



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.07.03

(21) Номер заявки  
202292516

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.07

(51) Int. Cl. *A61K 47/61* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C08B 37/08* (2006.01)

## (54) КОНЬЮГАТ НА-ПАКЛИТАКСЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЗОТЕЛИОМЫ

(31) 102020000007747

(32) 2020.04.10

(33) IT

(43) 2022.12.01

(86) PCT/IB2021/052870

(87) WO 2021/205350 2021.10.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.  
(IT)

(72) Изобретатель:  
Пиццокарро Карло, Розато Антонио  
(IT)

(74) Представитель:  
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(56) WO-A2-2004035629  
LUO YI ET AL.: "A Hyaluronic Acid-Taxol  
Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells",  
BIOMACROMOLECULES, vol. 1, no. 2, 13 June  
2000 (2000-06-13), pages 208-218, XP002601147, ISSN:  
1525-7797, DOI: 10.1021/BM000283N [retrieved on  
2000-03-25], cited in the application, the whole document  
US-A1-2010173865

EDMOND AUZENNE ET AL.: "Hyaluronic acid-  
paclitaxel: antitumor efficacy against CD44(+) human  
ovarian carcinoma xenografts", NEOPLASIA, vol. 9, no.  
6, 2007, pages 479-486, XP008139171, ISSN: 1522-8002,  
DOI: 10.1593/NEO.07229, abstract, page 480, page 481,  
right-hand column - page 484 figures; tables

MIRANDA P. WEEN ET AL.: "Role of Versican,  
Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis",  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR  
SCIENCES, vol. 12, no. 2, 31 January 2011  
(2011-01-31), pages 1009-1029, XP055042928, DOI:  
10.3390/ijms12021009, abstract, figures page 1016 - page  
1017

S.J. LEE ET AL.: "Metronomic Activity  
of CD44-Targeted Hyaluronic Acid-Paclitaxel in

Ovarian Carcinoma", CLINICAL CANCER RESEARCH,  
vol. 18, no. 15, August 2012 (2012-08), pages  
4114-4121, XP055750858, ISSN: 1078-0432, DOI:  
10.1158/1078-0432.CCR-11-3250, abstract, page 4117, left-  
hand column, paragraph Results - page 4118, right-hand  
column figures page 4120, right-hand column

RAJENDAR K. MITTAPALLI ET AL.: "Paclitaxel-  
Hyaluronic NanoConjugates Prolong Overall Survival  
in a Preclinical Brain Metastases of Breast Cancer  
Model", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS,  
vol. 12, no. 11, 6 November 2013 (2013-11-06),  
pages 2389-2399, XP055750970, ISSN: 1535-7163, DOI:  
10.1158/1535-7163.MCT-13-0132, abstract, figures page  
2394, right-hand column page 2397, right-hand column, last  
paragraph

CHAD E. GALER ET AL.: "Hyaluronic  
acidpaclitaxel conjugate inhibits growth of human  
squamous cell carcinomas of the head and neck  
via a hyaluronic acid-mediated mechanism", ORAL  
ONCOLOGY, vol. 47, no. 11, 28 July 2011 (2011-07-28),  
pages 1039-1047, XP028320587, ISSN: 1368-8375, DOI:  
10.1016/J.ORALONCOLOGY.2011.07.029 [retrieved on  
2011-08-04], abstract, figures page 1042 - page 1043, left-  
hand column, paragraph 1

ASPLUND T. ET AL.: "HYALURONAN  
RECEPTORS ARE EXPRESSED ON HUMAN  
MALIGNANT MESOTHELIOMA CELLS BUT NOT  
ON NORMAL MESOTHELIAL CELLS", CANCER  
RESEARCH, vol. 54, no. 16, August 1994 (1994-08), pages  
4516-4523, XP000872939, ISSN: 0008-5472, abstract,  
figures; tables page 4520

LOURDES CORTES-DERICKS ET AL.: "CD44  
and its ligand hyaluronan as potential biomarkers  
in malignant pleural mesothelioma: evidence and  
perspectives", RESPIRATORY RESEARCH, vol. 18,  
no. 1, ART. 58, 12 April 2017 (2017-04-12), pages  
1-12, XP055750863, ISSN: 1465-993X, DOI: 10.1186/  
S12931-017-0546-5, abstract, figures; tables

