

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047692**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.08.28**

(21) Номер заявки  
**201791147**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.11.24**

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 51/12** (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ЕЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЯ**(31) **14306875.7**(32) **2014.11.25**(33) **EP**(43) **2017.11.30**(86) **PCT/EP2015/077425**(87) **WO 2016/083333 2016.06.02**

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

(72) Изобретатель:  
**Жермэн Матгье, Мер Мари-Эдит,  
Поттье Аньес, Леви Лоран (FR)**

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

(56) **WO-A1-2005063305****EP-A2-2000150****WO-A2-2012104277****WO-A2-2012104275**

**HE C. ET AL.: "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 31, no. 13, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 3657-3666, XP026946003, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.01.065 [retrieved on 2010-02-06], the whole document**

**"NCL Method PCC-2 Measuring Zeta Potential of Nanoparticles", 1 November 2009 (2009-11-01), XP055171529, Retrieved from the Internet: URL:http://ncl.cancer.gov/NCL\_Method\_PCC-2.pdf [retrieved on 2015-02-23], the whole document**

**WO-A2-2014057432**

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно фармацевтическое соединение, подлежащее введению субъекту, нуждающемуся в таком фармацевтическом соединении, причем комбинация по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего фармацевтическое соединение(я), усиливает эффективность соединения(я). Наибольший размер биосовместимой наночастицы обычно составляет от приблизительно 4 до приблизительно 500 нм, и абсолютная величина поверхностного заряда составляет по меньшей мере 10 мВ (|10 мВ|). Носитель при этом не содержит какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента. Изобретение также относится к такой композиции для применения для введения фармацевтического соединения(й) субъекту, нуждающемуся в этом, причем по меньшей мере одну биосовместимую наночастицу и по меньшей мере один носитель, содержащий по меньшей мере одно фармацевтическое соединение, следует вводить субъекту, нуждающемуся в указанном фармацевтическом соединении, обычно с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга.

**B1****047692****047692****B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, как правило, по меньшей мере одно фармацевтическое соединение, подлежащее введению субъекту, нуждающемуся в таком по меньшей мере одном представляющем интерес соединении, причем комбинация по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, усиливает эффективность представляющего интерес соединения(й). Наибольший размер биосовместимой наночастицы обычно составляет от приблизительно 4 до приблизительно 500 нм, и абсолютная величина поверхностного заряда составляет по меньшей мере 10 мВ (|10 мВ|). Носитель не содержит какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента.

Изобретение также относится к такой композиции для применения для введения представляющего интерес соединения(й) субъекту, нуждающемуся в этом, причем по меньшей мере одну наночастицу, с одной стороны, и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение, с другой стороны, следует вводить указанному субъекту последовательно, обычно с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга.

Комбинированное и, как правило, последовательное введение субъекту по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), сохраняет фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) эффективность указанного представляющего интерес соединения(й) при его сниженной токсичности у указанного субъекта или увеличивает его фармацевтическую эффективность при эквивалентной или сниженной токсичности по сравнению с фармацевтической эффективностью и токсичностью, вызванной указанным соединением (соединениями) при введении в стандартной фармацевтической дозе, как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

Фармацевтическая композиция по изобретению обычно позволяет уменьшить по меньшей мере на 10% фармацевтическую дозу(ы) вводимого соединения(й) по сравнению со стандартной фармацевтической дозой(дозами) указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя, при сохранении той же фармацевтической эффективности при эквивалентной токсичности, предпочтительно при сниженной токсичности, для субъекта или при увеличении фармацевтической эффективности при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта.

### Уровень техники

Использование нанотехнологий для доставки терапевтических и диагностических средств более безопасным и эффективным способом для пациентов привело к повышенному интересу к этой области в течение последних десятилетий. Появились системы доставки лекарственных средств, как правило, носители, такие как липосомы, эмульсии или мицеллы, предназначенные для максимизации терапевтической эффективности лекарственных средств благодаря контролю профиля их биораспределения. Эти системы дают возможность инкапсулировать плохо растворимый препарат, защитить препарат от разрушения или элиминации и/или изменить циркуляцию в крови и распределение лекарственного средства.

