

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038671**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.01

(21) Номер заявки
201592279

(22) Дата подачи заявки
2014.05.30

(51) Int. Cl. **A61K 9/51** (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ИЛИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕГО ИНТЕРЕС ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ

(31) **13305712.5; 61/828,794**

(32) **2013.05.30**

(33) **EP; US**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/EP2014/061296**

(87) **WO 2014/191569 2014.12.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЮРАДИГМ САС (FR)

(72) Изобретатель:
**Поттье Аньес, Леви Лоран, Мейер
Мари-Эдит, Дармон Одри, Жермэн
Маттье (FR)**

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

(56) **WO-A2-2012104275**
WO-A1-2005063305
WO-A2-2007116954
WO-A2-2009081287
WO-A1-2011151631
WO-A2-2010048623
WO-A1-2009142754
US-A-4280918

BOWEN P: "Particle Size Distribution Measurement from Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets", JOURNAL OF DISPERSION SCIENCE AND TECHNOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 5, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 631-662, XP009102859, ISSN: 0193-2691, DOI: 10.1081/DIS-120015368 the whole document

(57) Изобретение касается способа повышения терапевтической или профилактической эффективности представляющего интерес фармацевтического соединения за счет последовательного введения биосовместимых наночастиц, каждая из которых имеет наибольший размер между приблизительно 100 нм и приблизительно 500 нм и отрицательное значение поверхностного заряда ниже -20 мВ, и представляющего интерес фармацевтического соединения, которое представляет собой цитотоксическое соединение или олигонуклеотид, инкапсулированные в носителе, где указанные наночастицы вводятся субъекту между более чем 5 мин и приблизительно 24 ч до представляющего интерес фармацевтического соединения, где наночастица представляет собой наночастицу на основе липидов, или наночастицу на основе полимера, или наночастицу на основе сополимера, где наночастицу и соединение, представляющее интерес, можно вводить указанному субъекту друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч.

B1**038671****038671****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение касается способа повышения терапевтической или профилактической эффективности представляющего интерес фармацевтического соединения за счет введения субъекту последовательно: биосовместимых наночастиц, каждая из которых имеет наибольший размер между приблизительно 100 нм и приблизительно 500 нм и отрицательное значение поверхностного заряда ниже -20 мВ и представляющего интерес фармацевтического соединения, которое представляет собой цитотоксическое соединение или олигонуклеотид, инкапсулированные в носителе и, где указанные наночастицы вводятся субъекту между более чем 5 минутами и приблизительно 24 ч до представляющего интерес фармацевтического соединения, где наночастица представляет собой наночастицу на основе липидов или наночастицу на основе полимера или наночастицу на основе сополимера, где наночастица усиливает эффективность данного соединения. Наибольший размер биосовместимой наночастицы обычно составляет примерно от 100 до примерно 500 нм, и абсолютное значение ее поверхностного заряда составляет по меньшей мере 10 мВ ($|10 \text{ мВ}|$).

Наночастицу и представляющее интерес соединение следует вводить указанному субъекту друг за другом обычно с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч.

Последовательное введение субъекту биосовместимой наночастицы и соединения, представляющего интерес, сохраняет фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) пользу указанного соединения, представляющего интерес, при пониженной его токсичности для указанного субъекта или повышает его полезное фармацевтическое воздействие при эквивалентной или пониженной токсичности по сравнению с полезным фармацевтическим воздействием и токсичностью, индуцируемой указанным соединением, при введении стандартной фармацевтической дозы.

Используемая в способе фармацевтическая композиция, как правило, позволяет снизить вводимую фармацевтическую дозу соединения, по меньшей мере, на 10% по сравнению со стандартной фармацевтической дозой указанного соединения при сохранении того же полезного фармацевтического воздействия и эквивалентной токсичности, предпочтительно пониженной токсичности, для субъекта или повысить полезное фармацевтическое воздействие при эквивалентной или пониженной токсичности для субъекта.

Уровень техники

В целях обеспечения безопасности и эффективности терапевтические соединения необходимо селективно доставлять при оптимальной скорости к месту назначения в организме нуждающегося в этом субъекта.

Фармакокинетика (рК) является отраслью фармакологии, посвященной определению метаболического пути веществ, вводимых извне в живой организм. Это определение включает стадии определения концентраций соединения во всех важных тканях в течение достаточно длительного периода времени, предпочтительно до выведения соединения. Фармакокинетика необходима для эффективного описания *in vivo* поведения соединения, в том числе механизмов его абсорбции и распространения, а также химических изменений в организме. Можно составить рК-профиль в крови, применяя различные программы для получения ключевых рК-параметров, которые количественно описывают, как организм управляется с соединением. Важные параметры включают максимальную концентрацию ($C_{\max}$), период полураспада ($t_{1/2}$), клиренс, площадь под кривой (AUC) и среднее время пребывания (MRT), т.е. среднее время, в течение которого соединение остается в организме. Если наблюдается пролонгированная циркуляция препарата соединения в крови, то это обычно связано с увеличенным $t_{1/2}$, пониженным клиренсом, повышенной AUC и увеличенным MRT. рК-данные часто используют для определения оптимальной дозы и режима дозирования с целью поддержания требуемой концентрации в крови для повышения терапевтической эффективности при минимальных побочных эффектах. Кроме того, специалистам также известно, что в большинстве случаев концентрация соединения в крови коррелирует с его эффективностью и токсичностью, обычно для свободных лекарственных средств.

Физико-химические свойства терапевтических, а также профилактических соединений оказывают важное влияние на их фармакокинетику и метаболический путь в организме. Таким образом, выбор подходящих физико-химических свойств является ключевым при разработке такого соединения. Однако так как соединение не всегда эндогенно обеспечивается самим организмом и обычно вводится извне, его профиль биораспределения оптимизируют для соответствия и предпочтительно для оптимизации его требуемого фармакологического действия.

Рассматривают несколько подходов оптимизации доставки соединения к месту его назначения. Стратегия состоит в разработке терапевтического соединения со стелс-свойствами для пролонгации периода полураспада в крови и, следовательно, повышения его аккумуляции по месту назначения. Одним благоприятным подходом является ковалентное присоединение полиэтиленгликоля (PEG) к терапевтическому соединению, что обеспечивает увеличение *in vivo* периода полураспада ($t_{1/2}$) циркулирующего соединения, при вариации повышения уровня *in vivo* периода полураспада частично в зависимости от природы соединения и от природы покрытия. Также разработаны носители лекарства, такие как липосомы, эмульсии или мицеллы, для повышения терапевтической эффективности лекарственных средств посредством модификации их профиля биораспределения в организме субъекта.

Однако все еще остается проблема недостаточной селективности биораспределения терапевтических соединений. До настоящего времени плохая фармакокинетика и высокая токсичность являются важными причинами неудач при разработке терапевтических соединений.

В качестве примера, в случае лечения рака преднамеренное ингибирование жизненно важных функций организма с целью уничтожения раковых клеток вызывает целенаправленную или направленную на механизм токсичность в нормальных клетках, и клиницисты полагаются на различия в реакции на дозу и распределении терапевтических соединений для опухолей и нормальных тканей, чтобы найти возможное терапевтическое окно. Заметим, гепатотоксичность остается главной причиной отмены фармацевтической разработки и клинического применения лекарственного средства вследствие прямых и непрямых механизмов поражения клеток печени, вызываемого лекарственным средством.