WO-A1-2020084525  
SASAI MASAO ET AL.: "Novel Hyaluronan  
Formulation Enhances the Efficacy of Boron  
Neutron Capture Therapy for Murine Mesothelioma",  
ANTICANCER RESEARCH, vol. 36, no. 3, 14 March 2016  
(2016-03-14), pages 907-912, XP055809687, Retrieved  
from the Internet: URL:https://ar.iiarjournals.org/content/  
anticancer/36/3/907.full.pdf, abstract, page 908, paragraph  
Results - page 909, figures page 910, right-hand column, last  
paragraph

(57) Описаны конъюгат НА-паклитаксел для применения в локорегионарном лечении мезотелиомы, т.е. злокачественной плевральной мезотелиомы, перикардиальной мезотелиомы и перитонеальной

мезотелиомы, предпочтительно злокачественной плевральной мезотелиомы, и соответствующие фармацевтические композиции.

047324 B1

047324 B1

---

### Объект изобретения

Настоящее изобретение описывает конъюгат гиалуроновой кислоты с паклитакселом и композицию, содержащую такой конъюгат или состоящую из него, в сочетании с фармакологически приемлемыми разбавителями/эксципентами, для применения в локорегионарном лечении мезотелиомы, в частности, злокачественной плевральной.

### Область техники

Термин "серозная мембрана или оболочка" означает конкретную ткань, образованную простым плоским эпителием, известным как мезотелий, поддерживаемым подлежащей соединительной, васкуляризованной и иннервированной тканью. Функция серозной оболочки состоит в том, чтобы покрывать органы грудной клетки и брюшной полости, поэтому ее выделяют в висцеральный, слой или листок, покрывающий орган, и париетальный, наружный слой или листок, обращенный к стенке и выстилающий ее; между двумя слоями идентифицируется мнимая полость, известная как серозная полость, содержащая умеренные количества серозной жидкости, вырабатываемые мезотелием, в то время как подлежащая соединительная ткань обеспечивает кровоснабжение и иннервацию, мезотелий полностью свободен от кровеносных сосудов и нервов.

В зависимости от органа или покрытой стенки серозную оболочку дифференцируют на:

- покрывающую сердце и средостение, известную как перикард;
- покрывающую легкие и грудную стенку, известную как плевра;
- покрывающую брюшную стенку и содержащиеся в ней органы, известную как брюшина;
- покрывающую яичко, известную как влагалищная оболочка;
- наконец, покрывающую матку, известную как периметрий.

Таким образом, плевра представляет собой двустенную серозную мембрану, покрывающую и плотно прилегающую к внутренней стенке грудной клетки своим париетальным листком и к дистальной стенке каждого легкого своим висцеральным листком.

Новообразование, возникающее из мезотелиальных клеток, называется мезотелиомой и поэтому может возникать в грудной клетке, брюшной полости и, очень редко, в полости вокруг сердца и в мембране, покрывающей яички.

Мезотелиома - редкая опухоль, составляющая менее 1% всех онкологических заболеваний, даже если ее заболеваемость постоянно растет с 2,2 случаев на миллион человек; это очень агрессивное новообразование, и наиболее распространенной формой является новообразование, поражающее плевру: в данном случае ее определяют как злокачественную плевральную мезотелиому (МРМ), что составляет около 80% всех мезотелиом, тогда как перитонеальная, перикардиальная мезотелиома и тестикулярная мезотелиома встречаются реже; более часто у мужчин, частота встречаемости мезотелиомы увеличивается с возрастом, причем 75% пациентов старше 65 лет.

Наиболее важным фактором риска для плевральной мезотелиомы (но в целом для всех типов мезотелиомы) является подвержение воздействию асбеста: действительно, большинство данных опухолей поражает людей, которые контактировали с этим веществом, в основном, на рабочем месте или живут с людьми, которые его обрабатывают. Асбест представляет собой природный минерал с волокнистой структурой, относящийся к химическому классу силикатов, и благодаря своей особой термостойкости в прошлом он широко применялся для гидро- и теплоизоляции крыш (в материале, известном как этернит), кораблей и поездов, в строительстве (черепице, полах, красках, ...), в костюмах пожарных, в автомобилях (механические компоненты и краски) и в других областях.