Наблюдаемый быстрый клиренс в крови первого поколения систем доставки лекарственных средств (DDS) (из-за их захвата мононуклеарной фагоцитарной системой (MPS)) подтолкнул к разработке второго поколения DDS, обладающих поверхностью, модифицированной стерически стабилизирующими агентами, выбранными для привнесения свойства "малозаметности" в DDS при прикреплении к ее поверхности. Эти агенты, как правило, представляют собой гибкие и/или гидрофильные полимеры, такие как полиэтиленгликолевые (ПЭГ) полимеры, и, как правило, могут нести поверхностный заряд, который является слабо отрицательным или положительным. Стерическая стабилизация предотвращает неспецифическое связывание поверхности DDS с компонентами крови и снижает ее быстрое поглощение и клиренс *in vivo* клетками мононуклеарной фагоцитарной системы (MPS), что приводит к пролонгированному времени циркуляции DDS в кровотоке [Jain K.R. and Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 2010, 7, 653-664]. Липосомальные долго циркулирующие системы доставки лекарственных препаратов в форме наночастиц (NDDS) являются чаще всего исследуемым типом NDDS; однако синтетические амфифильные полимеры также были использованы, чтобы стерически стабилизировать другие типы NDDS для изменения их биораспределения [Torchilin V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2014, 13, 813-827].

Несмотря на это увеличение времени циркуляции в крови (т.е. улучшенную транспортировку в крови), которое считалось значимым для доставки терапевтического соединения к его сайту-мишени, было обнаружено, что гибкое и/или гидрофильное полимерное покрытие, как правило, ПЭГ-покрытие, негативно влияло на внутриклеточную доставку фармацевтического соединения (т.е. высвобождение соединения на его сайте-мишени), что в конечном итоге привело к потере активности для системы доставки. Способ преодоления этого ограничения заключается в использовании расщепляемых ПЭГ-систем. Однако возрастающая сложность конструкции таких носителей может создавать трудности в воспроизводимости свойств поверхности носителя, что приводит к неприемлемой изменчивости характеристик от пар-

тии к партии. Более того, продление времени воздействия этих "малозаметных" DDS было связано с большим числом побочных эффектов. Было обнаружено, например, что DOXIL, пэгилированный липосомальный состав, содержащий доксорубин, является причиной серьезных побочных эффектов, таких как синдром "кисть-стопа" или мукузит.

Гидрофильное покрытие липосом было исследовано как вероятно способствующее их накоплению в эккриновой потовой железе на ладонной поверхности кисти и подошве стопы [Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ("hand-foot" syndrome). D. Lorusso с соавт. *Annals of Oncology*. 2007; 18, 1159-1164].

WO 2005/063305 относится к сборке, содержащей газонаполненный микропузырек (размером обычно по меньшей мере 0,5 мкм) и компонент (размером приблизительно менее 100 нм), присоединенный к указанному микропузырьку. Полученная сборка предназначена для применения в качестве фармацевтически активного компонента в диагностически и/или терапевтически активных составах. Два компонента, т.е. газонаполненный микропузырек и компонент, присоединенный к микропузырьку, вводят одновременно обычно для улучшения изображения в области ультразвуковой контрастной визуализации, включая прицельную ультразвуковую визуализацию, опосредованную ультразвуком доставку лекарственных препаратов и другие методы визуализации.

Как видно из предшествующего уровня техники и, несмотря на длительную медицинскую потребность, безопасная и эффективная доставка фармацевтических соединений (включая терапевтические, профилактические и диагностические соединения) к их сайту(ам)-мишени(ям) остается проблемой. Существует явная потребность в улучшении эффективности и безопасности соединения, или, другими словами, в транспортировке и высвобождении фармацевтического соединения, чтобы указанное соединение достигло своего сайта-мишени у субъекта в необходимом и достаточном количестве, чтобы получить желаемый диагностический, терапевтический или профилактический эффект.

#### Подробное описание

Настоящее изобретение в настоящее время позволяет оптимизировать эффективность представляющего интерес соединения (в данном описании также просто именуемого как "соединение") независимо от его предполагаемого применения в контексте терапии, профилактики или диагностики. Композиция, описанная в данном документе, которая представляет собой комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, оптимизирует фармакокинетические параметры по меньшей мере одного представляющего интерес соединения, и, как следствие, в настоящее время делает возможным разработку фармацевтических соединений, которые не могли быть разработаны иначе, например, из-за их неприемлемой токсичности. Как правило, биосовместимую наночастицу не применяют как таковую в качестве фармацевтического соединения, т.е. в качестве терапевтического, профилактического или диагностического соединения.