Подход, предлагаемый для нанопорошковых соединений, таких как носители лекарственных средств [Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 11(1):31-59, 1994], представляет предварительное введение приманочного носителя для снижения, насыщения или даже инактивации фагоцитирующей способности ретикулоэндотелиальной системы (RES). Ухудшение или блокада также могут быть связаны со снижением уровней опсонических молекул в плазме. Показано, что внутривенное введение некоторых агентов, таких как алкиловые эфиры жирных кислот, сульфат декстрана, соли редкоземельных элементов (например, $GdCl_3$), носители лекарственных средств, пустой или инкапсулирующий клондронат, до введения тестовых частиц вызывает снижение (от умеренного до резкого) захвата клетками Купфера.

Например, в работе "Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors" [PNAS 2007] авторы сообщают роль RES в клиренсе наночастиц "CREKA-SPIO". В начальных экспериментах показано, что вводимые внутривенно (IV) наночастицы "CREKA-SPIO" неэффективно аккумулируются в MDA-MB-435 ксенотрансплантатах рака молочной железы. В противоположность этому, наблюдают высокую концентрацию частиц в RES тканях. При истощении RES макрофагов в печени липосомальным клондронатом авторы обнаружили 5-кратную пролонгацию периода полураспада частиц. Однако агент клондронат вызывает апоптоз макрофагов печени и селезенки, и его считают глобально вредным, так как истощение макрофагов повышает риски, связанные с иммуносупрессией и инфицированием. Во втором эксперименте авторы тестируют липосомы, покрытые хелатированным $Ni(II)$, в качестве потенциальных приманочных частиц, предполагая, что оксид железа и $Ni(II)$ привлекает подобные опсоины плазмы, и что Ni -липосомы могут, таким образом, истощать их в большом круге кровообращения. Действительно, вводимые внутривенно (IV) Ni -липосомы, введенные за 5 мин или 48 ч до инъекции наночастиц CREKA-SPIO, допускают пятикратное увеличение периода полураспада наночастиц в крови. Однако наблюдают высокую токсичность, вызывающую смерть мышей с опухолями. Также тестируют простые липосомы вместо Ni -липосом. Однако снижая токсичность по сравнению с указанными Ni -липосомами, простые липосомы являются гораздо менее эффективными. Действительно, коэффициент увеличения периода полураспада в крови составляет только около 2.

WO 2005086639 касается способов введения требуемого агента селективно по месту назначения в организме субъекта, обычно в связи с ультразвуковым или рентгеновским облучением или в связи с получением изображений магниторезонансным методом (MRI), а также в связи с терапией. Целью описываемого способа является повышение или сохранение эффективности представляющего интерес агента при снижении общей дозы конкретно вводимых агентов, благодаря сопутствующему введению приманочного неактивного носителя.

В описываемом изобретении используют подход, основанный на вероятности. Нецелевой неактивный агент ("неактивный носитель") вводят совместно (т.е. "по существу одновременно") с целевым агентом, представляющим интерес (присутствующим в "активной композиции") и демонстрирующим аналогичные физические свойства, с целью содействия обходу RES системы целевым агентом, представляющим интерес, позволяя тем самым улучшать захват представляющего интерес агента на нужном месте. Результатом этого подхода является меньшее воздействие агента, представляющего интерес, на пациентов и, как следствие, меньшая цена дозы указанного агента, представляющего интерес. Активную композицию и приманочный неактивный носитель вводят друг за другом в течение 5 мин, предпочтительно друг за другом в течение 2 мин или даже менее. Этот подход основан на присутствии большого избытка нецелевого "носителя" или "приманочных" разбавителей и на вероятности, что этот приманочный носитель в избытке будет конкурировать с целевым агентом, представляющим интерес по поглощению ретикулоэндотелиальной системой, когда поставляется в присутствии разбавителей, которые нацелены на нужное место. Период полураспада частиц, захваченных RES, зависит от дозы, т.е. период полураспада циркулирующих частиц увеличивается при повышении дозы. Считают, что более медленный клиренс, связанный с более высокими дозами, способствует поддержанию высокой общей концентрации агентов, позволяя уменьшать дозу представляющего интерес агента, который нужно ввести. Другими словами, согласно авторам WO 2005086639, увеличенный период полураспада всех агентов вследствие более высокой их общей дозы должен быть полезен для целевых агентов. Требование, включенное при этом подходе, заключается в том, что активный агент и неактивный агент ведут себя одинаково в отношении характеристик клиренса в RES, какими бы ни были их соответствующие композиции.

При этом подходе требуется квази-сопутствующая инъекция неактивного агента и активного агента для увеличения общего количества агентов, присутствующих в крови, и, следовательно, для пролонгирования их периода полураспада в крови. Такая стратегия, которая определенно основана на вероятностном подходе, непременно требует ассоциации активного агента с целеуказующим агентом для достижения успешной его аккумуляции на месте назначения, предоставляя указанному активному агенту преимущество над неактивным агентом. Кроме того, из-за квазисопутствующей инъекции может потребоваться специфическая конструкция неактивного носителя в зависимости от предполагаемого применения активной композиции.

Как очевидно из предшествующего уровня техники, и, несмотря на длительную медицинскую нужду, улучшение соединений (в том числе терапевтических, профилактических, а также диагностических соединений), которые нельзя эффективно применять на пациентах из-за их неприемлемой токсичности или их неблагоприятных фармакокинетических параметров, остается проблемой.

Подробное описание

Настоящее изобретение теперь позволяет оптимизировать эффективность представляющего интерес соединения (здесь также обозначено просто как "соединение") при любом его предполагаемом применении в связи с терапией, профилактикой или диагностикой. Описанная здесь композиция, которая представляет собой комбинацию биосовместимой частицы и (ii), по меньшей мере, одного соединения, представляющего интерес, оптимизирует фармакокинетические параметры, по меньшей мере, одного соединения, представляющего интерес, и, как следствие, теперь делает возможной разработку терапевтических соединений, которые иначе не могли бы быть разработаны, например, из-за их неприемлемой токсичности.

Типичная композиция по изобретению (здесь обычно обозначена как "фармацевтическая композиция") представляет собой композицию, содержащую комбинацию биосовместимой частицы и (ii) по меньшей мере одного соединения ("соединения, представляющего интерес"), где наибольший размер биосовместимой наночастицы обычно составляет примерно от 4 нм до примерно 500 нм, и абсолютное значение поверхностного заряда биосовместимой наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ.

Предпочтительным предметом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию биосовместимой частицы и представляющего интерес фармацевтического соединения, где наибольший размер биосовместимой наночастицы составляет примерно от 4 нм до примерно 500 нм, и абсолютное значение поверхностного заряда биосовместимой наночастицы составляет, по меньшей мере, 10 мВ (10 мВ), для применения с целью введения представляющего интерес фармацевтического соединения нуждающемуся в этом субъекту, где наночастица и представляющее интерес соединение следует вводить субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, представляющем интерес, друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч.

Совместное введение субъекту биосовместимой наночастицы и представляющего интерес соединения посредством композиции по изобретению обычно позволяет (сохраняет) такую же фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) пользу соединения при уменьшенной его токсичности для субъекта, или повышенную фармацевтическую пользу соединения при эквивалентной или уменьшенной его токсичности для субъекта (предпочтительно при пониженной токсичности) по сравнению с фармацевтической пользой и токсичностью, индуцируемой стандартной фармацевтической дозой указанного соединения.

