

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041477**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.28

(21) Номер заявки
201890803

(22) Дата подачи заявки
2015.10.09

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)

(54) ДИСПЕРСИОННЫЙ РАСТВОР НАНОЧАСТИЦ, КОМПОЗИЦИЯ И СИСТЕМА ДЛЯ ДОСТАВКИ 5FU И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(43) 2018.11.30

(86) PCT/IT2015/000253

(87) WO 2017/060929 2017.04.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОВИИИКС С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
**Розиелло Давиде, Виджиланца
Винченцо, Азеро Сальваторе, Ди
Минно Маттео, Луполи Роберта (IT)**

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

(56) MORIMOTO Y. ET AL.: "DRUG-CARRIER PROPERTY OF ALBUMIN MICROSPHERES IN CHEMOTHERAPY. IV. ANTITUMOR EFFECT OF SINGLE-SHOT OR MULTIPLE-SHOT ADMINISTRATION OF MICROSPHERE-ENTRAPPED 5-FLUOROURACIL ON EHRlich ASCITES OR SOLID TUMOR IN MICE", CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, JP, vol. 28, no. 10, 1 January 1980 (1980-01-01), pages 3087-3092, XP001094117, ISSN: 0009-2363 abstract page 3087 - page 3088 page 3092
AMIR MAGHSOUDI ET AL.: "5-Fluorouracil-Loaded BSA Nanoparticles: Formulation Optimization and In Vitro Release Study", AAPS PHARMSCITECH, vol. 9, no. 4, 11 October 2008 (2008-10-11), pages 1092-1096, XP055271551, DOI: 10.1208/S12249-008-9146-5 the whole document
SANTHI K. ET AL.: "A Study on the Preparation and Anti-Tumor Efficacy of Bovine Serum Albumin Nanospheres Containing 5-Fluorouracil", DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, vol. 28, no. 9, 10 January 2002 (2002-01-10), pages 1171-1179, XP055271671, US ISSN: 0363-9045, DOI: 10.1081/DDC-120014584 page 1171 - page 1174 tables 1, 2

(57) Изобретение относится к дисперсионному раствору наночастиц альбумина, нагруженных 5FU и/или его предшественником. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или системе доставки 5FU и/или его предшественника, содержащей указанный раствор. Изобретение также относится к способу получения указанного раствора наночастиц и к применению дисперсионного раствора наночастиц, фармацевтической композиции или системы доставки 5FU и/или его предшественника в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в лечении опухолей.

041477 B1

041477 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к дисперсионному раствору наночастиц альбумина, нагруженных 5FU и/или его предшественником. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или системе доставки 5FU и/или его предшественника, содержащей указанный раствор.

Настоящее изобретение также относится к способу получения указанного раствора наночастиц и применению указанного раствора наночастиц, указанной фармацевтической композиции или указанной системы доставки 5FU и/или его предшественника в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в лечении опухолей.

Предшествующий уровень техники

5-фторурацил (5FU) и его пероральное пролекарство, капецитабин, относятся к противоопухолевым лекарственным средствам, чаще всего назначаемым для лечения опухолей. В частности, посредством 5FU лечат опухоли желудочно-кишечного тракта, молочной железы, головы и шеи.

Эффективность и побочные эффекты, ассоциированные с введением 5FU, демонстрируют внутри- и межиндивидуальную вариабельность. Вариабельность фармакокинетики (PK) 5FU ассоциируют с различными факторами, например, такими как возраст, пол, течение заболевания и функция органов.

В частности, недавно было показано, что активность осуществляющего катаболизм фермента дигидропиримидиндегидрогеназы (DPD) является одним из основных факторов, способных оказывать влияние на фармакокинетику 5FU. Действительно, у субъектов, у которых отсутствует DPD, наблюдалась мультивисцеральная токсичность, в некоторых случаях приводившая к смерти после терапии 5FU.

5FU характеризуется низким терапевтическим индексом, и терапевтический лекарственный мониторинг (TDM) 5FU (подбор дозы на основе PK/PD данных) продемонстрировал положительные эффекты, смягчая последствия неоптимальной дозировки или чрезмерного воздействия 5FU.

Побочные эффекты 5FU зависят от режима, например, миелотоксичность является основным токсическим эффектом 5FU при болюсном введении, тогда как ладонно-подошвенный синдром, стоматит, нейро- и кардиотоксичность в основном ассоциированы с непрерывными инфузиями. В настоящее время, с точки зрения безопасности и фармакодинамики, непрерывная инфузия 5FU более предпочтительна, чем болюсное введение.

Были предприняты многочисленные попытки преодолеть токсичность 5FU, например разработка пролекарств. Однако из-за внутри- и межиндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров возникли проблемы с безопасностью и необходимость фармацевтического мониторинга (TDM) в связи с приемом этих соединений.

Таким образом, в настоящее время существует необходимость в улучшении фармакокинетических и фармакодинамических (PK/PD) характеристик 5FU. В частности, существует необходимость в новых композициях 5FU, которые обеспечат контролируемое и мишень-специфическое высвобождение лекарственного средства.

В попытке преодолеть указанные трудности были произведены исследования и разработка различных систем, позволяющих модулировать доставку 5FU, например систем, основанных на применении микросфер, липосом и наночастиц. Недавно 5FU был приготовлен посредством инкапсулирования в наночастицы зеина, которые, однако, являются специфической композицией только для доставки лекарственного средства в печень.

Таким образом, по-прежнему существует высокая потребность в разработке систем доставки 5FU, в частности, подходящих для парентерального введения лекарственного средства, способных гарантировать высвобождение постоянных терапевтических концентраций лекарственного средства 5FU без необходимости повторных введений или медленных инфузий.

Решить указанные задачи позволяют предложенные автором изобретения наночастицы альбумина, нагруженные 5FU и/или его предшественником, или фармацевтическая композиция или система доставки, содержащая нагруженные наночастицы, где наночастицы характеризуются средним диаметром менее 200-220 нм и способностью высвобождать постоянно и в течение продолжительного времени терапевтически эффективные дозы лекарственного средства. Кроме того, благодаря их небольшим размерам их можно эффективно вводить парентерально, в частности, для лечения опухолей.

