

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201890599** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2018.11.30**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.10.29**

---

**(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ**

---

**(86)** PCT/RU2015/000721

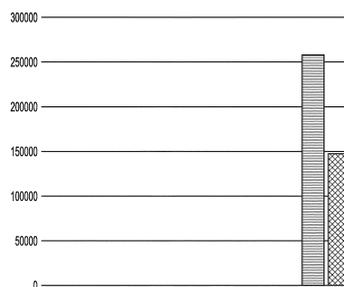
**(87)** WO 2017/074211 2017.05.04

**(71)** Заявитель:  
**СиЭлЭс ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД  
(GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Генкин Дмитрий Дмитриевич, Тец  
Георгий Викторович, Тец Виктор  
Вениаминович (RU)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(57)** Изобретение относится к применению фермента дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) с целью предотвращения или облегчения токсичности, связанной с различными цитостатическими и/или цитотоксическими химиотерапевтическими соединениями и лучевой терапией.



**201890599**

**A1**

**A1**

**201890599**

# **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 62 / 014,341, поданной 19 июня 2014 года, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Изобретение относится к применению фермента дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) для предотвращения или облегчения токсичности, связанной с различными цитостатическими и/или цитотоксическими химиотерапевтическими препаратами и лучевой терапией.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Раковые заболевания вносят существенный вклад в причины смертности у людей. В настоящее время передовыми методами лечения рака являются хирургический, радиационный, а также цитостатическая и/или цитотоксическая химиотерапия. Несмотря на достижения в области химиотерапевтического лечения, большинство методов химиотерапевтического лечения связаны с серьезными побочными эффектами, включая миелопатию, гематопатию, расстройства пищеварения (тошноту, рвоту, анорексию, диарею, запор), легочную недостаточность, дерматопатию, расстройства нервной системы, эндокринные расстройства, генитальные расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, гепатопатию, расстройство поджелудочной железы, нефропатию, заболевания мочевого пузыря, гиперурикемию, снижение иммунокомпетентности, инфекции, гиперчувствительность к свету, выпадение волос и т. д. (2-5). Эти побочные эффекты представляют угрозу для жизни или серьезно ослабляют пациентов и являются существенными факторами заболеваемости и смертности, связанной с применением химиотерапии.

Одним из основных осложнений химиотерапевтического лечения рака является повреждение или подавление функций костного мозга. В частности, химиотерапия повреждает или разрушает гемопоэтические клетки-предшественники, преимущественно локализованные в костном мозге и селезенке, приводя к нарушению продукции новых клеток крови (гранулоцитов, лимфоцитов, эритроцитов, моноцитов, тромбоцитов и т.д.). Многие пациенты, страдающие от рака, умирают от инфекции или других последствий гемопоэтической недостаточности после окончания химиотерапии. Химиопрепараты также могут приводить к субнормальному образованию тромбоцитов, что может быть причиной предрасположенности к кровоизлиянию. Ингибирование созревания эритроцитов может привести к анемии. Так же недавно было показано, что разработка более мощных цитотоксических методов лечения и более эффективных схем химиотерапии для более широкого спектра злокачественных новообразований значительно увеличивает частоту серьезного токсического нежелательного явления, называемого синдромом лизиса опухоли (СЛО,

TLS) (16). СЛО (TLS) представляет собой группу метаболических осложнений, которые могут возникать в результате введения цитотоксических препаратов, наиболее часто в случае химиотерапевтического лечения лимфом и лейкозов, и вызваны продуктами клеточного распада отмирающих клеток.

Основная причина серьезности симптомов и плохой переносимости химиотерапии заключается в том, что химиотерапевтические препараты часто не могут различать нормальные здоровые клетки и опухолевые клетки, для нацеливания на которые они предназначены. Другой механизм, обуславливающий токсическое осложнение химиотерапевтического лечения, заключается в токсическом воздействии клеточных компонентов, высвобождаемых из клеток, подвергающихся некрозу или апоптозу в результате гибели клеток, вызванной химиотерапией.

Побочные эффекты, связанные с приемом химиотерапевтических препаратов, ограничивают частоту и дозировку, при которых могут быть введены указанные препараты, приводя к снижению эффективности.

По мере развития концепции цитотоксической системной химиотерапии было проведено множество научно-исследовательских работ с целью определить возможные способы уменьшения токсических осложнений химиотерапии и избежать остановку приема пациентами химиотерапевтических препаратов. Один возможный подход заключается в изменении доз и схем применения химиотерапевтических препаратов и, как следствие, в воздействии на пациента менее токсичных доз (6). Другие подходы заключаются в изменении режима питания, например голодании или ограничении определенных продуктов во время и после химиотерапии (7); а также добавлении в рацион пациента нескольких специфических пищевых аминокислот (8). Применение определенных метаболических антидотов, специфичных к лекарственным средствам, в частности, ацилированных производных уридина или цитидина, с целью предотвращения токсических осложнений, вызванных аналогами пиримидинового нуклеозида, описано в патенте США № 7,776,838. Применение гликозида хроманола для предотвращения токсического действия алкилирующих препаратов описано в патенте США № 7,462,601. Также было предложено применение антиоксидантов для предотвращения кардиотоксичности, вызванной приемом антрациклина (9). Также были описаны: снижение тканеспецифичной токсичности химиотерапевтических препаратов, в частности предотвращение мукозита путем местного применения альфа-интерферона или бета-интерферона (патент США № 5,017,371); применение селективных аналогов глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2) для предотвращения желудочно-кишечных нежелательных побочных эффектов (патент США № 8,642,727); применение антагониста аденозинового рецептора A2B для предотвращения повреждения печени (патент США № 8188,099) и применение ингибиторов фактора роста IGFBP-1 для предотвращения повреждения предстательной железы (патент США № 8,211,700). Применение щелочной фосфатазы для облегчения общей токсичности химиотерапии и поддержания жизнеспособности мышечной и жировой ткани у млекопитающих, получающих химиотерапию, описано в патенте США № 8,460,654.

В настоящее время существует острая необходимость в разработке новых композиций и способов предотвращения или облегчения токсичности, связанной с химиотерапией.

Существующие в настоящее время методы лучевой терапии для лечения раковых заболеваний обеспечивают значительный положительный эффект для пациентов, страдающих раковыми заболеваниями на ранней стадии, чувствительными к облучению, однако, указанный положительный эффект гораздо менее значителен для пациентов, страдающих опухолями, устойчивыми к облучению (например, раком головного мозга или раком поджелудочной железы), и для пациентов, страдающих опухолями на поздних стадиях. Для этих пациентов лучевая терапия, необходимая для устранения опухоли, может вызывать неизлечимое или смертельное лучевое повреждение. Это особенно важно для пациентов детского возраста, чьи быстро развивающиеся здоровые ткани часто более чувствительны к облучению, чем ткани опухоли, в связи с чем указанные пациенты детского возраста не могут переносить лучевую терапию, которая позволяла бы излечить взрослых с таким же заболеванием. Повреждение здоровых тканей ограничивает применение лучевой терапии для пациентов, страдающих раковыми заболеваниями, в молодом возрасте, а также пациентов, страдающих раковыми заболеваниями центральной нервной системы, опухолями, резистентными к облучению, и раком на поздней стадии с крупными опухолями.

Таким образом, существует острая необходимость в разработке новых композиций и способов предотвращения или облегчения токсичности, связанной с лучевой терапией.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Как указано в предыдущем разделе, существует большая потребность в разработке новых композиций и способов предотвращения или облегчения токсических осложнений, связанных с химиотерапией или лучевой терапией. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие потребности путем обеспечения композиций и способов на основе фермента ДНКазы.

В частности, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения токсических осложнений, связанных с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной химиотерапии. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ повышения эффективности цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии у субъекта, проходящего или собирающегося пройти курс назначенной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, при этом указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанного вида химиотерапевтического лечения, и введение фермента ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсичности, связанной с указанной химиотерапией.

Согласно одному конкретному варианту реализации описанных выше способов указанный побочный эффект от указанной химиотерапии может быть выбран из группы, состоящей из потери массы тела, миелотоксичности, катаболических изменений в биохимическом составе крови, некроза миокарда, желудочно-кишечной токсичности, подавления иммунитета и нейтропении.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения и облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, связанного с применением цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, связанной с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения химиотерапия представляет собой терапию, содержащую антрациклин.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений в биохимическом составе крови, связанных с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений в биохимическом составе крови, связанных с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения, химиотерапия представляет собой терапию, содержащую антрациклин.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения кардиотоксичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения кардиотоксичности, связанной с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения кардиотоксичность представляет собой некроз миокарда. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения, химиотерапия представляет собой терапию, содержащую антрациклин.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, в котором

указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения химиотерапия представляет собой 5-фторурацил- и / или этопозид-содержащую терапию.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения иммуносупрессии, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, при этом указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения иммуносупрессии, связанной с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, химиотерапия является таксаносодержащей терапией.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс вышеуказанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, при этом указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с указанной химиотерапией. Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения, химиотерапия представляет собой терапию, содержащую циклофосфамид.

Согласно одному варианту реализации любого из способов согласно настоящему изобретению химиотерапия включает введение одного или нескольких соединений, выбранных из группы, состоящей из антиметаболитов, алкилирующих агентов, противораковых антибиотиков, агентов, воздействующих на микротрубочки, ингибиторов топоизомеразы, алкалоидов и препаратов направленного действия.

