным конвейером и автоматизированной системы управления.

Радиационную обработку осуществляют пучком электронов. Облучение - двухстороннее за два прохода конвейера. Доза облучения - 15 кГр (килоГрей).

Пример 2. Содержание доксорубицина в химиоэмболизирующих частицах и кинетика его высвобождения.

Определение содержания доксорубицина с помощью спектрофотометрии и кинетики высвобождения доксорубицина (см. фиг. 3) показывает, что полученные в примере 1 частицы содержат около 35 мас.% доксорубицина в сухом веществе и обеспечивают длительное высвобождение доксорубицина в физиологический раствор. В частности, в условиях эксперимента в первые 6 ч выделяется до 50%, а за месяц - не более 80% доксорубицина, содержащегося в частицах.

Пример 3. Химиоэмболизирующая способность частиц в отношении гепатоцеллюлярного рака.

Химиоэмболизирующую способность частиц исследовали на модели гепатоцеллюлярного рака РС-1, трансплантированного в мышцу бедра в зоне кровоснабжения бедренной артерии у крыс. Терапию проводили при развивавшихся опухолях, достигших среднего объема (V_{cp}) около $4,5 \text{ см}^3$, посредством внутриартериального введения полученных по методике примера 1 частиц размером 200-300 мкм, нагруженных доксорубицином. В качестве положительного контроля использовали доксорубицин, вводимый внутривенно животным в соответствующей дозе. Частицы вводили в таком объеме, чтобы кумулятивная доза соответствовала дозе положительного контроля.

Гистологическая картина внутримышечно трансплантированного РС-1 была идентична во всех группах. Опухоль имела строение гепатоцеллюлярного рака.

Анализ срезов по степени лечебного патоморфоза опухоли показал следующее: без лечения число клеток внутримышечно имплантированного РС-1 с митозами составляет 3-5% в поле зрения, число клеток с признаками апоптоза достигал 0,2-0,5%, а площадь некроза - 8-10%. В группе с химиоэмболизацией бедренной артерии частицами число клеток в митозе было уменьшено до 2-4%, число клеток с признаками апоптоза возросло до 0,3-0,7%, а площадь некроза - до 10-12%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при опухоли объемом более 4,0 см частицы, нагруженные доксорубицином, в относительно невысокой кумулятивной дозе 10,5 мг/кг позволяют создать локальную концентрацию цитостатика, реализующую значимое достоверное ингибирование роста опухоли более 70% ($T/C=33\%$, $p=0,00004$) с развитием лечебного патоморфоза 1 степени и единичной регрессией на уровне стабилизации.

Пример 4. Химиоэмболизирующая способность частиц в отношении опухоли печени VX2.

Трансартериальную химиоэмболизацию используют для лечения нерезектабельной гепатоцеллюлярной карциномы. Применение частиц, способных загружать, транспортировать и высвобождать противоопухолевые агенты непосредственно в опухолевую ткань, улучшает результаты традиционной терапии, создавая более высокую концентрацию противоопухолевого агента в толще опухоли и уменьшая выраженность их побочных эффектов ввиду отсутствия системного воздействия противоопухолевых агентов на организм и снижения повреждения функций печени в процессе лечения.

Внутрипеченочную имплантацию осуществляют введением кусочка солидной опухоли VX2 под капсулу левой латеральной доли печени кроликов. На протяжении всего эксперимента проводят ежедневное взвешивание животных и оценку гематологических показателей. Через 7 суток после импланта-

ции опухоли у кроликов развивается ассоциированный лейкоз, что свидетельствует об успешной перевивке опухоли. Размеры опухоли оценивают с помощью компьютерной томографии. Средние размеры опухоли на 14 сутки после имплантации составляют $13,0 \pm 2,3$ мм, на 21 сутки - $31,5 \pm 13,6$ мм.

Химиоэмболизацию артерии печени, питающей сформировавшийся опухолевый узел, проводят на 14 день частицами размером 200-300 мкм, полученными согласно примеру 1 и нагруженными доксорубицином. Доступ осуществляют посредством катетера, введенного в сонную артерию кролика под прямым контролем доступа к печеночной артерии. Результаты экспериментов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Объем опухолевого узла VX2 (мм³) под действием химиоэмболизации частицами

Группа	Сутки после лечения		Т/С, %	ТРО
	0	14		
Группа без лечения (n=6)	12000±1500	47500±21400		
Частицы, нагруженные доксорубицином (n=6)	14000±2300	8300±2700*	17,5	82,5

* достоверные отличия от группы с ненагруженными частицами (по критерию t-Стьюдента).

Как следует из данных, представленных выше, в результате однократной внутриартериальной химиоэмболизации нагруженными частицами (наблюдается почти шестикратная задержка роста по площади и торможение роста опухоли ТРО = 82,5%).

Таким образом, предложенные химиоэмболизирующие частицы достоверно замедляют рост опухоли с развитием единичной регрессии на уровне стабилизации роста опухоли.