Типичная композиция по изобретению (в данном описании обычно именуемая как "фармацевтическая композиция") представляет собой композицию, содержащую комбинацию (i) по меньшей мере биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере носителя, содержащего по меньшей мере одно соединение ("представляющее интерес соединение"), где наибольший или самый большой размер биосовместимой наночастицы обычно составляет от приблизительно 4 до приблизительно 500 нм и абсолютная величина поверхностного заряда биосовместимой наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ и где носитель не содержит какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, т.е. не содержит гибкий и/или гидрофильный полимер, предпочтительно не содержит гидрофильный полимер, несущий слабо отрицательный или положительный заряд к поверхности носителя, такой как ПЭГ.

Как правило, соотношение между (по меньшей мере одной) биосовместимыми наночастицами и (по меньшей мере одним) носителями, содержащими по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, составляет от 0,1/1 до 1000/1 или от 0,5/1 до 1000/1, предпочтительно от 0,5/1 до 500/1, еще более предпочтительно от 0,5/1 до 300/1.

Термины "приблизительно" и "около", когда они связаны со значением, таким как, например, размер наночастицы или временной интервал, указывают на то, что отклонение от указанного значения, которое было бы признано квалифицированным специалистом как небольшое отклонение, существенно не влияет на свойства объекта, с которым оно связано, и что указанный объект остается в пределах сущности заявленного изобретения.

Предпочтительным предметом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, как правило по меньшей мере одно фармацевтическое соединение, где наибольший или самый большой размер биосовместимой наночастицы составляет от приблизительно 4 до приблизительно 500 нм и абсолютная величина поверхностного заряда биосовместимой наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ (10 мВ) и где носитель не содержит какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, для применения для введения по меньшей мере одного представляющего интерес соединения субъекту, нуждающемуся в этом, причем по меньшей мере одну наночастицу, с одной стороны, и по меньшей мере

один носитель, содержащий представляющее интерес соединение, с другой стороны, следует вводить раздельно субъекту, нуждающемуся в указанном по меньшей мере одном представляющем интерес соединении, обычно с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга, и где биосовместимую наночастицу не применяют как таковую в качестве фармацевтического соединения.

Комбинированное и, как правило, последовательное введение субъекту по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), путем применения композиции по изобретению, обычно дает (сохраняет) ту же фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) эффективность соединения(й) при его сниженной токсичности для субъекта или увеличивает фармацевтическую эффективность соединения(й) при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта (предпочтительно при сниженной токсичности) по сравнению с фармацевтической эффективностью и токсичностью, вызванной стандартной фармацевтической дозой указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

Фармацевтическая композиция по изобретению обычно позволяет уменьшить по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 15%, вводимую фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) дозу(ы) соединения(й) по сравнению со стандартной фармацевтической дозой(ами) указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя, (i) при сохранении той же фармацевтической эффективности при эквивалентной токсичности, предпочтительно при сниженной токсичности, для субъекта или (ii) при увеличении фармацевтической эффективности при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта.

Биосовместимая наночастица.

Поскольку форма частицы может влиять на ее "биосовместимость", частицы, имеющие качественно однородную форму, являются предпочтительными. Таким образом, по фармакокинетическим причинам предпочтительными являются наночастицы, являющиеся по существу сферическими/круглыми или яйцевидными по форме. Такая форма также способствует взаимодействию наночастиц с клетками или поглощению ими. Особенно предпочтительна сферическая/круглая форма.

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

Термины "размер наночастицы", "самый большой размер наночастицы" и "наибольший размер наночастицы" в данном описании обычно относятся к "наибольшему или самому большому размеру наночастицы" или "диаметру наночастицы", когда она сферическая/круглая или яйцевидная по форме. Трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ) или крио-ТЕМ можно использовать для измерения размера наночастицы. Кроме того, для измерения гидродинамического диаметра наночастиц в растворе можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). Эти два способа могут также быть использованы один за другим для сравнения гидродинамического диаметра наночастицы, измеренного с помощью DLS, с размером указанной наночастицы, измеренным с помощью ТЕМ или крио-ТЕМ, для подтверждения указанного размера.