Фармацевтическая композиция по изобретению обычно допускает по меньшей мере 10%, предпочтительно по меньшей мере 15% снижение фармацевтической (т.е. терапевтической, профилактической или диагностической) дозы вводимого соединения по сравнению со стандартной фармацевтической дозой указанного соединения (i) при сохранении такой же фармацевтической пользы и эквивалентной токсичности, предпочтительно пониженной токсичности для субъекта, или (ii) при повышении фармацевтической пользы и эквивалентной или пониженной токсичности для субъекта.

Так как форма частицы может влиять на ее "биосовместимость", здесь предпочтительны частицы, имеющие вполне однотипную форму. Таким образом, по фармакокинетическим причинам предпочтительными являются наночастицы по существу сферической, шарообразной или яйцевидной формы. Такая форма также благоприятствует взаимодействию наночастиц с клетками или поглощению клетками. Сферическая или шарообразная форма является особо предпочтительной.

В духе изобретения термин "наночастица" относится к продукту, в частности к синтетическому продукту, с размером частиц в нанометровом диапазоне, обычно примерно от 1 нм до примерно 500 нм, предпочтительно примерно от 4 нм до примерно 500 нм, примерно от 4 до примерно 400 нм, примерно от 30 нм до примерно 300 нм, примерно от 20 нм до примерно 300 нм, примерно от 10 нм до примерно 300 нм, например, примерно от 4 нм до примерно 100 нм, например, примерно от 10 нм, 15 нм или 20 нм до примерно 100 нм, или примерно от 100 нм до примерно 500 нм, обычно примерно от 100 нм до примерно 300 нм.

Выражения "размер наночастицы", "наибольший размер наночастицы" и "самый длинный размер наночастицы" здесь обычно относятся к "самому длинному или наибольшему измерению наночастицы" или "диаметру наночастицы" сферической или яйцевидной формы. Для определения размера наночастиц

можно применять трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ) или крио-ТЕМ. А также можно применять метод динамического рассеяния света (DLS) для определения гидродинамического диаметра наночастиц в растворе. Эти два метода можно также применять один за другим для сравнения измерений размеров и подтверждения указанного размера. Предпочтительным является метод DLS (ссылка: International Standard IS022412 Particle Size Analysis Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008).

Для применимости в контексте изобретения абсолютный электростатический поверхностный заряд (здесь также обозначен как "заряд" или "поверхностный заряд") биосовместимой наночастицы должен быть выше $|10 \text{ мВ}|$ (абсолютное значение). Поверхностный заряд наночастицы обычно определяют посредством измерений зета-потенциала в водной среде для концентрации наночастиц от 0,2 до 10 г/л, pH от 6 до 8 и обычно для концентраций электролитов в водной среде от 0,001 до 0,2М, например, от 0,01 М до 0,15 М.

Обычно биосовместимая наночастица по настоящему изобретению имеет электронный поверхностный заряд по меньшей мере $|10 \text{ мВ}|$, т.е. ниже -10 мВ или выше +10 мВ, например, ниже величины от (-12 мВ или -15 мВ) до -20 мВ или выше величины от (+12 мВ или +15 мВ) до +20 мВ, обычно ниже -15 мВ или выше +15 мВ. Предпочтительно, биосовместимая наночастица по настоящему изобретению имеет абсолютное значение электронного поверхностного заряда ("абсолютное значение поверхностного заряда") более 10 мВ, причем еще более предпочтительно указанный заряд является отрицательным зарядом.

Пока наночастица, применимая в контексте изобретения, является заряженной, она может быть либо органической, либо неорганической. Также можно применять смесь органических и неорганических наночастиц.

Если наночастица является органической, она может представлять собой наночастицу на липидной основе (глицеролипид, фосфолипид, стерин липид и т.д.), наночастицу на основе белка, также обозначенную здесь как "белковая наночастица" (например, альбумин), наночастицу на основе полимера ("полимерная наночастица"), наночастицу на основе сополимера ("сополимерная наночастица"), наночастицу на основе углерода, наночастицу, подобную вирусу (например, вирусный вектор).

Органическая наночастица также может представлять собой наносферу (обыкновенная наночастица) или нанокапсулу (полая наночастица), такую как липосома, гель, гидрогель, мицеллу, дендример и т.д. Можно также использовать смесь описанных здесь органических наночастиц. Полимер или сополимер может иметь природное или синтетическое происхождение.

Примеры синтетических (искусственных) и природных полимеров или сополимеров, применимых в контексте изобретения для получения органических наночастиц, можно выбрать из следующих веществ: полимолочная кислота (PLA), поли(лактид-гликолевая) кислота (PLGA), полиэтиленгликоль (PEG), полигалактин, полилактид, полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот, полипропиленгликоль, полисорбат, поливиниловый спирт, полиакриламид, полиметилметакрилат, полиалкилцианоакрилат, полилактат-согликолат, поли(амидоамин), поли(этиленмин), альгинат, целлюлоза и полимеры производные целлюлозы, коллаген, гиалуроновая кислота, полиглутаминовая кислота (PGA), актин, полисахарид и желатин.

Когда наночастица является неорганической, и если ее наибольший размер составляет величину обычно менее примерно 10 нм, например, менее примерно 8 нм, менее примерно 7 нм, обычно примерно от 7 нм до примерно 4 нм, например, менее примерно 6 нм, менее примерно 5 нм или менее примерно 4 нм, наночастица может быть образована любым неорганическим материалом. Неорганический материал может содержать, например, металлический элемент из 3, 4, 5, 6 периода периодической таблицы Менделеева, в том числе лантаниды. Если наибольший размер наночастицы составляет величину обычно менее примерно 10 нм, наночастицы могут ассоциироваться в более крупные структуры. Ассоциация наночастиц в более крупную структуру обычно может запускаться взаимодействием между наночастицами и биосовместимым полимером(ами), белком(ами) и т.д. Более крупную структуру также можно получить путем захвата наночастиц носителем, обычно простым носителем, таким как желатиновая структура (также здесь обозначена как "желатиновая наночастица"), или полым носителем, таким как липосома. После *in vivo* введения эти более крупные структуры могут далее высвобождать наночастицы.

Когда наночастица является неорганической, и если ее наибольший размер составляет, по меньшей мере, 10 нм, обычно от 10 до 500 нм, то наночастица может содержать, по меньшей мере, один из элементов-двухвалентных металлов, или может состоять из (i) одного или большего количества элементов-двухвалентных металлов, выбранных, например, из Mg, Ca, Ba и Sr, (ii) одного или большего количества элементов-трехвалентных металлов, выбранных, например, из Fe и Al, и (iii) одного или большего количества элементов-четырёхвалентных металлов, включающих Si.

В конкретном варианте осуществления неорганический материал наночастицы выбран из (i) одного или большего количества элементов-двухвалентных металлов, выбранных, например, из Mg, Ca, Ba и Sr (ii), одного или большего количества элементов-трехвалентных металлов, выбранных, например, из Fe и Al, и (iii) одного или большего количества элементов-четырёхвалентных металлов, включающих Si.