Когда этот минерал фрагментируется, например, во время добычи и обработки минерала или при износе содержащего его материала, образуется очень мелкий порошок, остающийся взвешенным в воздухе даже в течение длительного времени и его легко вдыхать. Данный порошок может повредить мезотелиальные клетки, вызывая (в некоторых случаях) рак даже спустя десятилетия после подвержения воздействию. Другими факторами риска развития мезотелиомы являются:

вирус обезьян SV40, использовавшийся в вакцинах против полиомиелита в период с 1955 по 1963 гг.;

диоксид тория, использовавшийся в период между 1920 и 1950 гг.;

облучения грудной клетки и брюшной полости. (Sekido Y. et al., *Carcinogenesis*, 2013, 34(7):1413-9; Remon J. et al., *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(6):584-91).

Лечение мезотелиомы зависит, в целом, от места опухоли, стадии заболевания, возраста пациента и общего состояния здоровья. Стандартные варианты лечения включают хирургическое лечение, лучевую терапию и химиотерапию.

В целом, на I стадии МРМ опухоль ограничивается париетальной плеврой и не присутствует в лимфатических узлах; на II стадии она также поражает висцеральную плевру, легкое или диафрагму; на III стадии опухоль поражает первый слой грудной стенки, часть средостения или точку на грудной стенке; она также может поражать наружную поверхность перикарда и лимфатические узлы на одной из двух сторон грудной клетки; на стадии IV опухоль достигает других органов (метастазирование), таких как печень, мозг, кости или лимфатические узлы на обеих сторонах грудной клетки.

Согласно современным клиническим исследованиям, химиотерапию можно рассматривать в каче-

стве единственного лечения, способного продлить (по меньшей мере частично) жизнь пациента, улучшив, хотя и ограниченно, ее качество. Препаратами, одобренными для такого применения, обычно используемыми отдельно (или чаще в комбинации), являются пеметрексед (Alimta®), цисплатин и ралтитрексед (Tomudex®); в отличие от них, митомин, винорелбин и гемцитабин все еще находятся на экспериментальной стадии, однако злокачественная плевральная мезотелиома МРМ (как и все другие формы мезотелиомы), как правило, невосприимчива к таким средствам лечения и полученные результаты скромны (Stahel R.A. et al., *Ann Oncol.*, 2015, 26(8):1649-60). Химиотерапевтические средства также имеют очень изнурительные побочные эффекты, и, следовательно, существует много неопределенностей и даже противопоказаний к возможности начать химиотерапию при постановке диагноза или при появлении ранних симптомов МРМ.

На сегодняшний день не существует терапии, способной вылечить или значительно замедлить злокачественную плевральную мезотелиому, возможно только уменьшить ее опухолевую массу и, следовательно, продлить срок жизни пациента на несколько месяцев. Наиболее успешные процедуры затрагивают ранние стадии заболевания и сочетают предоперационную химиотерапию с хирургическим вмешательством и последующей послеоперационной лучевой терапией. Однако такой подход может быть предложен только очень молодым пациентам без сопутствующих заболеваний. В любом случае соответствующие исследования, демонстрирующие эффективную пользу касательно продления жизни, пока недоступны. К сожалению, среднее время жизни после постановки диагноза все еще составляет 6-9 месяцев без химиотерапии, 12 месяцев с такой терапией.

Ввиду вышеуказанных причин тестируются новые фармацевтические подходы, такие как, например, иммунотерапия или методы лечения, напрямую направленные на лечение новообразования с применением систем доставки лекарств. Действительно, такие системы могут транспортировать лекарственные средства напрямую к месту опухоли, обеспечивая обработку новообразования более низкими дозами химиотерапевтического агента, чем при системном лечении, следовательно, с меньшей токсичностью и приводя к лучшему качеству жизни пациента, но особенно такие системы, когда они действительно эффективны, способны значительно увеличить ожидаемую продолжительность жизни ракового пациента.

Гиалуроновая кислота (НА) является одним из полимеров (и полисахаридов), применяемых при формировании таких систем доставки лекарств, как в качестве ассоциированного полимера, так и в качестве полимера, химически связанного с многочисленными категориями противоопухолевых препаратов (Liao Y.H. et al., *Drug Deliv.*, 2005, 12(6):327-42). НА представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, это полимер с линейной цепью с молекулярной массой в диапазоне от 50000 до  $13 \times 10^6$  Да, в зависимости от источника, из которого он получен, и используемых методов получения. Он естественным образом присутствует в перицеллюлярных гелях, в основном веществе соединительной ткани позвоночных организмов, в синовиальной жидкости суставов, в стекловидном теле и в пуповине. НА играет важную роль в биологическом организме, например, в качестве механической поддержки клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящ, являясь основным компонентом экстрацеллюлярного матрикса, но также выполняя дополнительные функции, такие как гидратация тканей, смазка клеток, миграция и дифференцировка (Weigel P. et al., *J. Theoretical. Biol.*, 1986:219-234). Среди систем доставки лекарств, использующих НА, известен конъюгат паклитаксела с гиалуроновой кислотой (НА), дериватизированной молекулами гидрозида, связанными с карбоксильной группой НА через амидную связь (Luo Y. et al., *Biomacromolecules*, 2000, 1(2):208-218), однако на сегодняшний день не существует доклинических или клинических испытаний, которые продемонстрировали бы эффективность такого производного.