Предпочтительным способом является DLS (см. Международный стандарт ISO22412 Анализ размера частиц - Динамическое рассеяние света, Международная организация по стандартизации (ISO) 2008).

Для использования в контексте изобретения абсолютный электростатический поверхностный заряд (также именуемый в данном описании как "заряд" или "поверхностный заряд") биосовместимой наночастицы должен быть выше  $|10 \text{ мВ}|$  (абсолютная величина). Поверхностный заряд наночастицы обычно определяют измерением дзета-потенциала в водной среде для концентрации наночастиц от 0,2 до 10 г/л, для рН от 6 до 8 и обычно для концентраций электролитов в водной среде от 0,001 и 0,2 М, например 0,01 или 0,15 М.

Как правило, биосовместимая наночастица по настоящему изобретению имеет электронный поверхностный заряд по меньшей мере  $|10 \text{ мВ}|$ , т.е. ниже -10 мВ или выше 10 мВ, например ниже от -12 мВ или -15 мВ до -20 мВ или выше от 12 мВ или 15 мВ до 20 мВ, обычно ниже -15 мВ или выше 15 мВ. Предпочтительно, чтобы биосовместимая наночастица по настоящему изобретению имела абсолютную величину электронного поверхностного заряда ("абсолютная величина поверхностного заряда") более 10 мВ, причем упомянутый заряд еще более предпочтительно является отрицательным зарядом.

Комбинированные свойства, размер и поверхностный заряд, наночастиц позволяют обеспечить короткое время циркуляции наночастиц в крови и экстравазацию в печень. Следовательно, путем последовательного введения биосовместимых наночастиц по изобретению и носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), никакой совместной циркуляции или ограниченной совместной цирку-

ляции двух соединений (т.е. биосовместимой наночастицы и носителя, содержащего соединение(я)) не достигается. Таким образом, комбинированные свойства биосовместимых наночастиц, размер и поверхностный заряд, позволяют безопасно использовать представляющее интерес соединение при обеспечении (сохранении) той же фармацевтической (т.е. терапевтической, профилактической или диагностической) эффективности соединения(й) при его сниженной токсичности для субъекта или, другими словами, при увеличении фармацевтической эффективности соединения(й) при его эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта (предпочтительно сниженной токсичности) по сравнению с фармацевтической эффективностью и токсичностью, вызванной стандартной фармацевтической дозой указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

При условии, если она заряжена, наночастица, используемая в контексте изобретения, может быть органической или неорганической. Можно также использовать смесь органических и неорганических наночастиц.

Когда она органическая, наночастица может представлять собой наночастицу на основе липидов (глицеролипида, фосфолипида, стероидного липида и т.д.), такую как твердая липидная наночастица, наночастицу на основе белка, также именуемую в данном описании как "белок-наночастица" (например, альбумин), наночастицу на основе полимера ("полимерная наночастица"), наночастицу на основе сополимера ("сополимерная наночастица"), наночастицу на основе углерода, вирусоподобную наночастицу (например, вирусный вектор).

Органическая наночастица может также представлять собой наносферу (сплошную наночастицу) или нанокapsулу (полую наночастицу), такую как липосома, гель, гидрогель, мицелла, дендример и т.д. Также может быть использована смесь описанных в данном документе органических наночастиц.

Полимер или сополимер могут быть природного или синтетического происхождения.

Примеры синтетических (искусственных) и природных полимеров или сополимеров, используемых в контексте изобретения для получения органических наночастиц, могут быть выбраны из полимолочной кислоты (PLA), поли(лактид-со-гликолевой)кислоты (PLGA), полиэтиленгликоля (PEG), полиглактина, полилактида, сложных эфиров полиоксиэтилена и жирных кислот, полипропиленгликоля, полисорбата, поливинилового спирта, полиакриламида, полиметилметакрилата, полиалкилцианоакрилата, полилактат-со-гликолята, поли(амидоамин), поли(этиленимин), альгината, целлюлозы и целлюлозных производных полимеров, коллагена, гиалуроновой кислоты, полиглутаминовой кислоты (PGA), актина, полисахарида и желатина.