Настоящее изобретение также относится к способу получения наночастиц, нагруженных 5FU и/или его предшественниками, включающему следующие стадии: получение раствора альбумина и лекарственного средства, десольватация раствора добавлением растворителя по каплям, воздействие ультразвуком на десольватированный раствор, индуцирование поперечных сшивок, выделение полученных наночастиц и возможно их лиофилизация.

Преимуществом наночастиц или фармацевтической композиции/системы доставки по настоящему изобретению является их высокая стабильность, продемонстрированная высокими измеренными значениями дзета-потенциала. Кроме того, они демонстрируют низкий индекс полидисперсности и, следовательно, являются монодисперсными и гомогенными системами, т.е. каждая наночастица системы/композиции имеет в среднем одинаковые размеры. Таким образом, наночастицы или фармацевтическая композиция/система доставки по настоящему изобретению содержат и высвобождают постоянные

количества лекарственного средства в течение продолжительного периода. Наконец, наночастицы имеют размеры менее 200-220 нм и, следовательно, являются идеальной системой для введения 5FU и/или его предшественников посредством парентеральной инфузии.

Краткое описание графических материалов

Прилагающиеся ниже графические материалы позволяют более подробно описать настоящее изобретение.

На фиг. 1 показаны результаты исследований следующих растворов методом тушения флуоресценции: HSA (человеческий сывороточный альбумин) 6 мкМ; HSA 6 мкМ плюс 5FU 0,5 мкМ; HSA 6 мкМ плюс 5FU 1 мкМ и HSA 6 мкМ плюс 5FU 500 мкМ.

На фиг. 2 показаны результаты ЦУ(ультрафиолетовой)-спектроскопии комплекса HSA-5FU в трех молярных соотношениях, т.е. HSA плюс 0,5 мкМ, 1 мкМ и 500 мкМ лекарственного средства.

На фиг. 3 показаны кривые растворения свободного лекарственного средства в PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) (А) и кривая высвобождения 5FU, включенного в наночастицы альбумина, т.е. систему доставки по настоящему изобретению (Б).

Подробное описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к дисперсионному раствору наночастиц альбумина, нагруженных 5FU (5-фторурацил) или его предшественником, выбранным из: капецитабина, UFT (тегафур/урацил), S-1 (тегафур/гимерацил/отерацил), в количестве в диапазоне от 10 до 500 мкг/мл, предпочтительно от 50 до 250 мкг/мл. Более предпочтительно количество 5FU и/или его предшественника в наночастицах альбумина находится в диапазоне от 70 до 200 мкг/мл, более предпочтительно от 150 до 200 мкг/мл.

Наночастицы по настоящему изобретению характеризуются средним диаметром частиц, предпочтительно в диапазоне от 50 до 220 нм, более предпочтительно от 80 до 180 нм, еще более предпочтительно от 100 до 150 нм, еще более предпочтительно от 110 до 130 нм, еще более предпочтительно диаметр составляет приблизительно 120 нм.

Средний диаметр частиц, т.е. средний размер частиц также обозначается Z-ср. Это очень важный параметр, в частности, для парентерального введения лекарственных средств, таких как обладающие противоопухолевым действием, таких как 5FU и/или его предшественники.

В контексте настоящего изобретения под парентеральным введением понимают внутрисосудистое (внутривенозное, например посредством болюса, или внутриартериальное), внутримышечное или кожное (подкожное или интрадермальное).

Следующий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей дисперсионный раствор наночастиц, описанных выше, и приемлемые фармацевтические эксципиенты.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к системе доставки (или транспортировки) 5FU и/или его предшественников, включающей дисперсионный раствор наночастиц или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению. Таким образом, следующий аспект настоящего изобретения относится к применению дисперсионного раствора наночастиц или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в качестве системы доставки 5FU и/или его предшественников. В частности, доставка лекарственного средства предпочтительно представляет собой непрерывную доставку терапевтически эффективных доз лекарственного средства. Кроме того, доставка предпочтительно является сайт-специфической и предпочтительно осуществляется к областям, пораженным опухолями.

В некоторых воплощениях массовое соотношение между указанным 5FU и/или его предшественником и указанным альбумином находится в диапазоне предпочтительно от 0,005 до 4; более предпочтительно от 0,01 до 1, еще более предпочтительно от 0,025 до 0,8, еще более предпочтительно от 0,05 до 0,4, еще более предпочтительно составляет приблизительно 0,2. Другими словами, процентное отношение (мас./мас.) 5FU и/или предшественника к альбумину в наночастицах/фармацевтической композиции/системе доставки находится в диапазоне от 0,5 до 400; более предпочтительно от 1 до 100, еще более предпочтительно от 2,5 до 80, еще более предпочтительно от 5 до 40, еще более предпочтительно составляет приблизительно 20.

Преимуществом наночастиц/фармацевтической композиции/системы доставки по настоящему изобретению является высокая стабильность. Действительно, они обладают дзета-потенциалом, который находится в диапазоне предпочтительно от 20 до 80 мВ, предпочтительно от 30 до 60 мВ, еще более предпочтительно от 35 до 50 мВ.

В контексте настоящего изобретения под дзета-потенциалом понимают электрический потенциал между дисперсионной средой наночастиц и двойным электрическим слоем сольватированных наночастиц. Дзета-потенциал представляет собой показатель стабильности (т.е. более низкую склонность к коагесценции) наночастиц. Как правило, потенциал от 30 до 40 мВ является показателем умеренной стабильности. Потенциал от 40 до 60 мВ является показателем хорошей стабильности.

Преимуществом наночастиц/фармацевтической композиции/системы доставки по настоящему изобретению также является очень гомогенная система и, следовательно, высокое качество. Действительно, они имеют индекс полидисперсности, который предпочтительно находится в диапазоне от 0,01 до 1; бо-

лее предпочтительно от 0,05 до 0,5, еще более предпочтительно от 0,07 до 0,3.