Согласно одному из вариантов реализации изобретению химиотерапия включает введение одного или нескольких соединений, выбранных из группы, содержащей антрациклин, доксорубин, 5-фторурацил (5-FU), этопозид, таксан и циклофосфамид.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения по любому из описанных выше способов фермент ДНКазу вводят во время курса химиотерапии. Согласно другому варианту реализации любого из способов согласно настоящему изобретению фермент ДНКазу вводят после курса химиотерапии.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения токсичного действия, связанного с лучевой терапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ повышения эффективности лучевой терапии у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, при этом указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии, причем введение ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсического воздействия, вызванного указанной лучевой терапией.

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения по двум описанным выше способам, побочный эффект, связанный с лучевой терапией, может быть выбран из группы, состоящей из раздражения или повреждения кожи, усталости, тошноты, рвоты, фиброза, нарушений со стороны пищеварительного тракта, потери памяти, бесплодия и повторного развития рака.

Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения потери массы тела, связанной с лучевой терапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения потери веса тела, связанного с указанной лучевой терапией.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения по трем описанным выше способам, лучевая терапия представляет собой наружную дистанционную лучевую терапию или системную радиоизотопную терапию.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения по трем описанным выше способам, фермент ДНКазу вводят субъекту во время цикла лучевой терапии. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фермент ДНКазу вводят после завершения цикла лучевой терапии.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения по любому из описанных выше способов, фермент ДНКазы представляет собой ДНКазу I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычья панкреатическая ДНКазы I) или ее аналог (например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2). Согласно другому варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов фермент ДНКазы представляет собой ДНКазу II. Согласно одному варианту реализации изобретения фермент ДНКазы характеризуется удлиненным периодом полувыведения (например, за счет конъюгации с полисиаловой кислотой или защиты от связывания с актином путем модификации сайта связывания актина).

Согласно одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов, терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы составляет по меньшей мере 0,5 мг/кг/день или по меньшей мере 1000 единиц Кунитца (КУ)/кг/день, предпочтительно по меньшей мере 1,5 мг/кг/день или по меньшей мере 3000 КУ/кг/день. Согласно одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы составляет от 0,5 до 100 мг/кг/день или от 1000 до 200000 КУ/кг/день,

предпочтительно от 0,5 до 50 мг/кг/день или от 1000 до 100000 КУ/кг/день, более предпочтительно от 1,5 до 50 мг/кг/день или от 3000 до 100000 КУ/кг/день, наиболее предпочтительно от 10 до 50 мг/кг/день или от 20000 до 100000 КУ/кг/день.

Согласно одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов фермент ДНКазу вводят внутривенно или внутривнутрибрюшинно. Согласно одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов фермент ДНКазу вводят энтерально (например, перорально).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения по любому из описанных выше способов субъектом является человеком.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники в нижеследующем описании, формуле изобретения и чертежах.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фигуре 1 представлена гистограмма, показывающая площадь некроза миокарда у умерших крыс, которым была введена внутривенная (в/в) сублетальная доза доксорубина (7,5 мг/кг) и ежедневная внутривнутрибрюшинная (в/б) инъекция рекомбинантной ДНКазы человека (15 мг/кг) (черный цвет) или ежедневная в/б инъекция плацебо (вода для инъекций) (диагональная штриховка). Микроскопию срезов миокарда из каждого сердца анализировали с использованием автоматизированного видеоанализатора для количественной оценки площади некроза. Суммарная площадь некроза ( $S_{na}$ ;  $nm^2$ ) была рассчитана как сумма площадей некроза 30 серийных срезов для каждого сердца ( $n = 3$  для крыс, обработанных ДНКазой I, - черный цвет,  $n = 5$  для крыс, которым было введено плацебо - диагональная штриховка).

На фигуре 2А-В представлены фотографии окрашенных тканей желудков крыс, которым был перорально введен этипозид (200 мг/кг) и фторурацил (5-ФУ, 400 мг/кг) с последующим (А) четырехкратным введением рекомбинантной ДНКазы I человека (50 мг/кг) или (В) четырехкратным введением плацебо (вода для инъекций). Многочисленные эрозии и язвы видны на фотографии тканей желудка, представленных на фиг. В, в то время как в тканях желудка, представленных на фиг. А, нет макроскопических аномалий.

На фигуре 3 изображен график, на котором представлено изменение уровня лейкоцитов в крови у животных трех экспериментальных групп, у которых нейтропения была вызвана однократной в/б инъекцией циклофосфамида (200 мг/кг) (Группа I) с последующим в/в введением рекомбинантной ДНКазы I человека (25 мг/кг) (группа II) или подкожным (п/к) введением рекомбинантного гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ, GM-CSF) человека (200 мкг/кг) (группа III). На оси ординат отложено значение абсолютного содержания лейкоцитов (БКК, WBC) в единицах  $10^9$  БКК/л. На оси абсцисс отложены дни после инъекции циклофосфамида. Данные на фигуре отображают положительное воздействие применения фермента ДНКазы на нейтропению, связанную с алкилирующим агентом, таким как циклофосфамид.

На фигуре 4 представлена гистограмма, отображающая обобщенные данные о выживаемости животных, которым были трансплантированы клетки лейкемии L1210 для развития рака, с последующей обработкой цитозин-арабинозидом (AraC) и/или ДНКазой II. На оси абсцисс представлены данные шести экспериментальных групп: 1. Отрицательный контроль; 2. AraC (положительный контроль); 3. AraC + ДНКазы II (15 мг/кг); 4. AraC + ДНКазы II (45 мг/кг); 5. ДНКазы II (15 мг/кг); 6. ДНКазы II (45 мг/кг). На фигуре представлен синергетический эффект применения ДНКазы и AraC на выживаемость мышей с лейкемией.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Авторы настоящего изобретения ранее продемонстрировали пригодность фермента дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) для лечения рака (см., например, заявка на патент США № 2010/0150903 и патент США № 7,612,032), что было недавно подтверждено рядом авторов (10-12). Однако, также сообщалось, что недостаток фермента ДНКазы оказывает существенное влияние на переносимость антипролиферативной химиотерапии (15) и, более того, вносит значительный вклад в увеличение токсичности химиотерапии (17).

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии авторами изобретения того факта, что фермент ДНКазы не только повышает эффективность цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии, но также значительно уменьшает токсичность, связанную с химиотерапией. Это открытие особенно неожиданно в свете предыдущих сообщений об отсутствии влияния ДНКазы на переносимость химиотерапии (15) и влияния ДНКазы на увеличение нефротоксичности химиотерапии (17). Способность ДНКазы предотвращать и/или облегчать токсичность, связанную с химиотерапией, присуща различным типам ДНКаз и не зависит от применяемого лекарственного средства или тканей, что делает ДНКазу желательным и потенциально подходящим средством для терапии в комбинации с химиотерапией. Действительно, как показано ниже в разделе «Примеры», различные типы ДНКаз (например, ДНКазы I, ДНКазы и ДНКазы II) могут быть использованы для облегчения токсичного эффекта таких химиотерапевтических агентов, как доксорубицин (антрациклиновый антибиотик, механизм действия которого заключается в интеркаляции с ДНК), 5-FU (антиметаболит, действие которого заключается в ингибировании тимидилатсинтазы), этопозид (ингибитор топоизомеразы), таксан (нарушающий целостность микротрубочек) и циклофосфамид (алкилирующий агент).

### **Определения**

Термины «цитостатическая и/или цитотоксическая химиотерапия» и «химиотерапия» в контексте данной заявки используются взаимозаменяемо для обозначения терапии, включающей введение цитостатического и/или цитотоксического препарата.

В контексте данной заявки термины «противораковый агент» и «противораковый химиотерапевтический агент» используются для обозначения любого химического соединения, которое применяется для лечения рака. Противораковые химиотерапевтические агенты хорошо

известны в данной области техники (например, Gilman A. G., et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Ed., Sec 12:1202-1263 (1990)). Конкретные примеры химиотерапевтических агентов представлены в настоящем описании.

Термин «побочный эффект химиотерапии» в контексте данной заявки относится к нежелательному и непреднамеренному, хотя и не обязательно неожиданному, результату химиотерапии.

Используемые термины «лучевая терапия» и «ЛТ» используются взаимозаменяемо и относятся к медицинскому применению ионизирующего облучения в составе лечения рака с целью повреждения ДНК клеток злокачественной опухоли в результате прямого воздействия или путем создания заряженных частиц внутри пораженных клеток, которые повреждают ДНК. Широко используемые типы лучевой терапии, охваченные настоящим изобретением, включают, например, наружную дистанционную лучевую терапию (наружная лучевая терапия или лучевая терапия), близкофокусную/интерстициальную лучевую терапию, а также системную радиоизотопную терапию/облучение открытым источником.

В контексте данной заявки термин «побочный эффект лучевой терапии» относится к нежелательному и непреднамеренному, хотя и не обязательно неожиданному, последствию лучевой терапии. Наблюдаемые побочные эффекты зависят от площади обрабатываемого участка тела, суточной дозы, суммарной дозы облучения, общего состояния пациента и сопутствующей терапии и могут включать, например, раздражение или повреждение кожи, усталость, тошноту, рвоту, фиброз, нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, потерю памяти, бесплодие или повторное развитие рака.