Когда она неорганическая и когда ее самый большой размер в основном составляет ниже приблизительно 10 нм, например ниже приблизительно 8 нм, ниже приблизительно 7 нм, в основном составляет от приблизительно 7 до приблизительно 4 нм, например, ниже приблизительно 6 нм, ниже приблизительно 5 нм или ниже приблизительно 4 нм, наночастица может быть изготовлена из любого неорганического материала. Неорганический материал может, например, содержать металлический элемент из 3, 4, 5, 6 периодов Периодической таблицы Менделеева, включая лантаноиды. Когда самый большой размер наночастицы составляет в основном ниже приблизительно 10 нм, наночастицы могут собираться в более крупные структуры. Сборка наночастиц в более крупную структуру обычно может быть вызвана взаимодействием между наночастицами и биосовместимым полимером(ами), белком(ами) и т.д. Более крупную структуру можно также получить путем захвата наночастиц в носителе, обычно сплошном носителе, таком как желатиновая структура (также именуемая в данном описании как "желатиновая наночастица") или полем носителя, таком как липосома. Эти более крупные структуры могут быть также разработаны специалистом в данной области техники для высвобождения наночастиц после введения *in vivo*.

Когда она неорганическая и когда самый большой размер указанной наночастицы в основном составляет по меньшей мере 10 нм, в основном от 10 до 500 нм, наночастица может содержать по меньшей мере один из или может состоять из (i) одного или нескольких двухвалентных металлических элементов, выбранных, например, из Mg, Ca, Ba и Sr, (ii) одного или нескольких трехвалентных металлических элементов, выбранных, например, из Fe и Al, и (iii) одного или нескольких четырехвалентных металлических элементов, включая Si.

В конкретном варианте осуществления неорганический материал наночастицы выбирают из (i) одного или нескольких двухвалентных металлических элементов, выбранных, например, из Mg, Ca, Ba и Sr, (ii) одного или нескольких трехвалентных металлических элементов, выбранных, например, из Fe и Al, и (iii) одного или нескольких четырехвалентных металлических элементов, включая Si.

В следующем конкретном варианте осуществления неорганический материал наночастицы выбирают из карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ), карбоната магния ( $\text{MgCO}_3$ ), гидроксида магния ( $\text{Mg(OH)}_2$ ), гидроксида железа ( $\text{Fe(OH)}_2$ ), оксигидроксида железа ( $\text{FeOOH}$ ), оксида железа ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  или  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), оксида алюминия ( $\text{Al}_3\text{O}_4$ ), гидроксида алюминия ( $\text{Al(OH)}_3$ ), оксигидроксида алюминия ( $\text{AlOOH}$ ) и оксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ).

Наночастицы, используемые в описанных в данном документе композициях, должны быть биосовместимыми, т.е. совместимыми с живыми тканями. В случаях, когда это обусловлено их составом, наночастицы соответственно должны быть покрыты биосовместимым материалом, чтобы стать пригодными для применения. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная в данном описании

наночастица, таким образом, покрыта биосовместимым покрытием.

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

Агент, образующий положительный заряд на поверхности наночастиц, может быть выбран, например, из аминопропилтриэтоксисилана или полилизина. Агент, образующий отрицательный заряд на поверхности наночастиц, может быть выбран, например, из фосфата (например, полифосфата, метафосфата, пирофосфата и т.д.), карбоксилата (например, цитрата или дикарбоновой кислоты, в частности янтарной кислоты) и сульфата.

В конкретном варианте осуществления, поскольку абсолютный заряд наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ (|10 мВ|), наночастица может быть покрыта биосовместимым материалом, содержащим агент, имеющий стерическую группу, такой агент, который также именуется в данном описании как "поверхностный стерически стабилизирующий агент".

Такой агент, имеющий стерическую группу, может быть выбран, например, из полиэтиленгликоля (PEG); полиэтиленоксида; поливинилового спирта; полиакрилата; полиакриламида (поли(N-изопропилакриламид)); поликарбамида; биополимера; полисахарида, такого как декстран, ксилан и целлюлоза; коллагена; цвиттер-ионного соединения, такого как полисульфобетаин; и т.д.

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

Биосовместимое покрытие может дополнительно содержать метящий агент, обычно агент, позволяющий визуализировать цвет с использованием стандартного оборудования для визуализации.