Также известна система, состоящая из НА, конъюгированной с паклитакселом с помощью спейсера (EP 2045270), было показано, что такой конъюгат, протестированный как в исследованиях *in vitro* (и особенно при раке мочевого пузыря, раке молочной железы и на раковых клетках яичника), являлся по меньшей мере таким же активным, как и референсный препарат, так и в *in vivo* клинических протоколах (продолжающихся в настоящее время) по лечению неинвазивного рака мочевого пузыря (IT 10201800009731).

Конъюгация с НА делает паклитаксел растворимым, и введение паклитаксела может, таким образом, происходить без многочисленных явлений гиперчувствительности, которые обычно возникают во время применения препарата из-за присутствия кремофора EL, солюбилизационного растворителя, используемого в настоящее время в стандартных клинических протоколах, присутствие которого необходимо именно потому, что активный ингредиент является жирорастворимым (Taxol®). Паклитаксел является противораковым агентом (Huizing M.T. et al., *Cancer Inv.*, 1995, 13:381-404), выполняющим свое антипролиферативное действие, воздействуя на организацию микротрубочек клеточной цитоскелетной системы, предотвращая ее нормальную реорганизацию во время митотического деления (Manfredi J.J. et al., *J. Cell Biol.*, 1982, 94:688-696); его основными терапевтическими показаниями являются лечение рака молочной железы, рака легкого, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы и рака эндометрия, и не включает лечение мезотелиомы.

В конъюгате НА-паклитаксел связь между паклитакселом и НА позволяет лекарственному средству

напрямую достигать мембранной поверхности опухолевой клетки, характеризующейся сверхэкспрессией рецептора HA, CD44 (Isacke C.M., et al., Int. J. Biochem. Cell Biol., 2002, 34:718-21). Соответственно, паклитаксел, конъюгированный с HA, способен специфически связываться с CD44 опухолевой клетки, таким образом, способен проникать в клеточную цитоплазму, где посредством гидролиза связи лекарство/HA он активируется. Этот механизм селективного переноса лекарственного средства определяется как "нацеливание" на клетку-мишень.

#### Подробное описание изобретения

Объектом настоящего изобретения является конъюгат HA-паклитаксел для применения в локорегионарном лечении мезотелиомы, следовательно, злокачественной плевральной мезотелиомы, перикардиальной мезотелиомы и перитонеальной мезотелиомы, в частности, для применения в лечении МРМ, где такой конъюгат HA-паклитаксел имеет сложноэфирную связь между карбоксилем гиалуроновой кислоты (HA) и спейсером, в свою очередь связанным сложноэфирной связью через свой карбоксил с гидроксильной группой углерода C2' паклитаксела, где введенный спейсер представляет собой 4-броммасляную кислоту и где степень дериватизации паклитаксела в конъюгате HA-паклитаксел находится в диапазоне, варьирующем от 15 до 21% мас./мас. и предпочтительно от 16 до 20% мас./мас.

Далее в настоящем описании степень дериватизации (или этерификации) вышеупомянутого конъюгата означает массовый процент паклитаксела по отношению к массе конъюгата HA-паклитаксел.

Следовательно, 100 мг конъюгата со степенью дериватизации в диапазоне от 15 до 21% мас./мас. будут содержать 15, 16, 17, 18, 19, или 20, или 21 мг химиотерапевтического паклитаксела, в зависимости от указанной степени дериватизации (для дальнейшего примера степень дериватизации 20% мас./мас. содержит 20 мг паклитаксела на 100 мг конъюгата); однако специалисту очевидно, что в конце таких процессов промышленного синтеза может иметь место небольшое изменение массовых соотношений между молекулами, поэтому здесь и далее заявитель, описывающий и заявляющий диапазон дериватизации вышеупомянутого конъюгата от 15 до 21% мас./мас., намеревается заявить все указанные процентные значения, включая  $\pm 1\%$ : в качестве примера, степень 20% в диапазоне от 15 до 21% мас./мас. соответственно, должна быть задана как  $20 \pm 1\%$ .