Индекс полидисперсности, или PDI, представляет собой параметр, который учитывает распределение наночастиц по размерам. Чем ниже PDI, тем более гомогенным является образец.

В предпочтительном воплощении изобретения предшественник 5FU выбран из: капецитабина, UFT (тегафур/урацил), S-1 (тегафур/гимерацил/отерацил), ингибиторов дигидропиримидиндегидрогеназы и фолиевой кислоты.

В другом предпочтительном воплощении изобретения альбумин может представлять собой целый белок или его фрагменты. Предпочтительно он является человеческим, в частности, выделен из сыворотки, предпочтительно человеческой. Предпочтительно он характеризуется молекулярной массой в диапазоне от 50000 до 100000 Да, предпочтительно от 60000 до 70000 Да.

Альбумин, применяемый в настоящем изобретении, предпочтительно выделен в соответствии с процедурами, регламентируемыми ЕС (Европейская комиссия), т.е. при GMP (надлежащая производственная практика), и предпочтительно является отрицательным по меньшей мере по одному из следующих белков: гепатита В (HbsAg) и/или антителам к вирусу иммунодефицита человека (HIV) и/или антителам к вирусу гепатита С (HCV). Альбумин по настоящему изобретению предпочтительно имеет основное досье плазмы.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к дисперсионному раствору наночастиц/фармацевтической композиции/системе доставки для применения в качестве лекарственного средства.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к дисперсионному раствору наночастиц/фармацевтической композиции/системе доставки для применения в лечении опухолей.

При медицинском применении предпочтительно рекомендуется парентеральное введение 5FU и/или его предшественников, предпочтительно внутрисосудистое, более предпочтительно внутривенное, предпочтительно болюсное или внутриаартериальное.

В альтернативном варианте введение является внутримышечным или кожным, предпочтительно подкожным или интрадермальным.

Дисперсионный раствор наночастиц/фармацевтическая композиция/система доставки по настоящему изобретению предпочтительно обеспечивает постоянное высвобождение 5FU и/или его предшественника, составляющее приблизительно 10% от количества изначально загруженного лекарственного средства. Высвобождение предпочтительно продолжается вплоть до 24 ч или более, предпочтительно при парентеральном введении. Другими словами, эффективность высвобождения наночастиц/фармацевтической композиции/системы доставки по настоящему изобретению составляет приблизительно 10% от количества загруженного лекарственного средства.

Количества лекарственного средства, постоянно высвобождаемого наночастицами/фармацевтической композицией/системой доставки по настоящему изобретению, составляют приблизительно 10-50 мкг/мл, предпочтительно 15-30 мкг/мл, более предпочтительно 17-22 мкг/мл.

Опухоли, поддающиеся лечению предпочтительно с помощью дисперсионного раствора наночастиц или фармацевтической композиции или системы доставки 5FU по настоящему изобретению, выбраны из карциномы толстой кишки, карциномы прямой кишки, аденокарциномы желудка, опухоли головы/шеи, карциномы печени, карциномы поджелудочной железы, перитонеального карциноматоза, карциномы пищевода, карциномы молочной железы, карциномы яичника, мелкоклеточной опухоли легкого, немелкоклеточной опухоли легкого, неинвазивной поверхностной карциномы мочевого пузыря, саркомы Капоши и саркомы мягких тканей, предпочтительно опухоль выбрана из карциномы толстой кишки, карциномы прямой кишки, аденокарциномы желудка, карциномы поджелудочной железы, карциномы молочной железы, мелкоклеточной опухоли легкого, немелкоклеточной опухоли легкого, неинвазивной поверхностной карциномы мочевого пузыря.

В предпочтительном воплощении изобретения дисперсионный раствор наночастицы или фармацевтическую композицию или систему для транспортировки 5FU по настоящему изобретению можно вводить в комбинации, по меньшей мере, с химиотерапевтическим агентом, и/или с лучевой терапией, и/или с хирургическим вмешательством.

Следующее воплощение изобретения относится к способу лечения опухолей, включающему стадии введения пациенту терапевтически эффективного количества дисперсионного раствора наночастиц, нагруженных 5FU и/или его предшественником, или композиции или системы доставки, содержащей указанные наночастицы, при этом наночастицы/фармацевтическая композиция являются такими, как описано выше. Опухоли, лечение которых осуществляют, предпочтительно представляют собой такие, как указано выше.

Следующий предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения дисперсионного раствора наночастиц, содержащих альбумин и 5FU и/или его предшественник, включающему стадии

(1) приготовление раствора, предпочтительно водного, альбумина и 5FU и/или его предшественника;

(2) добавление к водному раствору, полученному на стадии (1), органического растворителя, пред-

почтительно спиртового, более предпочтительно этанола, по каплям, предпочтительно при перемешивании (стадия прокапывания);

(3) воздействие ультразвуком на композицию, полученную на стадии (2);

(4) индуцирование поперечных сшивок, предпочтительно добавлением глутарового альдегида; и возможно

(5) выделение дисперсионного раствора наночастиц, полученного на стадии (2) предпочтительно посредством центрифугирования/ультрацентрифугирования.

В альтернативном варианте способ по настоящему изобретению можно также определить как способ получения наночастиц альбумина, нагруженных 5FU и/или его предшественником.

Альбумин и 5FU и/или его предшественник предпочтительно присутствуют в растворе стадии (1) в процентном соотношении (мас./мас.) SFU/альбумин, которое предпочтительно находится в диапазоне от 2,5 до 60, более предпочтительно от 5 до 40. Раствор имеет значение pH, которое находится в диапазоне от 8 до 10, более предпочтительно от 8,5 до 9, еще более предпочтительно составляет приблизительно 8,6.

Два компонента стадии (1) предпочтительно оставляют реагировать в течение времени предпочтительно от 1 до 72 ч, более предпочтительно от 1 до 48 ч, еще более предпочтительно в течение приблизительно 24 ч.

В предпочтительном воплощении изобретения стадию (1) осуществляют при приблизительно 25°C и при приблизительно 600 об/мин.

В следующем предпочтительном воплощении изобретения количество растворителя, добавляемого на стадии (2), зависит от pH раствора стадии (1).