Термин «катаболическое состояние» в контексте данной заявки используется для описания состояния, характеризуемого быстрой потерей веса, жира и скелетной мышечной массы, которое может наблюдаться на фоне химиотерапии или химиолучевой терапии. Возможными клиническими проявлениями включают, например, иммуносупрессию, мышечную слабость, предрасположенность к легочной эмболии, тромбозу и измененную реакцию на стресс.

В контексте данной заявки термины «дезоксирибонуклеаза» и «ДНКаза» обозначают любой фермент, который катализирует гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей в остове ДНК. Большое количество дезоксирибонуклеаз известно и может быть использовано в способах настоящего изобретения. Неограничивающие примеры ДНКаз, подходящих для применения в способах согласно настоящему изобретению, включают, например, ДНКазу I (например, рекомбинантная ДНКаза I человека или бычья панкреатическая ДНКаза I), аналоги ДНКазы I (такие как, например, ДНКаза X, ДНКаза гамма, и DNAS1L2), ДНКазу II, фосфодиэстеразу I, лактоферрин и ацетилхолинэстеразу. Настоящее изобретение также включает ферменты ДНКазы, которые имеют пролонгированный период полувыведения (например, ферменты ДНКазы, конъюгированные с полисиаловой кислотой или защищенные от связывания с актином, путем модификации сайта связывания актина, см., например, Gibson et al., (1992) *J. Immunol. Methods*, 155, 249-256). ДНКаза I предпочтительно расщепляет ДНК по фосфодиэфирным связям между соседними

пиримидиновыми нуклеотидами, образуя полинуклеотиды, фланкированные фосфатными группами с 5'конца и гидроксильной группой с 3'конца, как правило, образуя тетрапиримидины. ДНКазы I действуют на одноцепочечную ДНК, двухцепочечную ДНК и хроматин.

Термин «примерно» означает диапазон значений внутри допустимой погрешности, определенный специалистом в данной области техники, который частично зависит от того, как значение измеряли или определяли, то есть ограничения измерительной системы. Например, «примерно» может означать допустимое стандартное отклонение, согласно практике в данной области техники. Кроме того, «примерно» может означать интервал до  $\pm 20\%$ , предпочтительно до  $\pm 10\%$ , более предпочтительно до  $\pm 5\%$  и более предпочтительно до  $\pm 1\%$  от заданного значения. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, данный термин может соответствовать порядку величины, предпочтительно не превышающий 2. Если конкретное значение указано в заявке и формуле изобретения, термин «примерно» подразумевается и в этом контексте означает диапазон конкретных значений внутри допустимой погрешности, если не указано иное.

Применительно к настоящему изобретению, поскольку оно относится к любому из заболеваний, указанных в данной заявке, термины «лечить», «лечение» и т.п. означают облегчение или частичное снятие по меньшей мере одного симптома, связанного с таким состоянием, или замедление или обращение течения такого состояния. В значении настоящего изобретения термин «лечить» также обозначает остановку, замедление возникновения заболевания (то есть период до клинического проявления заболевания) и/или снижение риска развития или прогрессирования заболевания. Например, по отношению к раку термин «лечить» может означать удаление или снижение степени тяжести опухоли у пациента или предотвращение, замедление или ингибирование развития метастаз и т.д.

В контексте данной заявки термин «терапевтически эффективное», применяемый к дозе или количеству, означает такое количество лекарственного средства или фармацевтической композиции, которое является достаточным для достижения желаемой активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. В контексте настоящего изобретения, когда термин «терапевтически эффективное» используется применительно к применению дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) для устранения или предотвращения побочных эффектов, вызванных цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией, указанный термин означает количество ДНКазы или содержащей ДНКазу фармацевтической композиции, которое необходимо для устранения или предотвращения по меньшей мере одного побочного эффекта, вызванного применением такой цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии. Следует отметить, что в случае применения комбинации действующих ингредиентов (например, комбинация ДНКазы и другого соединения, эффективного для устранения или предотвращения побочных эффектов, связанных с химиотерапией), эффективное количество комбинации может включать или не включать количество каждого ингредиента, которое было бы эффективным при индивидуальном введении.

Фраза «фармацевтически приемлемый», используемая в отношении композиций согласно настоящему изобретению, относится к химическим соединениям и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не приводят к неблагоприятным реакциям при введении субъекту (например, млекопитающему, такому как человек). В контексте данной заявки, термин «фармацевтически приемлемый» преимущественно означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительством штата, или внесенный в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для применения у млекопитающих и, более конкретно, у людей.

Термин «терапия направленного действия» используется для обозначения класса химических и биологических соединений, которые могут быть эффективны для пациентов, с раковые опухоли у которых характеризуются специфическими молекулярными мишенями, но не демонстрируют эффективность в отсутствие такой мишени (18).

В контексте данной заявки термин «субъект» относится к любому млекопитающему. В предпочтительном варианте реализации изобретения субъектом является человек.

При использовании в рамках настоящего описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включает указание на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

Согласно данному изобретению могут быть применены методики, широко применяемые в фармакологии и молекулярной биологии в рамках области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. Например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (в данном документе “Sambrook *et al.*, 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); В. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (под редакцией.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); и другие.

#### Способы лечения согласно настоящему изобретению

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения токсичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапией, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатической ДНКазы I), аналоги ДНКазы I (такие как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстераза I, лактоферрин или ацетилхолинэстераза), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для

предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной химиотерапии.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ повышения эффективности цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапией, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычья панкреатическая ДНКазы I), аналоги ДНКазы I (такие как ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстераза I, лактоферрин, или ацетилхолинэстераза), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной химиотерапии, и при этом введение ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсического действия, связанного с указанной химиотерапией.

В соответствии с настоящим изобретением различные типы фермента ДНКазы могут быть использованы для облегчения токсичности, вызванной широким спектром химиотерапевтических препаратов. Неограничивающий пример таких препаратов включает антиметаболиты, такие как пиримидиновые аналоги (например, 5-фторурацил [5-FU], флукурин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолата и соответствующие ингибиторы (например, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические средства, в том числе натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин и винорелбин), вещества, воздействующие на целостность микротрубочек, такие как таксаны (например, паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навельбин, эпидидодофиллотоксины (например, этопозид, тенипозид), ДНК повреждающие агенты (например, актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотecin, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, надаплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, акларубин, пурарубин, гексаметилниламиноплатин, мелфалан, мерлофтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, нимустин, ранимуцин, эстрамуцин, пликамицин, прокарбазин, таксол, такотер, тенипозид, триэтилентioфосфорамид и этопозид (VP16)); антибиотики (например, дактиномицин (актиномицин D), даунорубин, доксорубин (адриамицин), идарубин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, плекамицин (митрамицин), плеомицин, пепломицин, митомицины (например, митомицин C), актиномицины (например, актиномицин D) циностатин); ферменты (например, L-аспарагиназа); неокарциностатиновый; антиагрегантные средства; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как хлорметин (например, мехлорэтамин, циклофосфамид и аналоги, имидазолкарбоксамид, мелфалан, хлорамбуцил, гидроксид азотсодержащего N-оксида, ифосфамид), этиленимины и метилмеламин (например, гексаметилмеламин, тиотепа, карбоккон, триэтилентioфосфарамид), алкилсульфонаты (например, бусульфан, изопросульфан тозилат), нитрозомочевины (например, кармуцин (BCNU) и аналоги,

стрептозоцин), декарбозин (ДПС); соединения эпоксидного типа (например, митобронитол); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (например, метотрексат); координационные комплексы платины (например, цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоклотеимид; гормоны, гормональные аналоги (например, эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (например, летрозол, анастрозол); антисекреторные агенты (например, бревелдин); иммунодепрессанты (например, циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолят мофетил); антиангиогенные соединения (например, TNP-470, генистеин, бевацизумаб) и ингибиторы фактора роста (например, ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокаторы рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (например, трастузумаб); ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (например, третиноин); ингибиторы мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR), ингибиторы топоизомеразы (например, доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, митоксантрон, топотекан, иринотекан); ингибиторы киназы сигнальной трансдукции, действующей на факторы роста; индукторы митохондриальной дисфункции; факторы, разрушающие нуклеосомную структуру хроматина; собузоксан; третиноин; пентостатин; флутамид; порфирин натрия; фазрозол; прокарбазин; ацеглатон; радиоиммунотерапии (например, ибритумаб тиуксетан, йод 131, тозитумаб); а также препараты, применяемые при таргетной радионуклидной терапии (например, самарий Sm1-53-EDTMP, стронций-89-хлорид).

Неограничивающие примеры побочных эффектов цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии, которые могут быть предотвращены или облегчены путем введения, в соответствии с предлагаемыми способами, ферментов ДНКаз, включают миелотоксичность, нейтропению, миелопатию (например, лейкопению, гранулоцитопению, лимфопения, тромбоцитопения, эритропения); гематопатию (например, фибриногенопия плазмы); катаболические изменения в биохимическом составе крови; расстройства желудочно-кишечного тракта (например, тошнота, рвота, анорексия, потеря массы тела, чувство переполненного желудка, диарея, запор, стоматит, эзофагит); легочную недостаточность (например, хроническую пневмонию, фиброз легких, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), боковой амиотрофический склероз (ALS), эмболии легких); дерматопатию (например, кератинизацию, пахименению, пигментацию, выпадение волос, сыпь, выпадение ногтей, алопецию, вызванную раковым заболеванием); расстройства нервной системы (например, парестезию, депрессию, глубокую оффлессию, нейропаралич, расстройства слуха, аллолалию, дезориентацию, неврологические проявления, мозжечковую атаксию, сонливость, кому, головокружение, частое мочеиспускание, частое желание дефекации); эндокринные расстройства (например, нарушение гипофиза и надпочечников, гипергликемию, гипогликемию); генитальные расстройства (например, гипосексуальность, олигоспермия, гинекомастия, нарушение менструального цикла); сердечно-сосудистые нарушения (например, некроз миокарда, кардиомиопатия, аритмия, низкое кровяное давление, тахикардия, сердечная

недостаточность); гепатопатия, расстройство поджелудочной железы, нефропатия, расстройства мочевого пузыря, гиперурикемия, снижение иммунокомпетентности и инфекции.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения токсических осложнений, связанных с лучевой терапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такие как, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрин или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы эффективно для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ повышения эффективности лучевой терапии у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такие как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии, причем введение ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсичности, связанной с указанной лучевой терапией.