В другом конкретном варианте осуществления неорганический материал наночастицы выбран из карбоната кальция (CaCO_3), карбоната магния (MgCO_3), гидроксида магния (Mg(OH)_2), гидроксида железа (Fe(OH)_2), оксигидроксида железа (FeOOH), оксида железа (Fe_3O_4 или Fe_2O_3), оксида алюминия

(Al_2O_3), гидроксида алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$), оксигидроксида алюминия (AlOOH) и оксида кремния (SiO_2).

Наночастицы, используемые в описанных здесь композициях, должны быть биосовместимы, т.е. совместимы с живыми тканями. Таким образом, если требуется для композиции, наночастицы должны быть покрыты биосовместимым материалом, чтобы стать пригодными. Следовательно, в конкретном варианте осуществления изобретения на упоминаемую здесь наночастицу наносят биосовместимое покрытие.

Биосовместимый материал может представлять собой агент, допускающий взаимодействие с биологической мишенью. Такой агент обычно приносит положительный или отрицательный заряд на поверхность наночастиц, когда абсолютный заряд наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ.

Агент, образующий положительный заряд на поверхности наночастицы, можно выбрать, например, из аминопропилтриэтоксисилана или полилизина. Агент, образующий отрицательный заряд на поверхности наночастицы, можно выбрать, например, из фосфата (например, полифосфата, метафосфата, пирофосфата и т.д.), карбоксилата (например, цитрата или дикарбоновой кислоты, в частности сукциновой кислоты) или сульфата.

В конкретном варианте осуществления, пока абсолютный заряд наночастицы составляет, по меньшей мере, 10 мВ (10 мВ), наночастица может иметь покрытие из биосовместимого материала, выбранного из агента, демонстрирующего стерическую группу. Такая группа может быть выбрана, например, из полиэтиленгликоля (PEG); полиэтиленоксида; поливинилового спирта; полиакрилата; полиакриламида (поли(N-изопропилакриламида)); поликарбамида; биополимера; полисахарида, такого как декстран, ксилан и целлюлоза; коллагена; цвиттерионного соединения, такого как полисульфобетанин; и т.д.

Биосовместимое покрытие преимущественно может представлять собой "полное покрытие" (целый монослой). Это подразумевает наличие очень высокой плотности биосовместимых молекул, создающих подходящий заряд на всей поверхности наночастицы.

Биосовместимое покрытие может дополнительно содержать маркировочный агент, обычно агент, позволяющий визуализацию цвета с использованием стандартного фотодетектора.

Совместное введение биосовместимой наночастицы вместе с соединением, представляющим интерес, сохраняет фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую), обычно терапевтическую, пользу представляющего интерес соединения при пониженной токсичности, или повышает фармацевтическую пользу соединения при эквивалентной или пониженной токсичности для субъекта, обычно, если введение агентов субъекту, нуждающемуся в соединении, представляющем интерес, производят друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч, по сравнению с фармацевтической пользой и токсичностью, индуцируемой стандартной фармацевтической, обычно терапевтической, дозой указанного соединения.

В конкретном варианте осуществления, совместное введение биосовместимой наночастицы и представляющего интерес соединения позволяет снизить терапевтическую дозу вводимого соединения по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 15%, обычно, если введение агентов субъекту, нуждающемуся в соединении, представляющем интерес, производят друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч, по сравнению со стандартной терапевтической дозой указанного соединения при сохранении такой же терапевтической пользы и эквивалентной токсичности или пониженной токсичности (предпочтительно пониженной токсичности) соединения для субъекта; или при повышении терапевтической пользы и эквивалентной или пониженной токсичности соединения для субъекта. В конкретном варианте осуществления наночастицу(ы) вводят с несколькими соединениями, представляющими интерес, обычно двумя соединениями, представляющими интерес.

Наночастица предпочтительно выводится из организма субъекта, которому была введена, обычно в течение периода от 1 ч до 6 недель, например в течение 1 месяца (4 недели), от 1 ч до 1 месяца, например от 1 ч до 3 недель, или от 1 ч до 2 недель, или от 1 ч до 1 недели, после ее введения субъекту, нуждающемуся в соединении, представляющем интерес.

Материал, составляющий наночастицу (вместе с ее биосовместимым покрытием, если таковое имеется), является важным для определения биоустойчивости наночастицы. Наночастица может считаться биodeградируемой (если состоит, например, из биodeградируемого полимера, такого как PLGA или PLA), растворимой (например, оксид железа) или небiodeградируемой и нерастворимой. Биodeградируемые и растворимые наночастицы облегчают быстрый клиренс наночастиц из организма субъекта.

Согласно настоящему описанию можно использовать различные молекулы или агенты в качестве по меньшей мере одного соединения, представляющего интерес, обычно в качестве по меньшей мере одного фармацевтического соединения, представляющего интерес, вводимого в комбинации с биосовместимой наночастицей, как описано здесь выше. Данное соединение может представлять собой терапевтическое, профилактическое или диагностическое соединение, как объяснялось ранее. Оно может быть органическим соединением или неорганическим соединением.

Примеры органического соединения, пригодного в качестве соединения, представляющего интерес, можно выбрать из биологического соединения, антитела, олигонуклеотида, синтезированного пептида, низкомолекулярных целевых терапевтических средств, цитотоксического соединения и любого соответствующего пролекарства или его производного и т.д.

В конкретном варианте осуществления представляющее интерес соединение, применяемое в контексте настоящего изобретения, представляет собой органическое соединение, предпочтительно выбранное из биологического соединения, низкомолекулярного целевого терапевтического средства и цитотоксического соединения. В другом конкретном варианте осуществления представляющее интерес соединение выбрано из антитела, олигонуклеотида и синтезированного пептида.

Биологическое соединение представляет собой, например, антитело, предпочтительно моноклональное антитело ("mAb"), такое как инфликсимаб, адалимумаб, бевацизумаб, ритуксимаб, трастузумаб, ранибизумаб, суегксимаб, панатимумаб; белок или рекомбинантный белок, такой как энбрел (этанерцепт) или интерферон бета-1а; пептид или рекомбинантный пептид, такой как инсулин гларгин или бетасерон; вакцину, такую как превнар 13 или гардазил; биоаналог, такой как эпогин; фермент или рекомбинантный фермент, такой как реплагал или среон; и т.д.

Олигонуклеотид представляет собой, например, антисмысловой олигонуклеотид, аптамер, такой как мипомерсен натрия или пурсеннид и т.д.

Синтезированный или искусственный пептид, такой как глатирамерацетат или леупролидацетат.

Низкомолекулярное целевое терапевтическое средство обычно ингибирует ферментативные домены на мутированном, чрезмерно экспрессированном или другом критическом белке (потенциальной мишени в контексте лечения рака) в злокачественных клетках. Некоторые терапевтические агенты включают агенты, которые нацелены на деление клеток (например, ингибитор авроракиназы или ингибитор циклин-зависимой киназы), а также другие биологические механизмы, такие как обновление белка и модификация хроматина (например, ингибитор гистондеацетилазы). Низкомолекулярное целевое терапевтическое средство представляет собой, например, иматиниб, рапамицин, gefitinib, эрлотиниб, сорафениб, сунитиниб, нилотиниб, дазатиниб, лапатиниб, бортезомиб, аторвастатин и т.д.