Стадию (2) предпочтительно осуществляют при скорости прокапывания приблизительно 0,5-2 мл/мин, предпочтительно приблизительно 1 мл/мин.

В предпочтительном воплощении изобретения стадию (3) осуществляют в течение 5-10 мин, предпочтительно приблизительно 5 мин, при приблизительно 25°C и приблизительно 600 об/мин.

В предпочтительном воплощении изобретения количество образующего поперечные сшивки агента стадии (4), предпочтительно глутарового альдегида, относительно альбумина находится в диапазоне от 50 до 150 мг на 1 мг альбумина, более предпочтительно от 80 до 120 мг на 1 мг альбумина, еще более предпочтительно от 90 до 100 мг на 1 мг альбумина, еще более предпочтительно составляет приблизительно 94 мг на 1 мг альбумина.

В качестве альтернативы глутаровому альдегиду в качестве агента, образующего поперечные сшивки, можно использовать UV (ультрафиолетовое) излучение, возможно в присутствии многоатомного спирта, такого как глюкоза, манноза или эритроза, в концентрации в диапазоне предпочтительно от 1 до 10 мМ, или осуществлять образование поперечных сшивок посредством дисульфидных мостиков.

В предпочтительном воплощении изобретения центрифугирование/ультрацентрифугирование стадии (5) предпочтительно осуществляют при приблизительно 10000 об/мин в течение времени, которое предпочтительно составляет 10-15 мин, при температуре, которая предпочтительно составляет приблизительно 10°C.

В предпочтительном воплощении изобретения рекомендуется доводить pH раствора при помощи NaOH, предпочтительно 0,01M NaOH.

Возможно после стадии (4) или (5) нагруженные наночастицы или фармацевтическую композицию или систему доставки, содержащие нагруженные наночастицы, можно лиофилизировать.

Стадию лиофилизации предпочтительно осуществляют посредством ресуспендирования выделенных наночастиц предпочтительно посредством центрифугирования/ультрацентрифугирования в солевом растворе, таком как PBS, с нейтральным значением pH, предпочтительно при значении pH в диапазоне от 7 до 7,6, более предпочтительно при pH, составляющем приблизительно 7,4.

Предпочтительно к солевому раствору добавляют криопротектор, например глюкозу, трегалозу, маннит, сахарозу, эритрозу или β -циклодекстрин, предпочтительно гидроксипропил- β -циклодекстрин. Концентрация криопротектора предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 10%.

Затем раствор замораживают, предпочтительно при приблизительно -20°C и затем лиофилизируют.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к дисперсионному раствору наночастиц, полученному/получаемому способом по настоящему изобретению, или к фармацевтической композиции или системе доставки 5FU и/или его предшественников, содержащей полученные таким образом наночастицы.

Указанные наночастицы характеризуются средним диаметром частиц, предпочтительно в диапазоне от 50 до 220 нм, более предпочтительно от 80 до 180 нм, еще более предпочтительно от 100 до 150 нм, еще более предпочтительно от 110 до 130 нм, еще более предпочтительно средний диаметр частиц составляет приблизительно 120 нм.

Наночастицы по настоящему изобретению предпочтительно нагружены лекарственным средством с эффективностью, которая находится в диапазоне от 5 до 40%, предпочтительно от 7 до 20%. Касательно загруженного лекарственного средства применительно к массовым соотношениям альбумина и лекарст-

венного средства, описанным выше, это означает количество лекарственного средства в диапазоне от 10 до 500 мкг/мл, предпочтительно от 50 до 250 мкг/мл. Более предпочтительно количество 5FU и/или его предшественника находится в диапазоне от 70 до 200 мкг/мл, еще более предпочтительно от 150 до 200 мкг/мл.

Наночастицы/фармацевтическая композиция/система доставки по настоящему изобретению обеспечивают постоянное высвобождение 5FU и/или его предшественника, которое составляет приблизительно 10% от количества изначально нагруженного лекарственного средства. Высвобождение предпочтительно продолжается вплоть до 24 ч или более, предпочтительно при парентеральном введении. Другими словами, эффективность высвобождения у наночастиц/фармацевтической композиции/системы доставки по настоящему изобретению составляет приблизительно 10% от количества загруженного лекарственного средства.

Количества лекарственного средства, постоянно высвобождаемого наночастицами/фармацевтической композицией/системой доставки по настоящему изобретению, составляют приблизительно 10-50 мкг/мл, предпочтительно 15-30 мкг/мл, более предпочтительно 17-22 мкг/мл.

Пример осуществления изобретения.

Исследования связывания 5FU с HSA.

HSA представляет собой глобулярный белок, который имеет различные сайты связывания. Большинство молекул связываются с двумя сайтами, которые обозначают как сайт I (суб-домен IIА) и сайт II (суб-домен IIIА).

Bertucci et al. показали, что 5FU предпочтительно связывается с сайтом I альбумина. Поскольку данные, представленные в литературе, ограничены, провели более глубокие исследования, в частности компьютерное моделирование и физико-химическую оценку связывания 5FU с человеческим сывороточным альбумином.

Компьютерное моделирование.

В компьютерном анализе связи 5FU-HSA использовали молекулярный докинг, применяя в качестве программных средств прогнозирования Autodock 4.2 и FRED (программное обеспечение OpenEyeScientific).

В целом, исследования молекулярного докинга позволяют предсказывать виды связывания соединений с их мишенями. Виды связывания обозначаются техническим термином позиция, каждой позиции соответствует определенный индекс докинга. Более конкретно связь считают более предпочтительной по мере уменьшения индекса (т.е. при его более отрицательных значениях).

Трехмерную структуру HSA получали при поисковом запросе с сайта pdb.org (банк данных белковых структур) и использовали структуру PDB: 2BXF без присутствия лигандов. Файлы со структурой 5FU, аспирина и паклитаксела получили с сайта pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Вначале выполнили "слепой" докинг 5FU, не принимая во внимание какой-либо конкретный сайт HSA. Фактически, "слепой" докинг является аппроксимационной процедурой, поскольку молекулярный докинг осуществляют со всей фармакологической мишенью. Применительно к 5FU большинство позиций были локализованы в сайте I (суб-домен IIА).