Конъюгат HA-паклитаксел для заявленного выше применения был получен в соответствии с известным из уровня техники процессом синтеза, описанным в EP 2045270, и для степени дериватизации 20% улучшен в IT 102018000009731.

В общих чертах в таком процессе синтеза вышеупомянутого конъюгата спейсер/линкер 4-броммасляная кислота вводится между гиалуроновой кислотой и паклитакселем посредством образования сложноэфирной связи между карбоксилем гиалуроновой кислоты и спейсером, причем указанный спейсер, в свою очередь, связан (всегда сложноэфирной связью) через его карбоксил с гидроксильной группой углерода C2' паклитаксела, более точно карбоксильная группа 4-броммасляной кислоты путем активации активирующим агентом и в присутствии катализатора образует сложноэфирную связь с гидроксильной функцией C2' углерода паклитаксела; затем полученное таким образом промежуточное соединение взаимодействует с солью HA в подходящих условиях, что приводит к нуклеофильному замещению COO- у HA на углерод, связанный с бромом спейсера-линкера. Таким образом, образуется сложноэфирная связь между HA и спейсером-линкером, предварительно связанным с паклитакселем.

HA, используемая для синтеза такого конъюгата HA-паклитаксел, может быть получена из любого источника, например, путем экстракции из петушиных гребней (EP 0138572, WO 2018/020458), ферментационным путем (EP 0716688) или биотехнологическим путем (EP 2614088, EP 2614087) и имеет средневзвешенную молекулярную массу (MW) в диапазоне от 400 до  $3 \times 10^6$  Да, в частности от 400 до  $1 \times 10^6$  Да, еще более конкретно от 140000 до 250000 Да (средневзвешенная молекулярная масса означает массу, рассчитанную способом "внутренней вязкости" (Terbojevich et al., Carbohydrate, 1986, 363-377).

Предпочтительно HA, используемая для синтеза конъюгата HA-паклитаксел для применения согласно настоящему изобретению, представляет собой ферментационную HA со средневзвешенной MW в диапазоне от 140000 до 250000 Да.

Предпочтительно конъюгат HA-паклитаксел для применения согласно настоящему изобретению имеет среднюю степень дериватизации 20% мас./мас.

Еще одним объектом настоящего изобретения является также фармацевтическая композиция, состоящая по существу из описанного выше конъюгата HA-паклитаксел в сочетании с фармакологически приемлемыми разбавителями/эксципиентами, предпочтительно фармацевтическая композиция, приготовленная в стерильной изотонической воде, содержащая 5% мас./об. глюкозы, для применения в локорегионарном лечении мезотелиомы, следовательно, злокачественной плевральной мезотелиомы, перикардиальной мезотелиомы и перитонеальной мезотелиомы, предпочтительно для применения в лечении злокачественной плевральной мезотелиомы.

Таким образом, такая фармацевтическая композиция изготавливается в виде стерильного и изотонического водного раствора, состоящего по существу из самого конъюгата.

Заявитель описывает и заявляет конъюгат для применения выше в локорегионарном лечении всех известных и упомянутых выше форм мезотелиомы и предпочтительно для применения в локорегионар-

ном лечении МРМ, поскольку ниже демонстрируется синергический эффект НА и паклитаксела, химически связанных в конъюгатном объекте изобретения, в тестах, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, в сравнении с неконъюгированным паклитакселом.

Полученные результаты, как в терминах  $IC_{50}$  для *in vitro* исследований, так и выраженные в виде биолюминесцентных значений как индекс размера опухолевой массы у обработанных животных, неожиданно демонстрируют фармакологическую активность конъюгата НА-паклитаксел и синергический эффект конъюгата гиалуроновой кислоты с химиотерапевтическим агентом по сравнению с неконъюгированным паклитакселом при лечении мезотелиомы, в частности плевральной мезотелиомы.

Такой результат является еще более важным с учетом того, что локорегионарное лечение претендует на то, чтобы быть заявленным для такого конъюгата: данный путь введения, т.е. интраплевральный или интраперитонеальный и интраперикардиальный, фактически позволяет вводить конъюгат непосредственно в опухолевую массу в более низких/аналогичных дозах или даже выше, чем у референсного химиотерапевтического средства, чтобы получить терапевтическую эффективность выше, чем у референсного лекарственного средства, с сохранением высокого профиля безопасности.