Цитотоксическое соединение представляет собой, например, ДНК-модифицирующий агент, такой как антрациклин (например, доксорубицин, даунорубицин и т.д.), алкилирующий агент (например, мелфалан или темозоломид), а также лекарство, очень строго интерферирующее с определенными физиологическими механизмами, такими как полимеризация микротрубочек (например, таксол) или синтез метаболитов (например, метотрексат). В контексте фотодинамической терапии обычно используют активируемое цитотоксическое соединение (например, фотофрин), и для продуцирования терапевтического эффекта его следует активировать посредством внешнего источника, такого как лазерный источник. Другие типичные цитотоксические соединения обычно выбраны из химиотерапевтических агентов, которые описаны здесь или известны специалистам онкологам.

Пролекарства (например, капецитабин или иринотекан) образуются в виде своей активной формы в процессе *in vivo* метаболизма, продуцируя предполагаемый терапевтический эффект.

Примеры неорганического соединения, пригодного в качестве соединения, представляющего интерес, можно выбрать из координационного комплекса переходного металла, радиофармацевтического соединения, наночастицы и т.д.

Координационные комплексы переходных металлов предлагают потенциальные преимущества по сравнению с более обычными лекарствами на органической основе, включая широкий диапазон координационных чисел и геометрий, достижимые окислительно-восстановительные состояния, 'регулируемость' термодинамики и кинетики лигандного замещения, а также широкое структурное разнообразие. Вещества на основе металла взаимодействуют с клеточными молекулярными мишенями, оказывая влияние на биохимические функции, в результате чего происходит деструкция злокачественных клеток. Координационные комплексы переходных металлов обычно представляют собой цитотоксические агенты (например, координационные комплексы платины: цисплатин, карбоплатин, оксалоплатин - или координационные комплексы рутения или золота), воздействующие на структуру ДНК.

Радиофармацевтические соединения испускают излучение для диагностических целей или с целью селективного разрушения злокачественных клеток. Типичные радиофармацевтические препараты могут содержать, например, стронций-89, таллий-201, технеций-99, самарий-83 и т.д.

Наночастица обычно может быть выбрана из наночастицы оксида металла (смотри, например, WO 2009/147214 и WO 2007/118884), наночастицы металла (например, наночастицы золота, платины или серебра), наночастицы сульфида металла (например, Bi_2S_3) и любой их смеси (например, наночастицы золота, покрытых оксидом гафния). Например, наночастица представляет собой наночастицу, которую можно активировать при помощи внешнего источника, такого как источник электромагнитного излучения, ультразвуковой источник, магнитный источник и т.д.

Представляющее интерес соединения, которое вводят в комбинации с биосовместимой наночастицей, которая описана здесь выше (обычно вводят последовательно, как здесь описано), можно инкапсулировать в носитель или привить (или связать) к такому носителю способами, известными специалистам. Типичным носителем является, например, липосома (такая как DOXIL или ThermoDox, в которой использован термочувствительный липид), мицелла, полимерный носитель (или "полимер"), гидрогель, гель, сополимерный носитель, белковый носитель, неорганический носитель.

Фармацевтическую композицию по изобретению (определяемую комбинацией представляющего интерес соединения и наночастицы) можно применять во многих областях, в частности для лечения чело-

века или в ветеринарии. Обычно данная композиция предназначена для применения на животном, предпочтительно на млекопитающем (например, в ветеринарной медицине), еще более предпочтительно на людях любого возраста и пола.

Фармацевтические композиции по изобретению можно применять при сердечно-сосудистых заболеваниях, заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС), желудочно-кишечных заболеваниях, генетических нарушениях, гематологических нарушениях, гормональных нарушениях, иммунологических, инфекционных заболеваниях, метаболических нарушениях, скелетно-мышечных нарушениях, онкологии, респираторных заболеваниях, токсикологии и т.д. В предпочтительном варианте фармацевтическую композицию применяют при сердечно-сосудистых заболеваниях, ЦНС-заболеваниях, онкологии, инфекционных заболеваниях, метаболических нарушениях.

В контексте настоящего изобретения наночастица и соединение(я) ("соединение(я), представляющее интерес") преимущественно следует вводить субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч, обычно от 5 мин до примерно 24 ч, предпочтительно от 5 мин или 30 мин до примерно 12 ч, с целью оптимизации фармацевтической эффективности соединения.

В настоящем изобретении, если наночастицу и соединение(я) ("соединение(я), представляющее интерес") преимущественно вводят субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч, то абсолютное значение поверхностного заряда биосовместимой наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ (|10 мВ|).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, если наночастицу и соединение(я) ("соединение(я), представляющее интерес") преимущественно вводят субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 24 ч, то абсолютное значение поверхностного заряда биосовместимой наночастицы преимущественно составляет по меньшей мере 15 мВ (|15 мВ|).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, если наночастицу и соединение(я) ("соединение(я), представляющее интерес") преимущественно вводят субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 12 ч, то абсолютное значение поверхностного заряда биосовместимой наночастицы преимущественно составляет по меньшей мере 20 мВ (|20 мВ|).

Также здесь описан способ лечения субъекта страдающего от такого заболевания как заболевание, упоминаемые здесь, где указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции по изобретению, обычно введение биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного соединения, представляющего интерес, которое здесь описано. Первым можно вводить субъекту любой компонент из наночастицы или, по меньшей мере, одного соединения, представляющего интерес, пока биосовместимую наночастицу и соединение вводят друг за другом с интервалом от 5 мин до примерно 72 ч. Введение любого компонента из указанной наночастицы или по меньшей мере одного соединения, представляющего интерес, может быть разовым введением каждого, многократным введением каждого, например, несколько последовательных введений каждого компонента.

Биосовместимую наночастицу можно вводить однократно и по меньшей мере одно соединение, представляющее интерес, можно вводить более одного раза и наоборот.

В конкретном варианте осуществления биосовместимую наночастицу вводят по меньшей мере в начале протокола, включающего несколько введений соединения, представляющего интерес, т.е., по меньшей мере, при первом введении указанного соединения, представляющего интерес, и до или после его введения.

В другом конкретном варианте осуществления биосовместимую наночастицу не вводят в начале протокола, включающего несколько введений соединения, представляющего интерес, и не вводят перед вторым или третьим введением указанного соединения, представляющего интерес, и до или после его введения.

В контексте этих двух последних вариантов осуществления также можно вводить биосовместимую наночастицу вместе (до или после, как объясняется ранее) с соединением, представляющим интерес, при некоторых или при всех последующих введениях указанного соединения, представляющего интерес.

В конкретном варианте осуществления наночастицу по изобретению вводят субъекту до введения указанному субъекту, по меньшей мере, одного соединения, представляющего интерес, обычно за (5 мин - примерно 72 ч) до введения по меньшей мере одного соединения, представляющего интерес.