Затем провели более точные расчеты, сфокусированные на докинге 5FU в субдомене IIА. Начальные расчеты проводили в программе Autodock 4.2, а затем в программе FRED.

Химико-физическая характеристика.

HSA (свободный от жирных кислот, Sigma Aldrich©) и 5FU (аналитической степени чистоты, Sigma Aldrich) растворяли в PBS с pH 7,2 для получения маточных растворов (альбумин 60 мкМ, 5FU 10 мМ, 1 мМ, 10 мкМ). Маточные растворы хранили при 4°C во флаконах из темного стекла, соблюдая условия, указанные поставщиком.

Растворы аналитов готовили в лунках черного многолуночного планшета FluoroNuncThermoscientific©, в максимальном объеме до 200 мкл.

Многолуночные планшеты инкубировали в течение 12 ч при 4°C, после чего регистрировали флуоресценцию.

Спектры испускания флуоресценции регистрировали с применением многоканального считывающего устройства Varioskan Flash © при длине волны возбуждения λ_{ex} , равной 295 нм, ширине полосы 5 нм, в спектральном диапазоне 300-440 нм, при длительности измерения 300 мс, температуре прибора 24°C.

При 295 нм не происходило возбуждения и флуоресценции 5FU в анализируемом спектральном диапазоне.

Очень слабую флуоресценцию 5FU в указанном выше диапазоне выявили при более высоких концентрациях (500 мкМ - 4 относительных единицы флуоресценции RFU).

Для спектроскопии поглощения в UV и видимой области растворы аналитов готовили в лунках прозрачного для UV и видимого излучения многолуночного планшета (многолуночный планшет Corning UV-Star ©), в максимальном объеме до 200 мкл. Спектры в UV и видимом диапазоне регистрировали с применением многоканального считывающего устройства Varioskan Flash© при ширине полосы 5 нм, в

спектральном диапазоне 200-440 нм, при температуре прибора 24°C.

Результаты.

5FU предпочтительно связывается с I сайтом HSA, образуя водородные связи со следующими остатками HSA: Lys 189, Arg 222, Glu 292. Триптофан 214 расположен вблизи этих остатков. Исследования тушения флуоресценции продемонстрировали, что образуется связь с 5FU/I домен HSA.

На фиг. 1 показаны спектры флуоресценции следующих растворов:

HSA 6 мкМ;

HSA 6 мкМ плюс 5FU 0,5 мкМ;

HSA 6 мкМ плюс 5FU 1 мкМ;

HSA 6 мкМ плюс 5FU 500 мкМ.

Результаты, приведенные на фиг. 1, демонстрируют, что при увеличении концентрации лекарственного средства происходит тушение флуоресценции. Кроме того, при высоких концентрациях 5FU наблюдается батохромный эффект (красный сдвиг), указывающий, что Trp214 оказывается в более полярном окружении (становится более доступным для растворителя). Эти данные согласуются с фактом, что карман HSA, в котором происходит связывание 5FU (данные компьютерного моделирования), обеспечивает гидрофильное окружение.

Кроме того, после связывания с 5FU может происходить изменение конформации HSA, в результате чего Trp214 оказывается в более полярном окружении.

Кроме того, наблюдали, что при концентрации 5FU 500 мкМ образуется изобестическая точка, что указывает на то, что при этой концентрации реакция образования комплекса 5FU/HSA находится в равновесном состоянии, т.е. скорость образования комплекса равна скорости диссоциации.

Чтобы установить, обусловлено ли тушение 5FU динамическим процессом, т.е. простым соударением 5FU с флуорофором Trp214, или статическим процессом, т.е. образованием стабильной связи 5FU/HSA и, следовательно, стабильным изменением вблизи Trp214, провели анализ UV спектра комплексов, рассматривая два различных молярных соотношения HSA/5FU (6 мкМ/1 мкМ - 6 мкМ/500 мкМ).

При низких концентрациях 5FU влияния на спектр HSA не было. Это указывает на то, что при низких концентрациях (далеких от равновесия) истинный комплекс HSA/5FU не образуется.

Напротив, при высоких концентрациях присутствует существенное влияние на спектр HSA, как показано на фиг. 2. Это означает, что 5FU стабильно связывается с HSA, что указывает на статическое тушение флуоресценции.

В заключение, данные компьютерного моделирования и данные флуоресценции и UV спектроскопии указывают на то, что образуется стабильная связь 5FU/HSA. Это связывание происходит в субдомене IIА, или сайте I, с высокой вероятностью указывая на изменение конформации сайта, повышающее его гидрофильность (батохромный эффект).

Получение наночастиц альбумина

Десольватированный раствор альбумина получали путем растворения 200 мг человеческого сывороточного альбумина (HSA) в 2 мл бидистиллированной воды (концентрация 10% мас./об). Затем pH раствора доводили до различных значений с помощью 0,01M раствора NaOH.

Затем добавляли 8 мл абсолютного этанола в форме капель (объем добавленного этанола представляет собой функцию от концентрации белка), при перемешивании при 600 об/мин, со скоростью прокапывания приблизительно 1,0 мл/с.

Образование поперечных сшивок осуществляли посредством добавления 235 мкл 8% глутарового альдегида (эквивалентно 1,175 мкл глутарового альдегида на 1 мг HSA). Образец оставляли при перемешивании в течение 24 ч при температуре окружающей среды.

Наночастицы выделяли посредством центрифугирования при 10000 об/мин в течение 12 мин при 10°C.

Наконец, наночастицы ресуспендировали в воде и затем подвергали воздействию ультразвука в течение 5 мин.

Реализовали следующие варианты композиций, где вариации относились к pH, температуре, способу ультразвукового воздействия, количеству глутарового альдегида.

В частности, сводная информация о протестированных композициях приведена в следующей таблице в колонке "Партия". Их реализовали в экспериментальных условиях, представленных в табл. I.