Комбинированное введение по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы вместе с по меньшей мере одним носителем, содержащим по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, сохраняет фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую), в основном терапевтическую, эффективность для представляющего интерес соединения(й) при сниженной токсичности или увеличивает фармацевтическую эффективность представляющего интерес соединения(й) при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта, обычно при введении субъекту, нуждающемуся в представляющем интерес соединении(ях), с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга, по сравнению с фармацевтической эффективностью и токсичностью, вызванной стандартной фармацевтической, обычно терапевтической, дозой(дозами) указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

В конкретном варианте осуществления комбинированное введение по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, позволяет уменьшить по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 15%, вводимую терапевтическую дозу соединения(й), обычно при введении субъекту, нуждающемуся по меньшей мере в одном представляющем интерес соединении, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга, по сравнению со стандартной терапевтической дозой(дозами) указанного соединения(й), как правило, в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя, при сохранении той же терапевтической эффективности при эквивалентной токсичности или сниженной токсичности (предпочтительно сниженной токсичности) соединения(й) для субъекта; или при увеличении терапевтической эффективности при эквивалентной или сниженной токсичности соединения(й) для субъекта.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере одну наночастицу вводят с несколькими носителями, обычно по меньшей мере с двумя носителями, причем каждый из указанных носителей содержит по меньшей мере одно представляющее интерес соединение. Представляющие интерес соединения, присутствующие в первом носителе, могут быть идентичными или отличаться от присутствующих во втором или в другом отдельном носителе.

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

Материал, из которого состоит наночастица (включая ее биосовместимое покрытие, если оно присутствует), имеет важное значение для определения биоперсистентности (т.е. способности сохранения в организме у субъекта) наночастицы. Наночастица может быть отнесена к биоразлагаемой (когда она состоит, например, из биоразлагаемого полимера, такого как PLGA или PLA) и/или растворимой (например, оксид железа), или небiorазлагаемой и нерастворимой. Биоразлагаемые и растворимые наночастицы быстрее выводятся из субъекта, чем небiorазлагаемые и/или нерастворимые наночастицы.

Представляющее интерес соединение.

Различные молекулы или агенты могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением в качестве по меньшей мере одного представляющего интерес соединения, как правило, в качестве по меньшей мере одного представляющего интерес фармацевтического соединения. Это соединение мо-

жет быть терапевтическим, профилактическим или диагностическим соединением, как описано ранее. Оно может представлять собой органическое соединение или неорганическое соединение.

Примеры соединения, используемого в качестве "представляющего интерес соединения", обычно выбирают из малой молекулы, цитотоксического соединения и координационного комплекса переходного металла.

В контексте настоящего изобретения малая молекула представляет собой низкомолекулярное (<900 Да) органическое соединение размером порядка  $10^9$  м. Большинство лекарств - это малые молекулы.

В конкретном варианте осуществления представляющее интерес соединение, используемое в контексте настоящего изобретения, представляет собой малую молекулу нацеленного действия. Малая молекула нацеленного действия обычно ингибирует ферментативные домены на мутированных, сверхэкспрессированных или других критических белках (потенциальные мишени в контексте лечения рака) в злокачественных клетках. Малые молекулы нацеленного действия включают те молекулы, которые нацелены на деление клеток (например, ингибитор аврора-киназы или ингибитор циклин-зависимой киназы) или другой биологический механизм, такой как белковый обмен или модификация хроматина (например, ингибитор гистон-деацетилазы). Примерами малых молекул нацеленного действия являются иматиниб, рапамицин, gefитиниб, эрлотиниб, сорафениб, сунитиниб, нилотиниб, дазатиниб, лапатиниб, бортезомиб, аторвастатин и т.д.

В другом конкретном варианте осуществления представляющее интерес соединение, используемое в контексте настоящего изобретения, представляет собой цитотоксическое соединение, например, химиотерапевтическое средство. Цитотоксическое соединение может быть, например, выбрано из модифицирующего ДНК агента, такого как антрациклин (например, доксорубицин, даунорубицин и т.д.); алкилирующего агента (например, мелфалана или темозоломида); и лекарственного средства, очень точно препятствующего определенным физиологическим механизмам, таким как полимеризация микротрубочек (например, таксол) или синтез метаболитов (например, метотрексат). В конкретном варианте осуществления цитотоксическое соединение является активируемым цитотоксическим соединением. Фотофрин является примером такого активируемого цитотоксического соединения, которое обычно используется в контексте фотодинамической терапии. Фотофрин активируется лазерным источником для получения его терапевтического эффекта.