В соответствии с настоящим изобретением, ферменты ДНКазы могут быть использованы для облегчения токсичности и повышения эффективности различных типов лучевой терапии, включая, например, наружную лучевую терапию (НЛТ), брахитерапию/герметичную лучевую терапию, а также системную радиоизотопную терапию/радиотерапию с открытым источником.

Неограничивающие примеры побочных эффектов лучевой терапии, которые могут быть предотвращены или облегчены путем введения ферментов ДНКаз в соответствии с предлагаемыми способами, например, включают: раздражение или повреждение кожи, усталость, тошноту, рвоту, фиброз, повреждение кишечника, потерю памяти, бесплодие и повторное развитие рака.

Предлагаемые способы могут быть применены для субъектов, страдающих от широкого спектра раковых заболеваний, которые подвергаются химиотерапевтическому методу лечения рака, приводящего к серьезным побочным эффектам. Неограничивающие примеры соответствующих раковых заболеваний включают, например, рак молочной железы, рак предстательной железы, множественную миелому, переходно-клеточную карциному, рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)), рак почек, рак щитовидной железы, лейкоз (например, хронический миелолейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз), лимфому (например, лимфома В-клеток, лимфома Т-клеток, неходжкинские лимфомы, лимфома Ходжкина), рак головы и шеи, рак пищевода, рак желудка, рак

ободочной кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желчного протока, рак желчного пузыря, рак яичников, рак матки, рак влагалища, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, нейробластома, саркому, остеосаркому, злокачественную меланому, плоскоклеточный рак, рак кости, включая как первичные раковые заболевания костей (например, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, адамантином, гигантоклеточная опухоль и хордома), так и вторичные (метастатические) раковые заболевания костей, саркому мягких тканей, карциному базальной клетки, ангиосаркому, гемангиосаркому, михосаркому, липосаркому, остеогенную саркому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, рак яичек, рак матки, рак желудочно-кишечного тракта, мезотелиому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, макроглобулинемию вальденстрема, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, бронхогенный рак, хориокарциному, семиному, эмбриональный рак, опухоль Вильмса, эпителиальную карциному, глиому, глиобластома, астроцитому, медуллобластома, краниофарингиому, эпендимому, пиналому, гемангиобластома, акустическую неврому, олигодендроглиому, менингиому, ретинобластома, медуллярную карциному, тимому, саркому и т. д.

Согласно одному из вариантов реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, связанного с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, терапией доксорубицином) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапией, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (таких как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, связанного с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений в биохимическом составе крови, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, терапия доксорубицином) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапией, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такой как ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является

эффективным для предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений в биохимическом составе крови, связанных с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения кардиотоксичности (например, некроза миокарда), связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, терапией доксорубицином) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантной ДНКазы I человека или бычьей панкреатической ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такой как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения кардиотоксичности, связанной с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, комбинационной химиотерапией 5-фторурацилом/этопозидом) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантной ДНКазы I человека или бычьей панкреатической ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такой как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения подавления иммунитета, связанного с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, терапия препаратами таксановой группы) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапией, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы (например, рекомбинантной ДНКазы I человека или бычьей панкреатической ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (таких как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения подавления иммунитета, связанного с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией (например, терапией циклофосфамидом) у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы

(например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такие как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с указанной химиотерапией.

Согласно еще одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или облегчения потери массы тела, связанной с лучевой терапией, у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы (например, ДНКазы I (например, рекомбинантная ДНКазы I человека или бычьей панкреатическая ДНКазы I), аналогов ДНКазы I (такие как, например, ДНКазы X, ДНКазы гамма или DNAS1L2), ДНКазы II, фосфодиэстеразы I, лактоферрина или ацетилхолинэстеразы), причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения потери массы тела, связанной с указанной лучевой терапией.

Согласно еще одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы составляет по меньшей мере 0,5 мг/кг/день или 1000 единиц Кунитца (КУ)/кг/сут, предпочтительно по меньшей мере 1,5 мг/кг/день или 3000 КУ/кг/день. Согласно одному варианту реализации изобретения по любому из описанных выше способов терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы составляет от 0,5 до 100 мг/кг/день или от 1000 до 200000 КУ/кг/день, предпочтительно от 0,5 до 50 мг/кг/день или от 1000 до 100000 КУ/кг/день, еще более предпочтительно от 1,5 до 50 мг/кг/день или от 3000 до 100000 КУ/кг/день, наиболее предпочтительно от 10 до 50 мг/кг/день или от 20000 до 100000 КУ/кг/сут.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения по любому из описанных выше способов субъектом является человек.

#### Способы введения ДНКазы и композиций, содержащих ДНКазы

В предложенных способах фермент ДНКазы может быть введен до, во время и/или после введения химиотерапевтического препарата или во время или после проведения курса лучевой терапии. Предпочтительно чтобы (i) фермент ДНКазы и химиотерапевтический препарат (или лучевая терапия) были введены в одно и то же время и/или (ii) фермент ДНКазы был введен непосредственно сразу после введения химиотерапевтического агента (или лучевой терапии). ДНКазы может быть введена пациенту однократно или курсом; один или несколько раз в день.

Используемые в предложенных способах дозы фермента ДНКазы зависят от типа побочного эффекта, вызванного химиотерапией или лучевой терапией, степени тяжести и динамики данных побочных эффектов, а так же предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на химиотерапию (или лучевую терапию) и на введение ДНКазы, а также от решения лечащего врача. Неограничивающие примеры применимого диапазона доз включают концентрации от 0,5 до 100

мг/кг/день или от 1000 до 200000 кН/кг/день, предпочтительно от 0,5 до 50 мг/кг/день или от 1000 до 100000 единиц Кунитца (КУ)/кг/день, еще более предпочтительно от 1,5 до 50 мг/кг/день или от 3000 до 100000 КУ/кг/день, наиболее предпочтительно от 10 до 50 мг/кг/день или от 20000 до 100000 КУ/кг/день.

Введение фермента ДНКазы в соответствии с предложенными способами может быть осуществлено любым подходящим путем, включая системное введение, а также введение непосредственно в место локализации заболевания (например, в место локализации первичной опухоли). Конкретные неограничивающие примеры возможных способов введения включают внутривенное (в/в), подкожное (п/к), внутрибрюшинное (в/б), пероральное или ингаляционное введение.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения фермент ДНКазы входит в состав фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательными веществами.

Композиции, применяемые в описанных выше способах, могут быть беспрепятственно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены способами, известными в данной области техники. Количество активных ингредиентов, которые могут быть смешаны с веществом-носителем для получения однократной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от получающего лечение человека и конкретного способа введения. Количество активных ингредиентов, которые могут быть скомбинированы с носителем для получения однократной лекарственной формы, обычно равно количеству соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект.

Как правило, лекарственная форма может быть приготовлена с использованием как жидкого носителя, так и мелкодисперсного твердого носителя или и того и другого, а затем, при необходимости, сформирована готовая лекарственная форма.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько активных ингредиентов (ДНКазу и, в некоторых случаях, другое соединение, эффективное для облегчения или предотвращения побочных эффектов цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии или лучевой терапии) в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми водными или неводными стерильными изотоническими растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, а так же стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные растворы для инъекций или дисперсии непосредственно перед использованием и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого пациента, или суспендирующих или загущающих препаратов. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях согласно настоящему описанию, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и соответствующие смеси данных веществ, растительные масла, такие как оливковое масло и инъеклируемые органические сложные

эффиры, такие как этилолеат. Необходимая текучесть может быть обеспечена, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с использованием поверхностно-активных веществ.

Данные комбинации могут также содержать консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Профилактическое действие против микроорганизмов может быть обеспечено за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенольной сорбиновой кислоты и тому подобных агентов. Кроме того, может быть необходимо включить в композицию изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, увеличение времени всасывания инъекционной фармацевтической формы может быть обеспечено включением агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Лекарственная форма для инъекций может быть получена путем формирования микрокапсульных матриц одного или нескольких активных ингредиентов в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения активного ингредиента и полимера, а также природы используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения активного вещества. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли (ортоэффиры) и поли(ангидриды). Лекарственные формы для инъекций также могут быть получены путем захвата активных веществ липосомами или микроэмульсиями, которые являются подходящими для тканей тела.