Таблица I

Партия	pH	Температура	Скорость прокапывания	Скорость перемешивания (P) 600 об/мин/UT 25 (U)	Объем глутарового альдегида (мкл)	Ультразвуковое воздействие (5 мин)	Способ ультразвукового воздействия
НРОHSA 1	8,6	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	-	-
НРОHSA 2	8,6	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	до глут.	баня
НРОHSA 3	8,6	комнатная	приблизительно 1,5 мл/мин	p	235	после глут.	баня
НРОHSA 4	8,6	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	после образования поперечных сшивков	баня
НРОHSA 5	8,2	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	до глут.	зонд
НРОHSA 6	10	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	до глут.	зонд
НРОHSA 7	8,6	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	до глут.	баня
НРОHSA 8	8,6	2-3°C	приблизительно 1 мл/мин	p	235	вместе с EtOH	баня
НРОHSA 9**	8,6	комнатная	приблизительно 1 мл/мин	p	235	до глут.	баня

Физико-химическая характеристика наночастиц.

Наночастицы исследовали с использованием Zetasizer Nano ZS 90, в котором для определения среднего диаметра частиц (Z-ср), индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала наночастиц используется фотонно-корреляционная спектроскопия.

Анализ размеров проводили с использованием динамического рассеяния света (DLS).

Образцы разводили 1:10 бидистиллированной водой, чтобы избежать феномена многократного рассеяния. Полученные данные представлены в табл. II ниже.

Таблица II

Партия	**Z-ср (нм)	*PDI	Дзета-потенциал (мВ)	pH
НРОHSA 1	167±3,345	0,156± 0,013	-50,4±2,51	8,6
НРОHSA 2	141,2 ±0,493	0,235± 0,04	-43,3±1,10	8,6
НРОHSA 3	-----	-----	-----	8,6
НРОHSA 4	125,4±1,159	0,256±0,012	-	8,6
НРОHSA 5	144,6±3915	0,217±0016	-46,2±2,0	8,2
НРОHSA 6	104,4±2,669	0,158±0,011	-48,5±1,6	10
НРОHSA 7	202,1±12,41	0,244±0,003	-39,2±1,18	8,6
НРОHSA 8	88,76±6,428	0,282±0,012	-	8,6
НРОHSA 9	109,0±1,909	0,182±0,007	-43,3±1,10	8,6
Среднее партий 2/9	125,45	0,208	-43,3	-

Как можно отметить на основании результатов, приведенных в таблице, полученные частицы имели диаметр менее 200 нм (среднее значение диаметра 125,45 нм), и, следовательно, это обеспечивает возможность инфузии наночастиц (i.v. (внутривенно)) посредством непрерывной и продолжительной инфузии.

Включение лекарственного средства

Наночастицы HSA, нагруженные 5FU, получали путем включения лекарственного средства в белковый матрикс, что осуществляли посредством солюбилизации лекарственного средства с белком и по-

следующей десольватации для получения наночастиц.

Способ включения в ходе стадии десольватации.

Все стадии способа проводили в темноте.

Лекарственное средство (в количествах, представленных в табл. III) растворяли совместно с HSA в 2 мл воды. Затем оставляли перемешиваться при 600 об/мин в течение различного времени (исследовали от 2 до 24 ч) при 25°C для обеспечения адсорбции лекарственного средства на белке.

Контролировали значение pH раствора и возможно доводили при помощи 0,01M NaOH. Исследовали различные значения pH, и наилучшие результаты получили при pH 8,6.

Затем происходит десольватация, с приблизительно 8 мл этанола и воздействием ультразвуком в течение 5 мин в бане при 25°C и 600 об/мин.

Затем образец подвергают стадии образования поперечных сшивок (с 235 мкл 8% глутарового альдегида).

Полученные наночастицы выделяют посредством центрифугирования (10000 об/мин, при 10°C в течение 10 мин) и определяют содержание 5FU в надосадочной жидкости.

Эффективность инкапсулирования определяли косвенным образом в надосадочной жидкости, путем вычитания количества 5FU вне наночастиц по отношению к загруженному количеству. Затем анализировали образцы посредством HPLC-MS (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) для определения содержания лекарственного средства вне наночастиц.

EE (эффективность инкапсулирования) (%) = масса лекарственного средства в МР (наночастицах) × 100 / масса загруженного лекарственного средства.

Масса лекарственного средства в NP = масса загруженного лекарственного средства - масса лекарственного средства в надосадочной жидкости.

Химико-физическую характеризацию наночастиц осуществляли с использованием Zetasizer Nano ZS90 для определения их размера и поверхностной нагрузки (мВ), а также анализировали EE (%) и содержание лекарственного средства в системах, нагруженных лекарственным средством.

Эффективность инкапсулирования лекарственного средства определяли посредством HPLC-MS/MS (высокоэффективная жидкостная хроматография/танDEMная масс-спектрометрия) различных образцов, полученных в описанных выше экспериментальных условиях.

Резюмируя, эффективность инкапсулирования определяли 1) косвенным образом в надосадочной жидкости путем вычитания количества 5FU вне наночастиц по отношению к загруженному количеству; и 2) напрямую, после экстракции лекарственного средства из наночастиц, выделенных посредством центрифугирования, при 1000 об/мин при 4°C в течение 15 мин. Осадки обрабатывали 1 мл MeOH и помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Образцы анализировали посредством HPLC-MS для определения содержания лекарственного средства. Все образцы разводили в 100 раз.

Таблица III

Партия	**Z-ср (нм)	*PDI	Дзета-потенциал (мВ)	pH	Масс.% 5-FU/HSA
NP1HSA 10	123,3 ± 0,073	0,078± 0,020	-44,4± 2,06	8,6	20
NP1HSA 11	114,4± 0,404	0,146± 0,018	-35,8±2,11	8,6	40
NP1HSA 12	147,0±1,637	0,275±0,030	-42,5± 0,153	10,0	40
NP1HSA 10 bis	120,5 ± 0,122	0,198± 0,056	-43,4± 7,56	8,6	20
NP1HSA 10 ter	-	-	-	8,6	20
NP1HSA 14	-	-	-	8,6	5

В табл. IV представлены обобщенные результаты.