Аналогично вышеописанным примерам получали и испытывали другие частицы, нагруженные противоопухолевыми агентами. Их состав и свойства приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Состав и свойства химиоэмболизирующих частиц по изобретению

№ примера	Состав частиц*				Условия процесса получения частиц			Терапевтический эффект
	СГГ	Массовое соотношение ПВС: СГГ	ПЛС		Т-ра замораживания исходного раствора, °С	Т-ра выдерживания замороженных частиц, °С	Продолжительность выдерживания замороженных частиц, ч	Торможение роста опухоли (ТРО)
			обозначение	количество, мас. %				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	С	5 : 1	II	34,4	-15	-3	24	82,5
2	С	3 : 1	II	45	-6	-2	24	92,0
3	В	20 : 1	I	23	-20	-3	36	46,5
4	С	35 : 1	III	17	-25	-4	48	69,0
5	А	50 : 1	IV	5	-30	-5	72	38,5

Примечание к табл. 2. Противоопухолевое лекарственное средство (ПЛС): I - гемцитабин гидрохлорид; II - доксорубин гидрохлорид; III - иринотекан гидрохлорида тригидрат; IV - мелфалан. Сульфосодержащий гликозаминогликан (СГГ): А - гепарансульфат; В - дерматансульфат; С - хондроитинсульфат натрия.

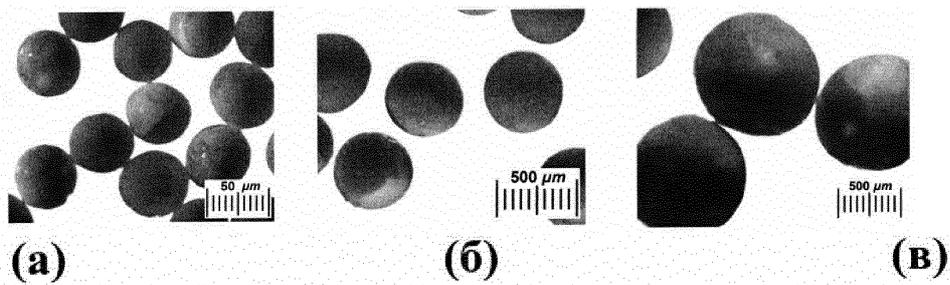
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Частицы для химиоэмболизации, характеризующиеся тем, что их трехмерная полимерная сетка представляет собой криогель, включающие в себя поливиниловый спирт, сульфосодержащий гликозаминогликан и противоопухолевый агент, при этом массовое соотношение поливинилового спирта и сульфосодержащего гликозаминогликана составляет от 3:1 до 50:1.

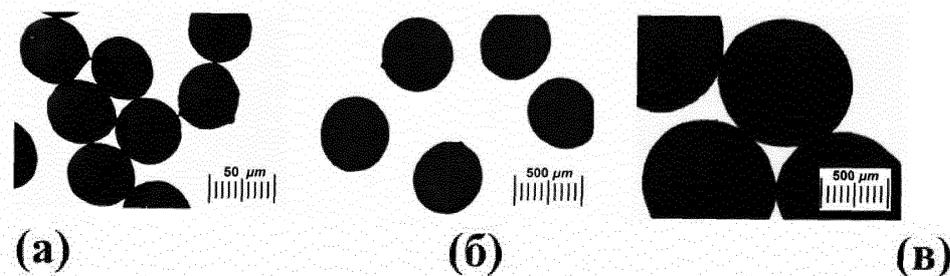
2. Частицы по п.1, характеризующиеся тем, что в них вышеупомянутый сульфосодержащий гликозаминогликан выбран из группы, включающей хондроитинсульфат натрия, дерматансульфат и гепарансульфат.

3. Частицы по п.1, характеризующиеся тем, что они имеют, по существу, сферическую форму и размеры от 50 до 1000 мкм.

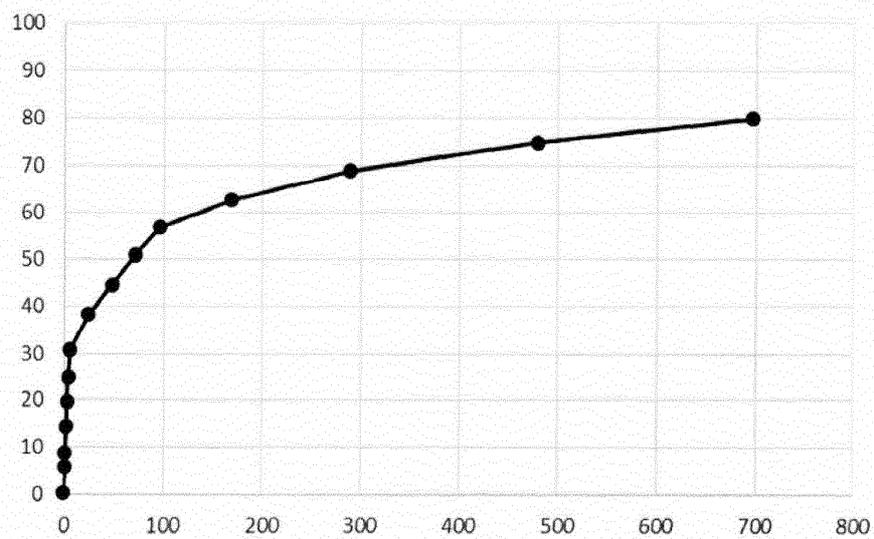
4. Частицы по п.1, характеризующиеся тем, что в них противоопухолевый агент представляет собой химическое вещество, выбранное из группы, включающей гемцитабин, доксорубин, иринотекан и мелфалан или их фармацевтически приемлемые соли, причем содержание противоопухолевого агента составляет по большей мере 45 мас. %.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3