Лекарственные формы для перорального введения могут быть представлены в форме желатиновых или крахмальных капсул, пилюль, таблеток, гранулятов, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости (например, в качестве полоскания для рта, в качестве препарата, который следует проглатывать, или как клизма), или в виде жидкой эмульсии типа масло-в-воде или вода-в-масле и т.п., каждая из которых содержит заданное количество одного или нескольких активных веществ.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, грануляты, гранулы и тому подобное) один или несколько активных ингредиентов могут быть смешаны с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или с любым нижеперечисленным веществом: (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие вещества, такое как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и / или аравийская камедь; (3) смачивающее вещество, такое как глицерин; (4) вещества для улучшения распадаемости таблеток, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) добавки, замедляющие процесс растворения, такие как парафин; (6) вещества для ускорения впитывания, такие как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк,

стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красителей. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции так же могут содержать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей для мягких и трудно заполненных желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярный полиэтиленгликоль и тому подобное.

Суспензии, в дополнение к одному или нескольким активным ингредиентам, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сорбитановые эфиры, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Порошки и спреи в дополнение к одному или нескольким активным веществам могут содержать такие вспомогательные вещества как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси данных веществ. Спреи могут дополнительно содержать пропелленты, такие как хлорфторуглероды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

## **ПРИМЕРЫ**

Настоящее изобретение также было описано и продемонстрировано с помощью нижеприведенных примеров. Однако использование этих и других примеров в данном документе является только иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем и значение изобретения или какого-либо проиллюстрированного термина. Аналогично, изобретение не ограничивается какими-либо описанным в данном документе конкретными предпочтительным вариантом реализации. Более того, многие модификации и варианты изобретения могут быть очевидны для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного в данном документе описания и могут быть сделаны изменения без отступления от существа и объема настоящего изобретения. Следовательно, изобретение должно ограничиваться только исходя из прилагаемых пунктов формулы патента с полным объемом эквивалентных ему признаков.

### **Пример 1. Облегчение острой токсичности, вызванной введением доксорубина, у крыс.**

#### **Материалы и методы**

Эксперимент был проведен с использованием 42 крыс самцов линии Вистар (массой 180-200 г) (полученные из питомника «Столбовая» РАМН). Животные содержались в стандартных условиях со свободным доступом к пище и питьевой воде. Животные были случайным образом распределены на 7 групп (по 6 животных в каждой группе) следующим образом:

1. Группа I: контрольная группа (животные не получали доксорубин и ДНКазу);
2. Группа II: крысы получали доксорубин (LENS) внутривенно (в/в) в дозе 3,75 мг/кг/день и рекомбинантную ДНКазу человека (ОАО «Фармсинтез») внутрибрюшинно (в/б) в дозе 15

мг/кг/день (30000 КУ/кг/день) ежедневно в течение 5 дней. Инъекции доксорубицина и ДНКазы I были сделаны одновременно;

3. Группа III: животные получали доксорубицин (LENS) в/в в дозе 3,75 мг/кг/день и в/б инъекции плацебо (вода для инъекций) ежедневно в течение 5 дней;
4. Группа IV: животные получали доксорубицин (LENS) в/в в дозе в дозе 7,5 мг/кг/день и в/б инъекции рекомбинантной ДНКазы I человека (ОАО «Фармсинтез») в дозе 15 мг/кг/день (30000 КУ/кг/день) ежедневно в течение 5 дней. Инъекции доксорубицина и ДНКазы I были сделаны одновременно;
5. Группа V: животные получали доксорубицин (LENS) в/в в дозе в дозе 7,5 мг/кг/день и в/б инъекции плацебо (вода для инъекций) ежедневно в течение 5 дней;
6. Группа VI: животные получали доксорубицин (LENS) в/в в дозе в дозе 10,0 мг/кг/день и в/б инъекции рекомбинантной ДНКазы I человека (ОАО «Фармсинтез») в дозе 15 мг/кг/день (30000 КУ/кг/день) ежедневно в течение 5 дней. Инъекции доксорубицина и ДНКазы I были сделаны одновременно;
7. Группа VII: животные получали доксорубицин (LENS) в/в в дозе в дозе 10,0 мг/кг/день и в/б инъекции плацебо (вода для инъекций) ежедневно в течение 5 дней.

В течение 2 недель после начала эксперимента оценивали массу тела животных и выживаемость.

## Результаты

**Таблица 1:** Данные о выживаемости крыс по экспериментальным группам

Группа	I	II	III	IV	V	VI	VII
Количество умерших/общее количество в группе	0/6	1/6	3/6	3/6	5/6	6/6	6/6
Медиана выживаемости умерших крыс (в днях)	–	7	12±2.1	10.3±1.4	8.2 ± 1.0	6.2± 1.0	6.6 ± 0.9

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что введение ДНКазы уменьшает смертность, вызванную доксорубицином и увеличивает продолжительность жизни крыс, получивших сублетальные дозы доксорубицина. Уменьшение смертности, измеряемое как количество выживших животных, носило дозозависимый характер.

**Таблица 2:** Масса тела выживших крыс (в граммах) после введения доксорубицина в дозе 3,75 мг/кг, измеренная до введения доксорубицина и на 4, 7 и 14 дни исследования.

	Группа I	Группа II	Группа III
Начальный уровень	167 ± 4	168 ± 4	164 ± 6
День 4	165 ± 5	160 ± 6	143 ± 6

	Группа I	Группа II	Группа III
День 7	172 ± 4	158 ± 5	151 ± 7
День 14	175 ± 4	164 ± 6	156 ± 6

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что введение ДНКазы снижает потерю массы тела у крыс, после острой токсичности, вызванной введением доксорубина в дозе LD<sub>50</sub> 3,75 мг/кг.

**Таблица 3:** Количество клеток крови и данные биохимического состава крови у выживших крыс после введения доксорубина в дозе 3,75 мг/кг на 14-й день лечения.

	Группа I	Группа II	Группа III
Гемоглобулин, G%	13.5±0.5	11.9±0.4	9.5±0.7
Гематокрит %	42.2±2.1	37.5±2.0	30.5±2.2
Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л	7.8±0.2	6.8±0.2	5.7±0.4
СОЭ, мм/ч	4.4±0.3	16.5±0.8	24.1±4.5
Содержание тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	540±25	440±25	340±25
БКК 10 <sup>9</sup> /л	7.7±0.4	6.0±0.3	4.9±0.2
Сегментоядерные нейтрофильные гранулоциты, %	29.6±1.3	13.5±1.0	11.6±1.3
Базофилы, %	0	0	0
Эозинофилы, %	0	0	2.4±0.3
Моноциты, %	2.7±0.5	2.9±0.4	2.3±0.5
Лимфоциты, %	63.4±1.7	80.3±1.4	82.3±2.2
Плазмациты, %	0.3±0.1	0.3±0.1	1.3±0.5
Белки, г/л	74.2±4.3	64.3±5.2	54.7±7.3
Мочевина, мМ/л	4.12±0.21	5.39±0.40	7.21±0.3
Креатинин, мкМ/л	54.7±6.2	65.5±7.2	68.3±8.4
Глюкоза, мМ/д	6.8±0.1	5.9±0.2	6.1±0.2
Общие липиды, г/л	2.22±0.20	2.12±0.21	2.06±0.27
Общий холестерин, мМ/л	1.32±0.30	1.69±0.18	1.10±0.29
Общий билирубин, мМ/л	8.9±0.3	9.5±0.5	8.2±0.6
Связанный билирубин, мМ/л	2.0±0.4	2.6±0.3	2.0±0.5
Na, мМ/л	142±3	151±4	144±2
K, мМ/л	5.2±0.2	5.1±0.3	5.6±0.3

Представленные в таблице 3 данные показывают, что введение ДНКазы животным уменьшает степень миелотоксичности и катаболических изменений в биохимическом составе крови у крыс после введения доксорубина в дозе LD<sub>50</sub> 3,75 мг/кг.

Сердца умерших крыс, которые подвергались воздействию сублетальной дозы доксорубина (7,5 мг/кг, группы IV и V), были вскрыты. Серийные образцы микроскопии миокарда из каждого сердца анализировали с использованием автоматизированного видеоанализатора для количественной оценки некротических областей. Общая площадь некротической области ( $S_{na}$ ;  $\text{nm}^2$ ) рассчитывалась как сумма некротических областей в 30 серийных срезах от каждого отдельного вскрытого сердца ( $n = 3$  для группы IV (Фиг.1, черные полосы),  $n = 5$  для группы V (Фиг.1, диагональные заштрихованные стержни)). Группа IV получала ежедневные инъекции в/б рекомбинантной ДНКазы I человека в дозе 15 мг/кг, тогда как группа V получала ежедневные инъекции в/б плацебо (вода для инъекций).

Результаты, представленные на фигуре 1, демонстрируют, что обработка ДНКазой уменьшает площадь некроза миокарда у крыс, которым была введена сублетальная доза доксорубина.

## **Пример 2. Облегчение желудочно-кишечной токсичности при комбинированной химиотерапии 5-фторурацил/этопозид.**

### Материалы и методы

В эксперименте были использованы 64 самца крыс Вистар (массой 170-200 г) (полученные из питомника РАМН «Столбовая»). Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и питьевой воде. В 1-й день этопозид (LANCER) и 5-фторурацил (5-ФУ, EBEWE) вводили перорально с использованием иглы для кормления в дозе 200 мг/кг и 400 мг/кг соответственно в составе 9% раствора глюкозы в объеме 500 мкл. Животные были разделены на 4 группы по 16 животных в каждой. Спустя два часа после введения этопозидола/5-ФУ крысам вводили:

1. Группа I: в/в плацебо (вода для инъекций);
2. Группа II: в/в рекомбинантная ДНКазы I человека (ОАО «Фармсинтез») в дозе 1,5 мг/кг (3000 КУ/кг);
3. Группа III: в/в рекомбинантная ДНКазы I человека (ОАО «Фармсинтез») в дозе 50 мг/кг (100000 КУ/кг);
4. Группа IV: в/в раствор циметидина (Gedeon Richter) в дозе 50 мг/кг.