Таблица IV

Композиция	Примечания	EE% (масс. %)	Содержание лекарственного средства мг/мл
NP1HSA 10	123,3 ± 0,073	7,4	102,3
NP1HSA 11	114,4± 0,404		
NP1HSA 12	147,0±1,637		
NP1HSA 10 bis *	120,5 ± 0,122	20,9	190
NP1HSA 10 ter	еще не проанализировали на Zetasizer		
NP1HSA 14	еще не проанализировали на Zetasizer	12	73,4

* образец инкубировали в течение времени 24 ч при pH 8,6

Затем анализы концентрировались на партиях NP1HSA 10 ter, 11 и 12.

Результаты демонстрируют, что время инкубации является определяющим фактором для увеличения эффективности инкапсулирования.

Действительно, для образца, отмеченного как партия NP1HSA10 bis, при получении которого время инкубации альбумина и 5FU составило 24 ч при pH 8,6, продемонстрирована EE (%), которая выше, чем для всех остальных образцов в анализируемой группе на данный момент.

В заключение, способ по настоящему изобретению позволяет получить наночастицы HSA/5FU с эффективностью инкапсулирования 20%, и наночастицы содержат 5FU в количестве приблизительно 190 мкг/мл.

Кинетика высвобождения лекарственного средства

Провели анализ с симуляцией парентерального введения образца NP1HSA10 bis (EE 20,9% и загрузка лекарственного средства 190 мкг/мл).

В частности, в качестве среды, в которую происходит высвобождение, использовали PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с pH, равным 7,4. Использовали способ микродиализа посредством системы, известной под названием QuixSep® с мембраной Spectra/pog®, MWCO (отсечение по молекулярной массе) 3500 кДа.

Систему поддерживали при постоянном перемешивании магнитной мешалкой, при температуре окружающей среды, отбирая образцы среды, в которую происходит высвобождение в заданные моменты времени, и возмещающая забранный объем.

Также проводили эксперимент с растворением свободного лекарственного средства (раствор 5FU в PBS с концентрацией 200 мкг/мл).

Образцы лекарственного средства, содержащие 5FU, анализировали как методом масс-спектрометрии (LC-MS/MS), так и методом спектрофотометрии в UV-VIS (в ультрафиолетовой и видимой части спектра) при λ , равной 265,0 нм.

Образцы анализировали и полученные значения наносили на график с учетом однократных отборов и возмещений предшествующей стадии, чтобы получить профиль растворения/высвобождения.

Результаты представлены на фиг. 3, где показаны кривые растворения свободного лекарственного средства в PBS (A) и кривая высвобождения 5FU, включенного в наночастицы альбумина.

Данные, относящиеся к проценту высвобождения, рассчитывали на основе нагрузки лекарственным средством, определенной посредством анализа LC-MS/MS.

Профиль растворения свободного лекарственного средства демонстрировал тенденцию к увеличению в течение 60 мин, достигая растворения 70%.

За процессом наблюдали в течение 2 ч (120 мин).

В случае лекарственного средства, включенного в наночастицы, количества высвобождаемого системой лекарственного средства увеличивались в течение 2 ч, затем высвобождение с течением времени было постоянным, достигая приблизительно 10%.

Через 6 ч наблюдалось небольшое увеличение процента высвобождения, вплоть до максимального значения 17%.

Кратко, результаты демонстрируют, что система доставки 5FU, объект изобретения, способна постоянно высвобождать в течение 24 ч приблизительно 19 мкг/мл 5FU.

Расчеты проводили с учетом нагрузки лекарственным средством 190 мкг/мл и процента высвобождения, составляющего 10%.

Указанные результаты являются очень хорошими с учетом того факта, что в литературе описаны системы, у которых Стах (максимальная концентрация) после введения болюса 5FU 600 мг составляет приблизительно 50 мкг/мл для поверхности тела 1,7. Кроме того, подчеркивается, что в указанных условиях концентрация 5FU в плазме через 25 мин составляет 10 мкг/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дисперсионный раствор наночастиц альбумина, нагруженных 5FU (5-фторурацил) или его предшественником, выбранным из капецитабина, UFT (тегафур/урацил), S-1 (тегафур/гимерацил/отерацил), отличающийся тем, что

1) количество 5FU или указанного предшественника находится в диапазоне от 10 до 500 мкг/мл по отношению к дисперсионному раствору наночастиц;

2) средний диаметр частиц находится в диапазоне от 80 до 180 нм;

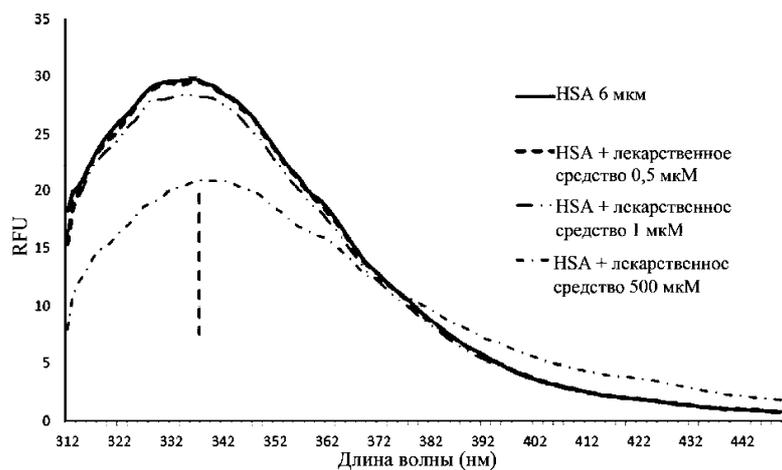
3) массовое соотношение между указанным 5FU или указанным предшественником и указанным альбумином находится в диапазоне от 0,05 до 0,6;