Конъюгат НА-паклитаксел действительно остается в виде депо в полости введения непосредственно в контакте с опухолевой массой в течение продолжительного времени, что, таким образом, обеспечивает его концентрацию, главным образом, в месте действия (а не на системном уровне), максимизируя, таким образом, взаимодействие с опухолью без повреждения окружающей ткани, уменьшая побочные эффекты. Также применяется механизм селективного транспорта лекарственного средства в опухолевую клетку из-за высокой экспрессии CD44 на поверхности таких клеток за счет "нацеленного" действия гиалуроновой кислоты.

Испытания на животных, описанные ниже, в особенности демонстрируют эффективность такого конъюгата НА-паклитаксел *in vivo*, причем такая эффективность у людей приведет не только к повышению выживаемости у больных, но также и к лучшему качеству жизни для категории пациентов, которые, как сообщалось ранее, имеют крайне ограниченную продолжительность жизни даже после курса химиотерапии.

Пример 1.

Цитотоксичность конъюгата НА-паклитаксел в клетках мезотелиомы по сравнению с паклитакселом.

Экспериментальная процедура: цитотоксическую активность конъюгата НА-паклитаксел, являющегося объектом изобретения, оценивали *in vitro* путем постановки МТТ анализа на коммерчески доступных клеточных линиях мезотелиомы человека H2052, H28 и H2452, где все эти клеточные линии экспрессируют рецептор гиалуроновой кислоты CD44. Конъюгат, использованный для такого испытания, был приготовлен в соответствии с ИТ 102018000009731, следовательно, со средней степенью дериватизации 20% мас./мас., начиная с ферментационной НА со средневзвешенной MW в диапазоне от 140000 до 250000 Да.

Клетки засеивали (день 0) в многолуночный планшет с 96 плоскодонными лунками (3000 клеток на лунку) в культуральной среде EMEM (минимальная необходимая среда Орла, SIGMA, Сент-Луис, Миссури, США), а затем их инкубировали 24 ч при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день (день 1) среду меняли, обеспечивая клетки свежей средой EMEM, содержащей альтернативно либо паклитаксел в качестве контроля, либо конъюгат НА-паклитаксел в подходящих разведениях. После двух дней инкубирования (день 3) каждую лунку, содержащую клетки, обрабатывали 100 мкл реагента 3-2,5-дифенилтетразолий бромид (5 мг/мл в DMEM (модифицированная по Дульбекко среда Игла) в течение 90 мин. Далее, при удалении реагента из каждой лунки и соответствующем добавлении 100 мкл DMSO (диметилсульфоксид) измеряли абсорбцию формазановой соли (синего цвета, полученной в результате реакции разрушения тетразолиевого кольца МТТ, выполняемой митохондриальным ферментом "сукцинатдегидрогеназой", присутствующим только в жизнеспособных клетках) при длине волны 570 нм с помощью многопланшетного ридера. Такой МТТ тест, широко известный квалифицированному специалисту, позволяет оценить жизнеспособность клеток, обработанных конъюгатом, по сравнению с клетками, обработанными только паклитакселом, и, таким образом, определить восприимчивость вышеупомянутых клеток к тестируемым образцам. Затем данные нормализовали к контролю и рассчитали значение  $IC_{50}$  в мкг/мл конъюгата (выраженное в пересчете на паклитаксел-эквиваленты) по сравнению с неконъюгированным паклитакселом.

Результаты сведены в таблице ниже, где четко видно, что конъюгат НА-паклитаксел проявляет активность (следовательно, противоопухолевую эффективность), вплоть до 65-70 раз большую, чем таковая у неконъюгированного паклитаксела.

Нормализованный  $IC_{50}$ , мкг/мл

	НА-паклитаксел	паклитаксел
<b>H2452</b>	0,0122	0,8
<b>H28</b>	0,033	0,787
<b>H2052</b>	0,0342	0,225

## Пример 2.

Исследование *in vivo* на иммунодефицитных NSG мышах.