В данном контексте термин "наночастица" более конкретно касается продукта, в частности синтетического продукта, с размером частиц примерно от 4 нм до примерно 100 нм, например, примерно от 10 нм, 15 нм или 20 нм до примерно 100 нм. Примером соединения, представляющего интерес и используемого с такими наночастицами, является органическое соединение, обычно биологическое соединение. Оно преимущественно выбрано из антитела, олигонуклеотида, синтезированного пептида, низкомолекулярного целевого терапевтического средства и цитотоксического соединения и предпочтительно представляет собой антитело, низкомолекулярное целевое терапевтическое средство и/или цитотоксическое соединение. По-другому, термин "наночастица" может относиться к продукту, в частности к синтетиче-

скому продукту с размером частиц примерно от 100 нм до примерно 500 нм, обычно примерно от 100 нм до примерно 300 нм. Примером соединения, представляющего интерес и используемого с такими наночастицами, является неорганическое соединение, обычно выбранное из наночастицы металла, наночастицы оксида металла, наночастицы сульфида металла и любой их смеси или любого соединения, представляющего интерес, инкапсулированного в носитель или привитого на такой носитель.

Биосовместимую наночастицу фармацевтической композиции по изобретению можно вводить любым способом, например, внутривенно (IV), внутриартериально и/или внутривнутрибрюшинно. Предпочтительным способом введения является внутривенный способ.

Представляющее интерес соединение(я) фармацевтической композиции по изобретению можно вводить различными способами, такими как подкожный, внутривенный (IV), интрадермальный, внутриартериальный, воздушный (ингаляция), внутривнутрибрюшинный, внутримышечный и/или пероральный способ (через рот).

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, не ограничивая его область.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - схематическое изображение возможных способов выведения терапевтических соединений из кровообращения в зависимости от размера соединения (наибольший размер).

Фиг. 2 - схематическое представление расписания обработок для фармацевтической композиции, содержащей (i) биосовместимые наночастицы по примеру 3 и (ii) ксенотрансплантаты Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN.

Фиг. 3 - задержка возобновления роста опухоли при применении фармацевтической композиции, содержащей биосовместимые наночастицы по примеру 3 и ксенотрансплантаты Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN (средний RTV $\pm$ SD).

Примеры

Пример 1. Синтез №1 липосом как биосовместимых наночастиц.

Липосомы получают, применяя способ регидратации липидной пленки.

а) Липиды растворяют в хлороформе. Хлороформ в конечном счете выпаривают в токе азота. Регидратацию липидной пленки посредством HEPES 20 mM и NaCl 140 mM при pH 7,4 проводят при 50°C, так что концентрация липида составляет 5 mM.

Для получения заряженных липосом используют следующую липидную композицию: DPPC (дипальмитоилфосфатидилхолин): 86 мол.%; MPPC (монопальмитоилфосфатидилхолин): 10 мол.%; DSPE-PEG (дистеарилфосфатидилэтанолламин-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]): 4 мол.%.

б) Затем выполняют цикл замораживания-оттаивания 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню с регулируемой температурой 50°C.

с) Для калибровки размера липосом используют термобарабанный экструдер (LIPEx™ Extruder, Northern Lipids) при регулируемой температуре и давлении. Во всех случаях экструзию проводят при 50°C и давлении 10 бар.

Распределение по размерам полученных таким образом липосом определяют методом динамического рассеяния света (DLS), используя прибор Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) с 633 нм HeNe лазером с углом 90°C. Суспензию липосом разводят 100-кратно в HEPES 20 mM и NaCl 140 mM с pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) равен примерно 170 нм с коэффициентом полидисперсности (PDI), равным примерно 0,1.

Специалистам понятно, что желательный поверхностный заряд получают, благодаря выбранной липидной композиции, и его величину подтверждают, измеряя зета-потенциал с использованием прибора Zetasizer NanoZS (Malvern instrument).

Липосомы разводят 100-кратно в воде и pH результирующей суспензии доводят до pH 7,4. Поверхностный заряд липосом равен примерно 14 мВ с pH 7,4.

Пример 2. Способ, позволяющий снизить по меньшей мере на 10% дозу терапевтического соединения, которую следует ввести субъекту для получения эквивалентной терапевтической эффективности соединения в организме субъекта.

Фармацевтическую композицию по п.1, содержащую биосовместимую наночастицу и активируемую наночастицу оксида для противораковой терапии (используемые в качестве "соединения" или "фармацевтического соединения"), которая может генерировать электрон и/или высокоэнергетический протон под воздействием ионизирующего излучения, такого как рентгеновское излучение, вводят "голым" мышам, несущим ксенотрансплантированную опухоль, следующим образом:

а) введение каждой "голой" мыши (посредством внутривенной инъекции) биосовместимых наночастиц;

б) через промежуток времени, равный от 5 мин до 72 ч, после стадии а) введение (посредством внутривенной инъекции) каждой мыши со стадии а) терапевтического соединения при меньшей дозе (на 10%) по сравнению с обычно применяемой дозой;

с) определение концентрации терапевтического соединения в образцах крови и плазмы от каждой мыши для получения фармакокинетических параметров терапевтического соединения, причем указан-

ную концентрацию измеряют один раз или предпочтительно несколько раз через промежуток времени от 1 мин до 24 ч после введения терапевтического соединения;

d) оценка какого-либо клинического признака токсичности после введения фармацевтической композиции и

e) определение аккумулярования в опухоли терапевтического соединения через 24 ч после внутривенного (IV) его введения.

Пример 3. Синтез №2 липосом как биосовместимых наночастиц липосомы получают, применяя способ регидратации липидных пленок.

a) Липиды растворяют в хлороформе. Хлороформ в конечном счете выпаривают в токе азота. Регидратацию липидной пленки посредством HEPES 20 mM и NaCl 140 mM с pH 7,4 проводят при 60°C, так что концентрация липида составляет 25 mM.

Для получения заряженных липосом используют следующую липидную композицию: DPPC (дипальмитоилфосфатидилхолин) 62 мол.%; HSPC (гидрированный соевый фосфатидилхолин) 20 мол.%; CHOL (холестерин) 16 мол.%; POPS (1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилсерин) 1% мол.%; DSPE-PEG (дистеарилфосфатидилэтанолламин-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]) 1 мол.%.

b) Затем выполняют цикл замораживания-оттаивания 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню с регулируемой температурой 60°C.

c) Для калибровки размера липосом используют термобарабанный экструдер (LIPEX™ Extruder, Northern Lipids) при регулируемой температуре и давлении. Во всех случаях экструзию проводят при 60°C и давлении 5 бар, с поливинилиденфторидной (PVDF) мембраной, имеющей размер пор 0,1 мкм.

Распределение по размерам полученных таким образом липосом определяют методом динамического рассеяния света (DLS), используя прибор Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) с 633 нм HeNe лазером при угле 90°C. Суспензию липосом разводят 100-кратно в HEPES 20 mM и NaCl 140 mM с pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) равен примерно 145 нм с коэффициентом полидисперсности (PDI), равным примерно 0,1.

Специалистам понятно, что желательный поверхностный заряд получают, благодаря выбранной липидной композиции, и его величину подтверждают посредством измерения зета-потенциала, используя прибор Zetasizer NanoZS (Malvern instrument).

Липосомы разводят 100-кратно в растворе хлорида натрия с концентрацией 1 mM и доводят pH результирующей суспензии до pH 7,4. Поверхностный заряд липосом равен примерно -25 мВ при pH 7,4, NaCl 1 mM.

Пример 4. Задержка возобновления роста опухоли при применении фармацевтической композиции, содержащей суспензию биосовместимых наночастиц по примеру 3 и ксенотрансплантаты Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN (фиг. 2 и 3).