и где указанный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

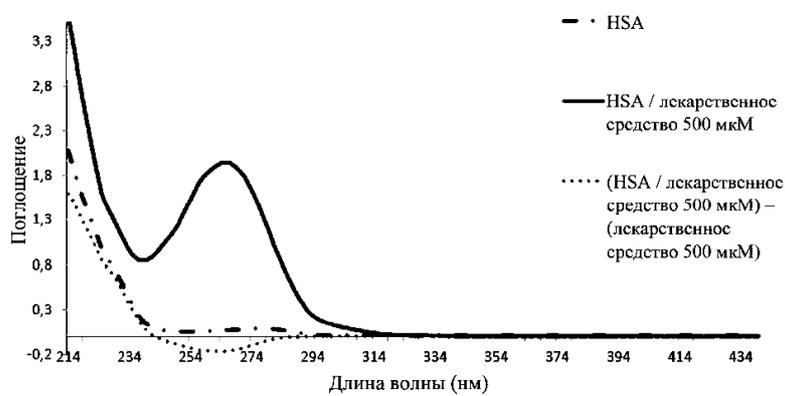
2. Дисперсионный раствор наночастиц по п.1, где количество 5FU или его предшественника находится в диапазоне от 150 до 200 мкг/мл.

3. Дисперсионный раствор наночастиц по п.1, где средний диаметр частиц находится в диапазоне от 110 до 130 нм.

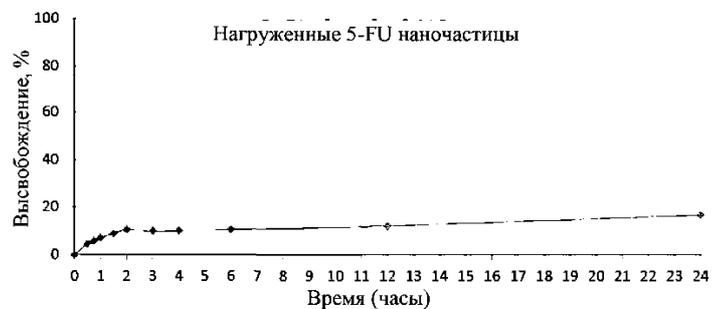
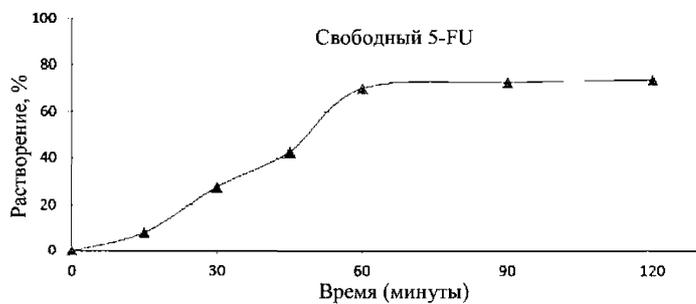
4. Фармацевтическая композиция, содержащая дисперсионный раствор наночастиц по п.1.
5. Система для транспортировки 5FU или его предшественника, содержащая дисперсионный раствор наночастиц по п.1 или композицию п.4.
6. Система для транспортировки 5FU или его предшественника по п.5, где наночастицы характеризуются дзета-потенциалом, который находится в диапазоне от 20 до 80 мВ.
7. Система для транспортировки 5FU или его предшественника по п.5, где наночастицы характеризуются индексом полидисперсности, который находится в диапазоне от 0,01 до 1.
8. Система для транспортировки 5FU или его предшественника по п.5, где альбумин имеет молекулярную массу в диапазоне от 50000 до 100000 Да.
9. Применение дисперсионного раствора наночастиц по п.1 в качестве системы для транспортировки 5FU или его предшественника.
10. Применение композиции по п.4 в качестве системы для транспортировки 5FU или его предшественника.
11. Способ лечения опухоли, включающий стадию введения индивидууму, которому это необходимо, эффективного количества дисперсионного раствора наночастиц по п.1, или композиции по п.4, или системы для транспортировки 5FU или его предшественника по п.5.
12. Способ по п.11, где опухоль выбрана из карциномы толстой кишки, карциномы прямой кишки, аденокарциномы желудка, опухоли головы/шеи, карциномы печени, карциномы поджелудочной железы, перитонеального карциноматоза, карциномы пищевода, карциномы молочной железы, карциномы яичника, мелкоклеточной опухоли легкого, немелкоклеточной опухоли легкого, неинвазивной поверхностной карциномы мочевого пузыря, саркомы Капоши и саркомы мягких тканей, предпочтительно опухоль выбрана из карциномы толстой кишки, карциномы прямой кишки, аденокарциномы желудка, карциномы поджелудочной железы, карциномы молочной железы, мелкоклеточной опухоли легкого, немелкоклеточной опухоли легкого, неинвазивной поверхностной карциномы мочевого пузыря.
13. Способ по п.11, где указанные дисперсионный раствор наночастиц, или композицию, или систему вводят парентерально.
14. Способ по п.11, где указанные дисперсионный раствор наночастиц, или композицию, или систему вводят внутривенно.
15. Способ по п.11, где указанные дисперсионный раствор наночастиц, или композицию, или систему вводят посредством болюса.
16. Способ по п.11, где указанные дисперсионный раствор наночастиц, или композицию, или систему вводят в комбинации с введением, по меньшей мере, химиотерапевтического агента и/или с лучевой терапией и/или с хирургическим вмешательством.
17. Способ получения дисперсионного раствора наночастиц в соответствии с п.1, включающий стадии, на которых
 - (1) готовят раствор альбумина и 5FU или его предшественника, в котором процентное соотношение (мас./мас.) 5FU/альбумин находится в диапазоне от 2,5 до 60 при pH в диапазоне от 8 до 10, и оставляют эти два компонента прореагировать в течение времени от 1 до 72 ч;
 - (2) добавляют к раствору, полученному на стадии (1), органический растворитель по каплям (стадия прокапывания);
 - (3) воздействуют ультразвуком на композицию, полученную на стадии (2);
 - (4) индуцируют поперечные сшивки и
 - (5) выделяют дисперсионный раствор наночастиц, полученный на стадии (2).
18. Способ по п.17, где раствор альбумина представляет собой водный раствор.
19. Способ по п.17, где органический растворитель добавляют при перемешивании.
20. Способ по п.17, где поперечные сшивки индуцируют путем добавления глутарового альдегида.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