Клеточные линии мезотелиомы человека H2052 трансдуцировали лентивирусным вектором (способ, которым гены могут быть вставлены в клетки с применением лентивируса), содержащим двунаправленный промотор, обеспечивающий высокую и скоординированную экспрессию двух репортерных генов для синтеза люциферазы и eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок), как описано у Amendola et al., Nat. Biotechnol. 2005, 23:108-16: люцифераза представляет собой фермент, который катализирует окисление люциферина, окисление которого высвобождает энергию (электроны) в виде светового излучения, и такая реакция обладает сверхвысокой чувствительностью; eGFP получают из медузы *Aequorea victoria*, и он способен испускать яркий зеленый свет при воздействии определенных длин волн; оба белка применяют ниже в качестве "маркерной системы" для клеток мезотелиомы человека H2052, трансдуцированных, как указано выше, для идентификации опухолевой массы, которая образуется у животных, инъецированных такими клетками, и для определения ее размеров и роста с течением времени с помощью подходящего биоломинесцентного датчика.

Клетки инкубировали 6 ч в смеси полной среды (RPMI + 10% FBS (фетальная телячья сыворотка), 1% NEPEP ((4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), L-глутамин и пенициллин/стрептомицин), содержащей вышеупомянутый вектор и протамина сульфат. В конце 6 ч инкубирования супернатанты повторно объединяли с полной средой. Через 5 дней эффект трансдукции оценивали с помощью проточной цитометрии.

Затем клетки размножали и подразделяли на подгруппы, чтобы выделить популяцию с более высокой экспрессией репортерных генов. Такие трансдуцированные и отобранные клетки затем инъецировали в брюшину NSG мышей (т.е. иммунодефицитных, которые, таким образом, позволяют приживление широкого спектра раковых клеток человека), 10 мышей/образец, которые затем подвергались следующей обработке:

1° образец, обработанный НА-паклитакселом, 40 мг/кг, путем интраперитонеального (ip) локорегионарного введения;

2° образец, обработанный паклитакселом, 10 мг/кг, путем внутривенного введения (iv) в течение 3 процедур, затем переход на ip введение из-за очень плохой переносимости iv введения паклитаксела NSG мышами;

3° образец, обработанный паклитакселом, 10 мг/кг, путем интраперитонеального (ip) локорегионарного введения;

4° необработанный образец;

путем еженедельного введения в течение 10 недель.

Всех обработанных животных контролировали путем детекции биоломинесценции, испускаемой их опухолевой зоной, обработанной конъюгатом НА-паклитаксел, чтобы оценить с течением времени размер (и, следовательно, рост) опухоли относительно животных, не обработанных каким-либо химиотерапевтическим агентом, и тех, кого обрабатывали неконъюгированным паклитакселом.

Результаты нанесены на фиг. 1, где наглядно видно, что люминесценция (выраженная в фотонах/с, Ф/с) необработанных животных достигает средних значений величин порядка  $1 \times 10^{12}$  на 100-й день выживания, что указывает, следовательно, на размер/рост, достигнутый необработанной опухолью; образцы 2° и 3°, оба обработанные неконъюгированным паклитакселом с различными способами введения, сравниваются с таким контролируемым образцом: это сравнение указывает на важный результат для обоих, поскольку оказывается, что достигнутые средние значения люминесценции находятся в порядке величин  $1 \times 10^{11}$ , следовательно, ниже, чем необработанные, это указывает на сокращенную опухолевую массу по сравнению с контролем.

Однако результат применения конъюгата НА-паклитаксел совершенно неожиданный, поскольку с 14 по 125 дни выживаемости люминесценция резко падает и остается незначительной с течением времени. Эти совершенно непредвиденные данные демонстрируют значительное уменьшение опухоли как по сравнению с необработанным контролем, так и по сравнению с животными, получавшими неконъюгированный химиотерапевтический агент, вводимый внутривенно iv и ip, что демонстрирует общую эффективность конъюгата как такового. На фиг. 1 данные по люминесценции, относящиеся к конъюгату НА-паклитаксел, представлены в третьем из четырех столбцов, соответствующих дням выживаемости, указанным по оси абсцисс.

На фиг. 2 вместо этого представлены данные, полученные после 139 дней наблюдения, где наглядно видно, что детекция биоломинесценции в Ф/с, испускаемой их обработанной опухолевой зоной и, следовательно, отображающей опухолевую массу, остается равной примерно  $1-2 \times 10^{11}$  у мышей, получавших неконъюгированный паклитаксел, в то время как у мышей, получавших конъюгат, такое значение чрезвычайно низко и близко к 0, что, следовательно, указывает на почти полное уменьшение опухолевой массы.