Данный анализ проводят с целью исследования эффективности фармацевтической композиции, содержащей (i) биосовместимые наночастицы по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (липосомальный инкапсулированный доксорубин) в качестве терапевтического соединения, представляющего интерес, на модели опухоли MDA-MB-231-luc-D3H2LN, ксенотрансплантированной NMRI "голым" мышам.

Клеточную линию аденокарциномы человеческой молочной железы MDA-MB-231-luc-D3H2LN приобретают у Caliper Life Science (Villepinte, France). Клетки культивируют в минимальной поддерживающей среде со сбалансированным солевым раствором Эрла MEM/EBSS, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% несущественных аминокислот, 1% L-глутамина и 1% пирувата натрия (Gibco).

6-7 недельных "голых" мышей NMRI (20-25 г) заказывают в Janvier Labs (France). Мышей подвергают общему облучению 3 Гр при помощи цезий-137 облучающего устройства за день до инокуляции раковых клеток с целью получения ксенотрансплантата. Опухоли MDA-MB-231-luc-D3H2LN получают, производя подкожную инъекцию $4 \cdot 10^6$ клеток в 50 мкл в нижнюю часть правого бока мыши. Опухоль выращивают до достижения объема около 100 мм³. Измеряют диаметр опухоли, используя штангенциркуль с цифровой индикацией, и рассчитывают объем опухоли в мм³, используя формулу:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{\text{длина (мм)} \times (\text{ширина})^2 \text{ (мм}^2\text{)}}{2}$$

Мышей распределяют случайным образом по отдельным клеткам и идентифицируют по номеру (тату на лапе). Четыре группы обрабатывают, как показано на фиг. 2.

Группа 1. Стерильная 5% глюкоза (контрольная группа (носитель)).

Четырем (4) мышам вводят внутривенно (IV) стерильный 5% раствор глюкозы в день 1, день 7 и день 14. Каждый раз (день) производят две инъекции 5% глюкозы. Первую инъекцию 5% раствора глюкозы проводят за 4 ч до второй инъекции.

Группа 2. Биосовместимые наночастицы по примеру 3 (контрольная группа).

Четырем (4) мышам вводят внутривенно (IV) стерильный 5% раствор глюкозы и биосовместимые наночастицы по примеру 3 (10 мл/кг) в день 1, день 7 и день 14. Каждый раз (день) проводят инъекцию биосовместимых наночастиц по примеру 3 за 4 ч до инъекции 5% раствора глюкозы.

Группа 3. Dox-NP® (3 мг/кг доксорубина) (экспериментальная группа).

Пяти (5) мышам вводят внутривенно (IV) стерильный 5% раствор глюкозы и Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина) в день 1, день 7 и день 14. Каждый раз (день) производят инъекцию стерильного 5% раствора глюкозы за 4 ч до инъекции Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина).

Группа 4. фармацевтическая композиция, т.е. комбинация (i) биосовместимых наночастиц по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина) (экспериментальная группа).

Пяти (5) мышам вводят внутривенно (IV) биосовместимые наночастицы по примеру 3 (10 мл/кг) и Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина) в день 1, день 7 и день 14. Каждый раз (день) инъекцию биосовместимых наночастиц по примеру 3 проводят за 4 час. до инъекции Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина).

Вводят Dox-NP® (Avanti Polar Lipids - липосомальный препарат 2 мг/мл доксорубицин.HCl с pH 6,5-6,8 в 10 mM гистидиновом буфере с 10% мас./об. сахарозы) без дополнительного разведения в объеме, необходимом для получения 3 мг/кг вводимого доксорубицина.

Суспензию биосовместимых наночастиц по примеру 3 используют без дополнительного разведения.

Вводят Dox-NP® и биосовместимые наночастицы по примеру 3, производя внутривенную инъекцию (IV) в латеральную хвостовую вену при помощи 100 Ед (0,3 мл) инсулинового шприца (TERUMO, France).

Мышей наблюдают, отслеживая клинические признаки, массу тела и размер опухоли.

Объем опухоли определяют по двум пространственным измерениям объема опухоли при помощи штангенциркуля с цифровой индикацией, используя следующую формулу:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{\text{длина (мм)} \times (\text{ширина})^2 \text{ (мм}^2\text{)}}{2}$$

В каждой группе относительный объем опухоли (RTV) выражают как отношение V_t/V_0 (V_t соответствует объему опухоли в данный день в период обработки и V_0 соответствует объему опухоли в начале обработки).

Эффективность обработки определяют, используя удельное замедление роста (SGD) в течение периода двойного удвоения (период одного удвоения равен времени, в течение которого опухоль удваивается в объеме) и оптимальное процентное значение T/C (% T/C).

SGD рассчитывают для периода двойного удвоения следующим образом:

$$SGD = \frac{T4d_{\text{обработка}} - T4d_{\text{контроль}}}{T4d_{\text{контроль}}}$$

где T4d соответствует времени, необходимому для двойного удвоения опухоли в объеме (средний RTV от 100 мм³ до 400 мм³).

Процентное значение T/C ("T/C") рассчитывают, производя деление среднего относительного объема опухоли животных из обработанных групп (группы 2, 3, 4) относительно контрольной группы (группа 1) в дни 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 и 24, и умножая результат указанного деления на 100 (см. табл. 2). Наименьшие значения % T/C, полученные за 2 недели после обработки с введением инъекции (в присутствии или в отсутствие биосовместимых наночастиц, которые применяются в контексте настоящего изобретения) соответствуют оптимальным значениям % T/C.

На фиг. 3 показан средний относительный объем опухоли (средний RTV) для всех групп, который получен (в описанных выше условиях) после IV инъекций:

носителя (стерильная 5% глюкоза) в дни 1, 7 и 14 (группа 1);

биосовместимых наночастиц по примеру 3 за 4 час. до каждой инъекции носителя (стерильная 5% глюкоза) в дни 1, 7 и 14 (группа 2);

Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина) в дни 1, 7 и 14 (группа 3); или

биосовместимых наночастиц по примеру 3 за 4 ч до инъекции Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина) в дни 1, 7 и 14 (группа 4).

Как показано на фиг. 3, заметное ингибирование роста опухоли наблюдают после первой инъекции фармацевтической композиции, содержащей комбинацию (i) биосовместимых наночастиц по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина), по сравнению с введением только Dox-NP® (3 мг/кг доксорубицина).

Рассчитывают время (выраженное в днях), необходимое для каждой опухоли, чтобы дважды удвоиться в объеме (T4d) (как меру длительности эффектов обработки). Определяют T4d для фармацевтической композиции, равное примерно 31 дню относительно примерно 14 дней для введения только Dox-NP® (табл. 1). Кроме того, удельное замедление роста (SGD), определяемого из роста опухолей в течение периода двойного удвоения (исходя из среднего RTV от 100 мм³ до 400 мм³), равно примерно 2 для фармацевтической композиции относительно примерно 0 для введения только Dox-NP® (табл. 1).

Таблица 1

Группы	T4d (в днях) от 100 до 400 мм ³ (средн. RTV)	SGD
Группа 1: носитель (контрольная группа)	11	-
Группа 2: биосовместимые наночастицы по примеру 3	11	0
Группа 3: только Dox-NP® (3 мг/кг)	14	0
Группа 4: фармацевтическая композиция, содержащая (i) биосовместимые наночастицы по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг)	31	2

Таблица 1: время, необходимое, чтобы опухоль дважды удвоилась в объеме (T4d) и удельное замедление роста (SGD), определяемое по росту опухоли в течение периода двойного удвоения. T4d представляет количество дней до достижения периода двойного удвоения (средний RTV от 100 мм³ до 400 мм³). В контрольной группе вводят только носитель (5% глюкозу) (-).