Спустя 36 часов все животные были подвергнуты эвтаназии, с использованием автоматизированной системы видеоанализатора были проанализированы их желудки на наличие эрозий и кровоизлияний.

### Результаты

Таблица 4: Влияние введения ДНКазы I или циметидина на повреждения желудочно-кишечного тракта у животных, получавших 200 мг/кг этопозидола и 400 мг/кг 5-ФУ.

Группа	Количество животных	Химеотерапия	Терапия	Общее количество очагов поражений на группу	Среднее число очагов поражений	Количество очагов поражений в контрольной группе
I	16	Этопозид 200 мг/кг+ 5-ФУ 400 мг/кг перорально	Плацебо	86	5.38±1.41	4 (25%)
II	16	Этопозид 200 мг/кг+ 5-ФУ 400 мг/кг перорально	рек ДНКаза I чел-ка 1.5 мг/кг в/в	60	3.75±1.53	5 (31.25%)
III	16	Этопозид 200 мг/кг+ 5-ФУ 400 мг/кг перорально	Рек ДНКаза I чел-ка 50 мг/кш в/в	16	1.00±0.69	12 (75%)
IV	16	Этопозид 200 мг/кг+ 5-ФУ 400 мг/кг перорально	Циметидин 50 мг/кг в/в	40	2.5±1.1	10 (62.5%)

Представленные в таблице 4 результаты показывают, что введение ДНКазы уменьшает количество кровоизлияний, вызванных химиотерапией, и увеличивает количество животных не подверженных эрозии желудочно-кишечного тракта после введения этопозида и 5-ФУ дозозависимым образом. ДНКаза I в дозе 50 мг/кг приводила к достижению значительно большего защитного эффекта по сравнению с дозой ДНКазы 1,5 мг/кг и циметидина в дозе 50 мг/кг.

На фигуре 2 показаны фотографии окрашенной тканей желудков крысы из группы III (А) и I (В). Многократные эрозии и язвы видны на фотографии тканей желудков животных группы I, в то время как в тканях желудков животных группы III макроскопических аномалий нет.

### **Пример 3. Уменьшение подавления иммунитета, вызванного приемом таксаном.**

#### Материалы и методы

Паклитаксел (Паклитаксел-Тева) вводили в дозе 20 мг/кг однократно в/в 10 самцам мышей линии (CBAxС57Bl6) F1 в возрасте 6 недель, которые были получены из вивария «Рапполово». Через 1 час после введения паклитаксела пяти животным была введена рекомбинантная мышьяная ДНКаза гамма (USCN Life Science Inc.) в/б в дозе 2 мг/кг. Одновременно пяти нативным мышам вводили в/б 1 мл плацебо (вода для инъекций), контрольная группа. Спустя 24 часа все мыши были умерщвлены путем смещения шейных позвонков. Из всех животных были извлечены тимусы и

гомогенизированны в сепараторе в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сывороткой. Суспензию тимоцитов фильтровали и осаждали в центрифуге при 400×g в течение 2 минут, а затем ресуспендировали в той же среде. Тимоциты засеивали в 96-луночные планшеты (900,000 клеток на лунку в 200 мкл среды RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сывороткой (ФТС)) и инкубировали в течение 32 часов при 37°C, 100% влажности и в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем в каждую лунку добавляли <sup>3</sup>H-тимидин (1 мкКи/10 мкл/лунку) и Конканавалин А (ConA, 50 мкл, 1,25 мкг/мл). После 24 часов дальнейшей инкубации тимоциты собирали и высушивали. Инкорпорированный радиоактивный <sup>3</sup>H-тимидина измеряли с использованием сцинтилляционного счетчика Бекмана. Данные о бластной трансформации лимфоцитов, индуцированного Con A, приведены в таблице 5 ниже.

### Результаты

Таблица 5: Влияние ДНКзы гамма на бластную трансформацию лимфоцитов, вызванную конканавалином А.

Группа	Число сцинтилляций; СРМ	
	Базальное включение <sup>3</sup> НТ	Включение <sup>3</sup> НТ индуцированное конканавалином А
Контроль	641±62	7894±1067
Паклитаксел	277±21	1686±142
Паклитаксел + ДНКазы	357±25	5237±1232

Результаты, представленные в таблице 5, показывают, что ДНКазы снижает таксан-индуцированную супрессию пролиферативной активности тимоцитов.

### **Пример 4. Облегчение нейтропении, вызванной циклофосфамидом.**

#### Материалы и методы

В данном эксперименте были использованы 30 самцов мышей линии BALB/C в возрасте 10-12 недель (полученные из питомника «Рапполово»). Животные содержались в стандартных условиях со свободным доступом к пище и питьевой воде. Нейтропению индуцировали однократной в/б инъекцией циклофосфамида (LANS) в дозе 200 мг/кг в 200 мкл воды для инъекции в первый день эксперимента. Затем, со 2-го по 5-ый день, мышам обрабатывали следующим образом:

1. Группа I (n = 10): контроль (не получали препарата);
2. Группа II (n = 10): животные получали рекомбинантную ДНКазу человеку (ОАО «Фармсинтез») в/в в дозе 25 мг/кг/день (50000 кДж/кг/сут);
3. Группа III (n = 10): животных получали рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (ГМСКФ, Неостим, ОАО «Фармсинтез») п/к в дозе 200

мкг/кг/день.

Ежедневно в течение 10 дней проводили контроль количества лейкоцитов (БКК) у каждого животного с использованием счетчика форменных элементов крови.

### Результаты

Представленный на фигуре 3 график отображает динамику количества лейкоцитов (БКК, WBC) в трех экспериментальных группах. На оси ординат отложено значение БКК в единицах  $10^9$  БКК/л. На оси абсцисс отложены дни после инъекции циклофосамида.

Данные представленные на фигуре 3 демонстрируют то, что введение ДНКазы уменьшает степень выраженности нейтропении, вызванной алкилирующим агентом, таким как циклофосамид. Особое значение имеет то, что введение ДНКазы предотвращает характерное раннее снижение количества лейкоцитов, в то время как введение ГМСКФ не влияет на данный показатель.

### **ПРИМЕР 5: Совместное действие ДНКазы и противораковой химиотерапии.**

#### Материалы и методы

Для оценки возможного синергического эффекта комбинированного применения ДНКазы и химиотерапевтического агента цитозин-арабинозида (АгаС), являющегося нуклеозидным аналогом, на 0-ой день эксперимента клетки лейкоза L1210 были трансплантированы в/б мышам линии DBA2 (в возрасте 8-10 недель, массой 24-26 г, полученных из питомника «Рапполово») для индукции ракового заболевания ( $1 \times 10^5$  клеток на мышей, клеток, полученных из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова). Обработка экспериментальных животных ДНКазой и АгаС было начато на первый день эксперимента. Цитозин-арабинозид (АгаС, Цитостар, Пфайзер) был введен в/б в дозе 1000 мг/кг на 2, 5 и 8 день. Инъекционные дозы считались адекватными для модельных животных, а пути инъекции были подобраны на основе предыдущих экспериментов (13-14). ДНКазу II (Ворингтон) вводили в/б в дозах 15 мг/кг/день и 45 мг/кг/день на 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17 и 19 день.

Животные были случайным образом распределены на 6 экспериментальных групп по 6 мышей на группу следующим образом:

1. Группа I: отрицательный контроль (не получали препаратов);
2. Группа II: положительный контроль (животные, получали АгаС);
3. Группа III: животным, вводили АгаС и ДНКазу в дозе 15 мг/кг;
4. Группа IV: животные, обработанные АгаС и 45 мг/кг ДНКазы;
5. Группа V: животные, получавшие 15 мг/кг ДНКазы, и не получавшие АгаС;
6. Группа VI: животные, получавшие 45 мг / кг ДНКазы, и не получавшие АгаС

### Результаты

Данные выживаемости приведены на Фигуре 4. На оси ординат отложены данные

выживаемости, по дням после имплантации клетками лейкоза L1210. Шесть экспериментальных групп представлены на горизонтальной оси: 1- Отрицательный контроль; 2 -AraC (положительный контроль); 3 -AraC + ДНКаза II 15мг/кг; 4 -AraC + ДНКаза II 45 мг/кг; 5 - ДНКаза II 15 мг/кг; 6 - ДНКаза II 45 мг/кг.

Результаты, приведенные на Фигуре 4, показывают, что введение отдельно как AraC (группа II), так и ДНКазы II (группы V и VI), приводит к увеличению выживаемости по сравнению с контрольной группой животных (группа I). Однако комбинация AraC и ДНКазы обладает более выраженным воздействием на выживаемость по сравнению использованием данных препаратов по отдельности. Синергический эффект комбинированного лечения ДНКазой и AraC был дозозависимым и был более выражен с увеличением дозы ДНКазы.