Посредством результатов, обсужденных выше, заявитель продемонстрировал фармакологическую активность и, следовательно, эффективность конъюгата НА-паклитаксел при локорегионарном лечении

мезотелиомы, в частности МРМ, перитонеальной и перикардиальной мезотелиомы, поскольку он способен к установлению значительного уменьшения опухолевой массы, соответственно увеличивая выживаемость пациента и качество его жизни.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение конъюгата НА-паклитаксел в локорегионарном лечении мезотелиомы, где указанный конъюгат гиалуроновая кислота-паклитаксел имеет сложноэфирную связь между карбоксилем гиалуроновой кислоты (НА) и спейсером, в свою очередь связанным сложноэфирной связью через свой карбоксил с гидроксильной группой углерода С2' паклитаксела, где введенный спейсер представляет собой 4-броммасляную кислоту, где степень дериватизации паклитаксела в указанном конъюгате НА-паклитаксел находится в диапазоне, варьирующем от 15 до 21% мас./мас., и где НА, используемая для синтеза конъюгата НА-паклитаксел, представляет собой ферментационную НА со средневзвешенной MW (молекулярной массой), варьирующей от 140000 до 250000 Да.

2. Применение конъюгата НА-паклитаксел по п.1, где мезотелиома представляет собой злокачественную плевральную мезотелиому, перикардиальную мезотелиому и перитонеальную мезотелиому.

3. Применение конъюгата НА-паклитаксел по п.1, где мезотелиома представляет собой злокачественную плевральную мезотелиому.

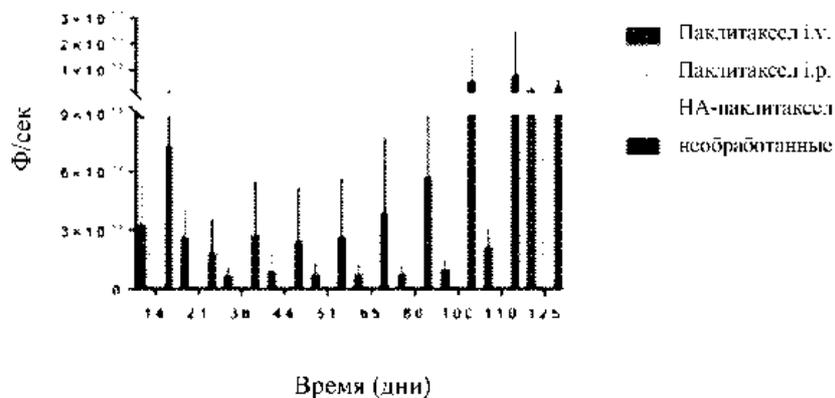
4. Применение конъюгата НА-паклитаксел по одному или более чем одному из пп.1-3, где путь введения представляет собой интраплевральный или интраперитонеальный и интраперикардиальный путь введения.

5. Применение конъюгата НА-паклитаксел по одному или более чем одному из пп.1-4, где степень дериватизации паклитаксела в конъюгате НА-паклитаксел варьирует от 16 до 20% мас./мас.

6. Применение конъюгата НА-паклитаксел по одному или более чем одному из пп.1-5, где степень дериватизации паклитаксела в конъюгате НА-паклитаксел равна 20% мас./мас.

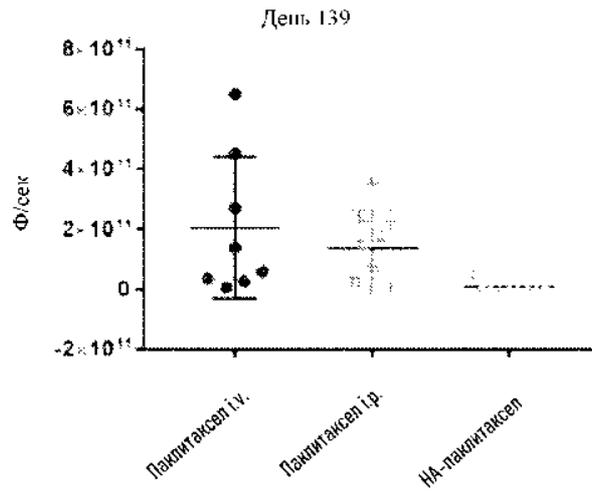
7. Применение фармацевтической композиции, по существу состоящей из конъюгата НА-паклитаксел, в сочетании с фармакологически приемлемыми разбавителями/эксципиентами, в соответствии с любым из пп.1-6.

8. Применение фармацевтической композиции по п.7, где указанная фармацевтическая композиция приготовлена в стерильной изотонической воде, содержащей 5% мас./об. глюкозы.



Фиг. 1

047324



Фиг. 2