Кроме того, процентное значение Т/С (%Т/С) (рассчитываемое до дня умерщвления животных из группы 1) снижается быстрее для фармацевтической композиции, чем для введения только Dox-NP®.

Это демонстрирует заметное влияние фармацевтической композиции. Оптимальное значение Т/С 25, наблюдаемое в день 24, действительно получено для фармацевтической композиции, т.е. комбинации (i) биосовместимых наночастиц по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубина), притом что оптимальное значение %Т/С 38, наблюдаемое в день 21, получено для группы с введением только Dox-NP® (табл. 2).

Таблица 2

Дни	Группа 2: только биосовместимые наночастицы	Группа 3: только Dox-NP® (3 мг/кг)	Группа 4: фармацевтическая композиция, содержащая (i) биосовместимые наночастицы и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг)
1	100	100	100
3	104	126	121
7	90	106	80
10	87	76	60
13	103	80	55
15	98	74	45
18	98	56	43
21	87	38	33
24	98	40	25

Таблица 2: процентное отношение Т/С (% Т/С) рассчитывают, производя деление среднего относительного объема опухоли животных групп с обработкой (группы 2, 3, 4) относительно контрольной группы (группа 1) в дни 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 и 24 и умножая результат указанного деления на 100. Контрольной группой является группа 1 (только носитель-стерильная 5% глюкоза). %Т/С рассчитывают для дня 24, который соответствует дню умерщвления животных из группы 1 (контрольной группы). Оптимальное значение %Т/С показано для каждой группы в серых клетках.

Везде результаты демонстрируют благоприятное замедление роста опухоли при применении фармацевтической композиции по настоящему изобретению [соответствующей комбинации (i) биосовместимых наночастиц по примеру 3 и (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубина)], что не наблюдается, если применяют только Dox-NP® (3 мг/кг доксорубина) (т.е. в отсутствие биосовместимых наночастиц, применяемых в контексте настоящего изобретения). Это замедление роста опухоли наблюдают, если биосовместимые наночастицы по примеру 3 и соединение, представляющее интерес (Dox-NP®), вводят после-

довательно, причем биосовместимые наночастицы вводят субъектам за 4 час. до Dox-NP®.

Заявители воспроизводят данный эксперимент для подтверждения, что аналогичный результат наблюдается до тех пор, пока представляющее интерес соединение и биосовместимые наночастицы вводят субъекту друг за другом с интервалом от 5 мин. до 72 час.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения терапевтической или профилактической эффективности представляющего интерес фармацевтического соединения у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает стадию введения субъекту последовательно:

(i) биосовместимых наночастиц, каждая из которых имеет наибольший размер между приблизительно 100 нм и приблизительно 500 нм и отрицательное значение поверхностного заряда ниже -20 мВ и

(ii) представляющего интерес фармацевтического соединения, которое представляет собой цитотоксическое соединение или олигонуклеотид, инкапсулированные в носителе и,

где указанные наночастицы вводятся субъекту между более чем 5 мин и приблизительно 24 ч до представляющего интерес фармацевтического соединения,

где наночастица представляет собой наночастицу на основе липидов, или наночастицу на основе полимера, или наночастицу на основе сополимера.

2. Способ по п.1, где каждая наночастица дополнительно имеет биосовместимое покрытие.

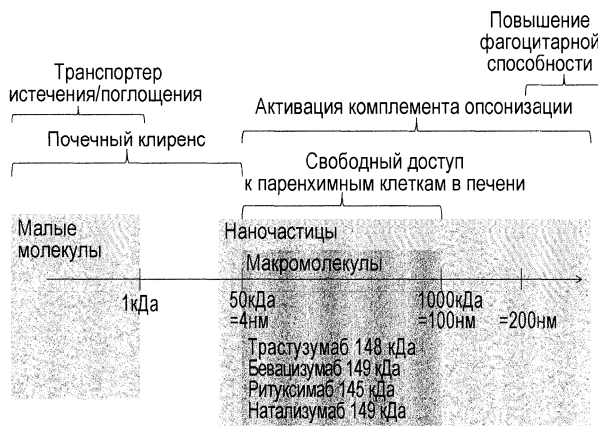
3. Способ по п.1 или 2, где последовательное введение биосовместимой наночастицы и соединения повышает терапевтическую эффективность соединения при эквивалентной или пониженной токсичности для субъекта по сравнению с терапевтической эффективностью и токсичностью, индуцируемой стандартной терапевтической дозой указанного соединения.

4. Способ по любому из пп.1-3, где последовательное введение биосовместимой наночастицы и соединения позволяет снизить по меньшей мере на 10% терапевтическую дозу вводимого соединения по сравнению со стандартной терапевтической дозой указанного соединения при повышении терапевтической эффективности и эквивалентной или пониженной токсичности для субъекта.

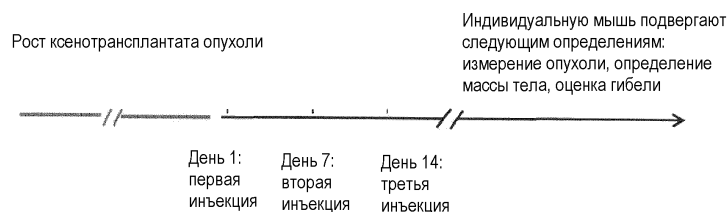
5. Способ по любому из пп.1-4, где наночастица выводится из организма субъекта, которому была введена, в течение периода от 1 ч до 6 недель после ее введения субъекту, нуждающемуся в фармацевтическом соединении, представляющем интерес.

6. Способ по любому из пп.1-5, где цитотоксическое соединение представляет собой антрациклин, алкилирующий агент, лекарственное средство, препятствующее полимеризации микротрубочек или синтезу метаболита, или химиотерапевтический агент.

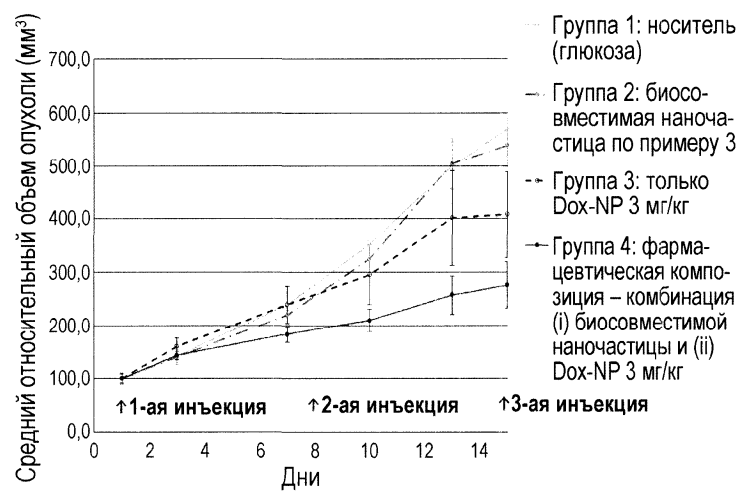
7. Способ по любому из пп.1-6, где наночастица на основе липидов представляет собой липосому.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