### **ПРИМЕР 6: Введение ДНКазы повышает эффективность и снижает токсичность лучевой терапии раковых заболеваний.**

#### Материалы и методы

Для оценки возможного синергического действия комбинированной терапии ДНКазой и лучевой терапии, клетки асцитной карциномы Эрлиха ( $1 \times 10^6$  клеток на мышью, полученных из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова) были трансплантированы 60 мышам линии SHR (в возрасте 12-14 недель, массой 28-32 г, полученных из питомника «Рапполово») на 0 день эксперимента, чтобы вызвать рост асцитной опухоли. Лучевую терапию проводили на установке для телетерапии с использованием кобальта-60. Абдоминальную область мышей обрабатывали внешним облучением. Фракционированная доза облучения составила 200 сГр в день в течение 5 дней. Мышей разделяли на 6 групп и обрабатывали следующим образом: Группа 1: получали только лучевую терапию (внешнее облучение 200 сГр/день в течение 5 дней); Группа 2: получали рекомбинантную ДНКазу I (ОАО Фармсинтез) в/м в дозе 20 мг/кг/день в 2 суточных дозах; Группа 3: получали рекомбинантную ДНКазу I человека (ОАО Фармсинтез) в/м в 40 мг/кг/день в 2 суточных дозах; Группа 4: получали лучевую терапию (внешнее облучение 200 сГр/день в течение 5 дней) и рекомбинантную ДНКазу I (ОАО Фармсинтез) в/м в дозе 20 мг/кг/день в 2 суточных дозах; Группа 5: получали лучевую терапию (внешнее облучение 200 сГр в день в течение 5 дней) и рекомбинантную ДНКазу I человека (ОАО Фармсинтез) в/м в дозе 40 мг/кг/день в 2 суточных дозах. Группа 6 - контрольная группа, получавшая плацебо (вода для инъекций).

#### Результаты

В таблице 6 представлены данные выживаемости и изменения массы тела животных на 16-й день после трансплантации клеток асцитной карциномы Эрлиха:

Экспериментальные группы	% выживших на 16 день	Изменение средней массы тела на 16 день
Группа 1	40	- 3г

Группа 2	40	+2 г
Группа 3	50	+1.5г
Группа 4	80	0
Группа 5	100	+1.5г
Группа 6	0	+5.5г

Результаты, приведенные в таблице 6, показывают, что лечение только лучевой терапией (группа I) или только ДНКазой I (группы 2 и 3) приводит к повышению выживаемости по сравнению с контрольной группой мышей (группа 6). Тем не менее, сочетание лучевой терапии и ДНКазы приводит к большему увеличению выживаемости по сравнению с одним из вышеуказанных способов лечения. Синергическое действие комбинированной терапии на показатели выживаемости было дозозависимым и было более выражено с увеличением дозы ДНКазы. Введение ДНКазы также в значительной степени предотвращало потерю веса тела, вызванную лучевой терапией.

#### Список литературы:

1. Joshi et al., 2007, J. Neurosci. Res. 85:497-503.
2. Curigliano G. et al., Ann Oncol. 2012; 23 Suppl 7; vii155-vii166.
3. Syvak L.A. et al., Lik Sprava. 2012;(3-4):25-30.
4. Verstappen C.C. et al., Drugs. 2003; 63(15):1549-1563.
5. Lyman G.H. et al., Oncology (Williston Park). 2006; 20(14 Suppl 9):16-25.
6. Romiti A. et al., Cancer Chemother Pharmacol. 2013; 72(1):13-33.
7. Laviano A. et al., N Engl J Med. 2012; 366:2319-2320.
8. Gaurav K., Indian J of Med Paed Oncol., 2012; 33(1):13-20.
9. Vincent D.T. et al., Cancer Chemother Pharmacol. 2013; 72(6):1157-68.
10. Fushi W. et al., Cancer Res. 2013; 73:4256.
11. Cools-Lartigue J. et al., J Clin Invest. 2013; 123(8): 3446–3458.
12. Trejo-Becerril C. et al., PLoS One. 2012; 7(12): e52754.
13. Chabot, G. and Momparier, R. L., Cancer. Treat. Rep. 1984; 68:1483-1487.
14. Lech-Maranda, E. et al., Haematologica, 2000; 85:588-594.
15. Hall IH, et al., J Pharm Sci. 1974; 63(4): 625-6.
16. McBride A., et al, J Hematol Oncol. 2012; 5:75
17. Basnakian et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2005; 16: 697-702
18. Gerber D., Am Fam Physician, 2008; 77(3):311-319

\* \* \*

Настоящее изобретение не должно ограничиваться конкретными вариантами реализации, раскрытыми в данном документе. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение

к модификациям изобретения, раскрытым в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного описания. Такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

Патенты, заявки на патенты, публикации, методы исследований, непатентная литература и другие материалы, упомянутые в описании изобретения, включены в настоящее изобретение посредством ссылки в полном объеме, как если бы они были приведены в данном описании.

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

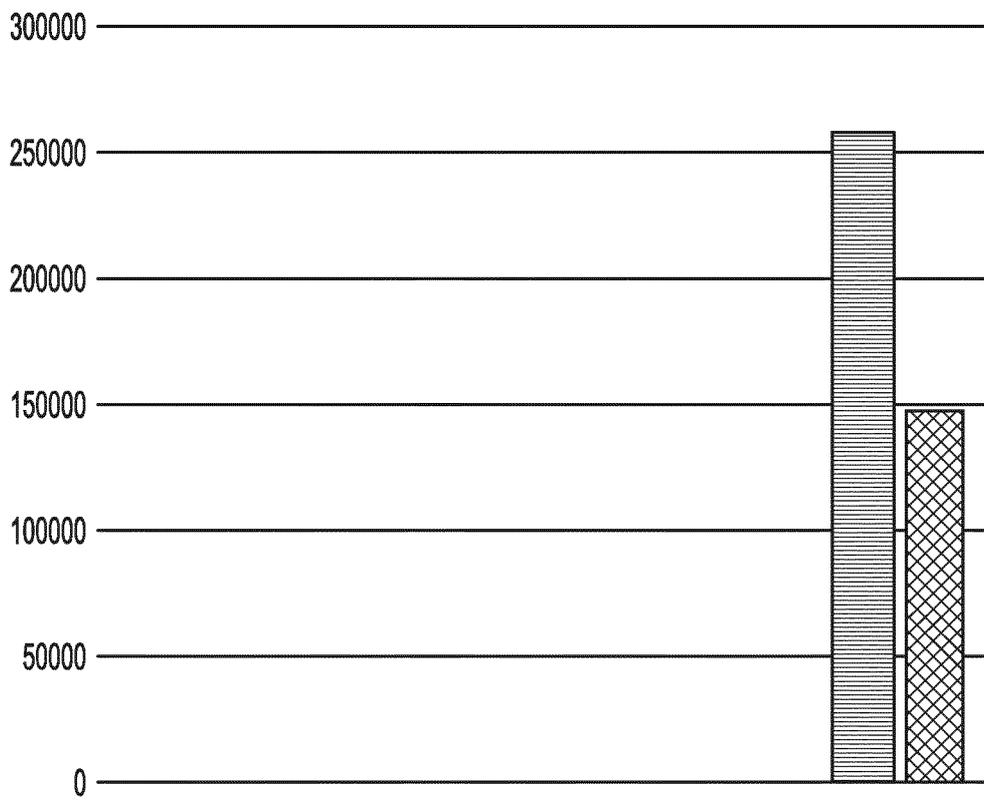
1. Способ предотвращения или облегчения токсических эффектов, связанных с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной химиотерапии.
2. Способ повышения эффективности цитостатической и/или цитотоксической химиотерапии у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной химиотерапии, и причем введение ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсичности, связанной с указанной химиотерапией.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный побочный эффект химиотерапии выбран из группы, состоящей из потери массы тела, миелотоксичности, катаболических изменений в биохимическом составе крови, некроза миокарда, желудочно-кишечной токсичности, подавления иммунитета и нейтропении.
4. Способ предотвращения или облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, и связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения катаболического состояния, приводящего к потере массы тела, связанной с указанной химиотерапией.
5. Способ предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений в биохимическом составе крови, связанных с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения миелотоксичности и/или катаболических изменений биохимического состава крови, связанных с указанной химиотерапией.
6. Способ предотвращения или облегчения кардиотоксичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем

указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения кардиотоксичности, связанной с указанной химиотерапией.

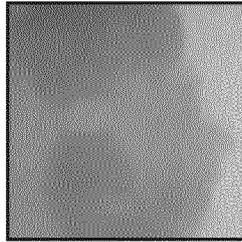
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что кардиотоксичность представляет собой некроз миокарда.
8. Способ предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения желудочно-кишечной токсичности, связанной с указанной химиотерапией.
9. Способ предотвращения или облегчения подавления иммунитета, связанного с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения подавления иммунитета, вызванного указанной химиотерапией.
10. Способ предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с цитостатической и/или цитотоксической химиотерапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего или собирающегося пройти курс указанной химиотерапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения нейтропении, связанной с указанной химиотерапией.
11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что химиотерапия включает введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из антиметаболитов, алкилирующих агентов, противораковых антибиотиков, агентов, воздействующих на микротрубочки, ингибиторов топоизомеразы, алкалоидов и препаратов направленного действия.
12. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что химиотерапия включает введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из антрациклина, доксорубина, 5-фторурацила (5-ФУ), этопозиды, таксана и циклофосфамида.
13. Способ по любому из пп.1-7 отличающийся тем, что химиотерапия представляет собой терапию, содержащую антрациклин.
14. Способ по любому из пп.1-3 и 8 отличающийся тем, что химиотерапия представляет собой 5-фторурацил- и / или этопозид-содержащую терапию.
15. Способ по любому из пп.1-3 и 9 отличающийся тем, что химиотерапия является таксаносодержащей терапией.

16. Способ по любому из пп.1-3 и 10 отличающийся тем, что химиотерапия представляет собой циклофосфамид-содержащую терапию.
17. Способ по любому из пп.1-16 отличающийся тем, что фермент ДНКазу вводят во время цикла химиотерапии.
18. Способ по любому из пп.1-16 отличающийся тем, что фермент ДНКазу вводят после цикла химиотерапии.
19. Способ предотвращения или облегчения токсичности, связанной с лучевой терапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии.
20. Способ повышения эффективности лучевой терапии у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного побочного эффекта указанной лучевой терапии, и при этом введение ДНКазы приводит к предотвращению или облегчению токсичности, связанной с указанной лучевой терапией.
21. Способ по п.19 или 20, отличающийся тем, что указанный побочный эффект указанной лучевой терапии выбран из группы, состоящей из раздражения или повреждения кожи, усталости, тошноты, рвоты, фиброза, повреждения кишечника, потери памяти, бесплодия и повторного развития рака.
22. Способ предотвращения или облегчения потери массы тела, связанной с указанной лучевой терапией у субъекта, страдающего от рака и проходящего курс указанной лучевой терапии, причем данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фермента ДНКазы, причем указанное количество фермента ДНКазы является эффективным для предотвращения или облегчения потери массы тела, связанной с указанной лучевой терапией.
23. Способ по любому из пп.19-22, отличающийся тем, что указанная лучевая терапия представляет собой наружную дистанционную лучевую терапию или системную радиоизотопную терапию.
24. Способ по любому из пп.19-23, отличающийся тем, что фермент ДНКазу вводят во время цикла лучевой терапии.
25. Способ по любому из пп.19-23 отличающийся тем, что фермент ДНКазу вводят после цикла лучевой терапии.
26. Способ по любому из пп.1-25 отличающийся тем, что фермент ДНКазы представляет собой ДНКазу I или ее аналог.

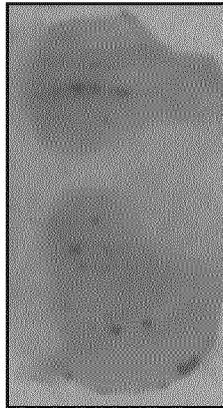
27. Способ по п.26, отличающийся тем, что аналог фермента ДНКазы I представляет собой ДНКазу гамма.
28. Способ по п.26, отличающийся тем, что фермент ДНКазы I представляет собой рекомбинантную ДНКазу I человека.
29. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что фермент ДНКазы представляет собой ДНКазу II.
30. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что фермент ДНКазы характеризуется удлиненным периодом полувыведения.
31. Способ по любому из пп.1-30 отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы находится в диапазоне 0,5-50 мг/кг/день.
32. Способ по любому из пп.1-30, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы находится в диапазоне 1,5-50 мг/кг/день.
33. Способ по любому из пп.1-30 отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество фермента ДНКазы находится в диапазоне 10-50 мг/кг/день.
34. Способ по любому из пп.1-33 отличающийся тем, что фермент ДНКазы вводят внутривенно или внутривентриально.
35. Способ по любому из пп.1-33 отличающийся тем, что фермент ДНКазы вводят энтерально.
36. Способ по п.35 отличающийся тем, что фермент ДНКазы вводят перорально.
37. Способ по любому из пп.1-36, отличающийся тем, что субъектом является человек.



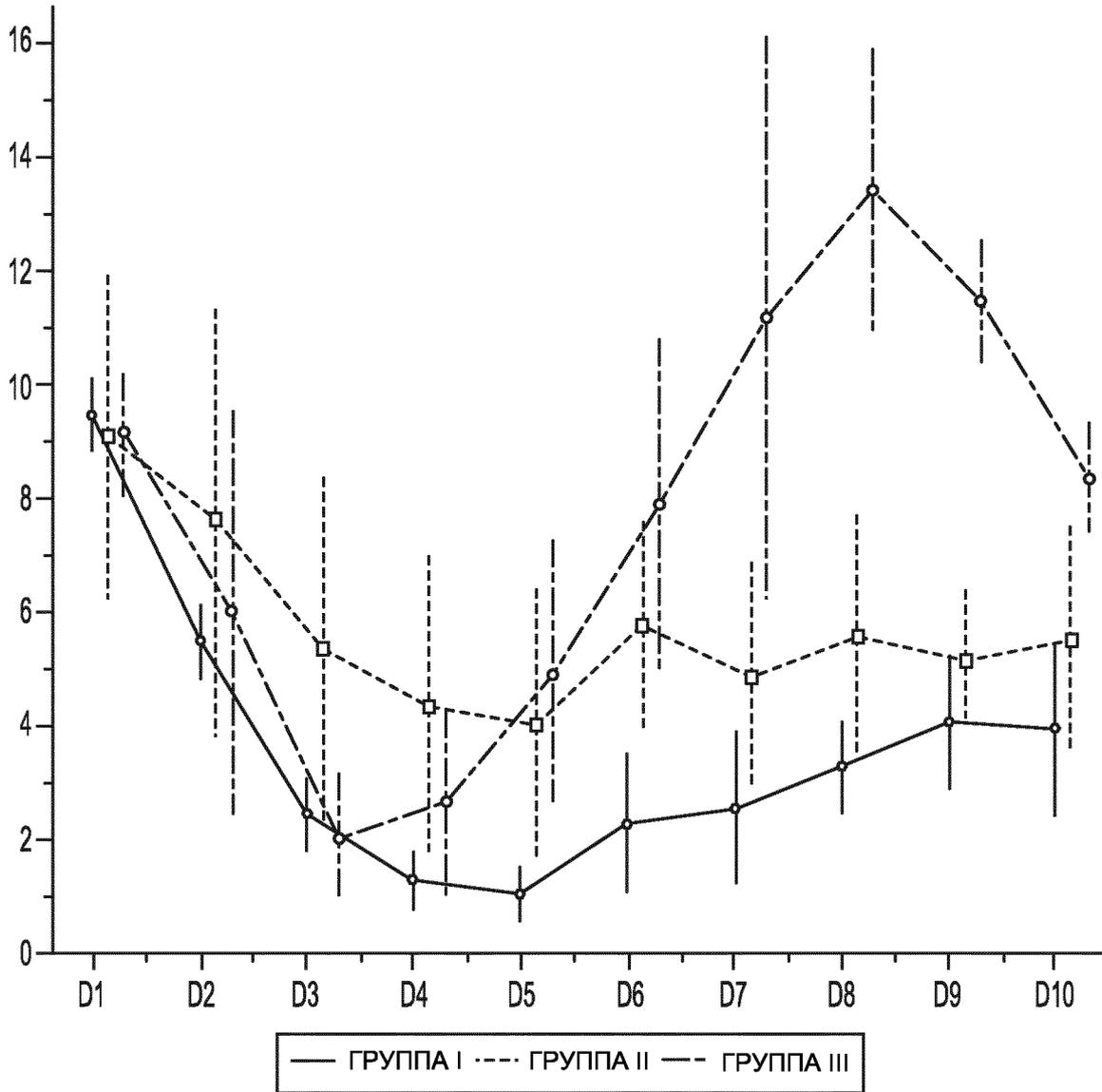
ФИГ. 1



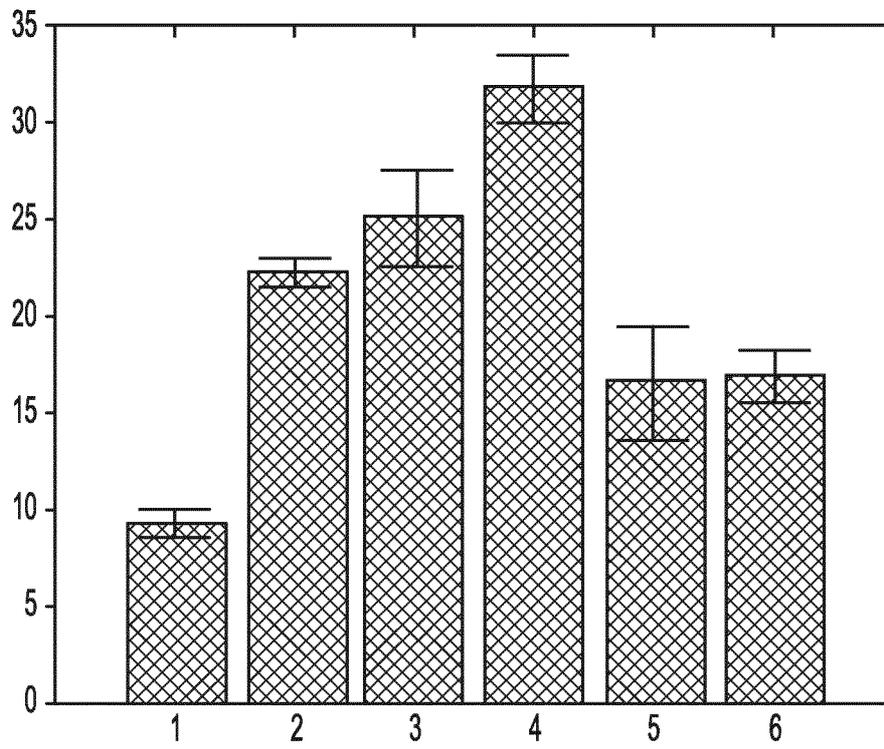
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 3



ФИГ. 4