В другом конкретном варианте осуществления представляющее интерес соединение, используемое в контексте настоящего изобретения, представляет собой координационный комплекс переходного металла. Координационные комплексы переходных металлов обладают потенциальными преимуществами по сравнению с более распространенными лекарственными средствами на основе органических веществ, включая широкий спектр координационных чисел и геометрий, доступные окислительно-восстановительные состояния, "регулируемость" термодинамики и кинетики замещения лиганда, а также широкое структурное разнообразие. Вещества на основе металлов взаимодействуют с молекулярными мишенями клеток, влияя на биохимические функции, что приводит в результате к разрушению злокачественных клеток. Координационные комплексы переходных металлов обычно представляют собой цитотоксические средства (например, координационные комплексы платины: цисплатин, карбоплатин, оксалоплатин, или координационные комплексы рутения или золота), действующие на структуры ДНК.

Носитель.

По меньшей мере одно представляющее интерес соединение инкапсулируется или импрегнируется в носитель или "прививается" (связывается) к такому носителю в соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники. Схематические представления носителей, содержащих по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, показаны на фиг. 1.

Носитель может представлять собой органический носитель. Органический носитель обычно выбирают из липидного носителя (например, глицеролипида, фосфолипида, стерина и т.д.); полимерного носителя; сополимерного носителя; углеродсодержащего носителя; и вирусоподобного носителя (например, вирусный вектор).

Полимер или сополимер, составляющие носитель, могут быть природного или синтетического происхождения.

Примеры синтетических (искусственных) и природных полимеров или сополимеров, используемых в контексте изобретения для получения носителя, могут быть выбраны из полимолочной кислоты (PLA), поли(лактид-со-гликолевой)кислоты (PLGA), поли(глутаминовой кислоты) (PGA), поли(капролактона) (PCL), поли(аминокислоты), полилактина, полилактида, сложных эфиров полиоксиэтилена и жирных кислот, полисорбата, поливинилового спирта, полиакриламида, полиметилметакрилата, полиалкилцианоакрилата, полилактат-со-гликолята, поли(амидоамина), поли(этиленмина), альгината, целлюлозы и целлюлозных производных полимеров, коллагена, гиалуроновой кислоты, актина, полисахарида и желатина.

Носитель может представлять собой неорганический носитель. Неорганический носитель обычно представляет собой наночастицу.

Наночастицу обычно выбирают из наночастицы металла, наночастицы оксида металла и их смеси.

Носитель может представлять собой сплошной носитель, такой как наносфера (сплошная наночастица), или полый носитель, такой как нанокапсула (полая наночастица).

Предпочтительные носители, например, выбирают из липосомы, мицеллы, полимерного (или "полимера") носителя, гидрогеля, дендримера, геля, сополимерного носителя, белкового носителя и неорганического носителя, как определено в данном описании.

Поверхность носителя по настоящему изобретению обычно и предпочтительно не содержит (или, другими словами, лишена или не демонстрирует) какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, т.е. какого-либо гидрофильного и/или гибкого полимера. Например, носитель по настоящему изобретению не содержит или не демонстрирует полимер, выбранный из декстрана, полисиаловой кислоты (PSA), гиалуроновой кислоты, хитозана, гепарина, поливинилпирролидона (PVP), поливинилового спирта (PVA), полиакриламида, поли(этиленгликоля) (PEG) и сополимера на основе PEG, такого как полуксамер, полуксамин или полисорбат. Предпочтительно, носитель по изобретению не содержит какого-либо гидрофильного полимера, который приносит на поверхность носителя слабо отрицательный или положительный поверхностный заряд, такого как поли(этиленгликоль) (PEG) или сополимер на основе PEG, поливинилового спирта (PVA) или поливинилпирролидон (PVP).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (ср. фиг. 2b) может быть успешно заменена на существующие носители (или системы доставки лекарственных средств), содержащие или демонстрирующие поверхностный стерически стабилизирующий агент (фиг. 2a), обычно такой как гидрофильный и гибкий полимер, более конкретно гидрофильный полимер, который приносит слабо отрицательный или положительный поверхностный заряд на поверхность носителя (например, полиэтиленгликолевый полимер), причем такая отрицательно или положительно заряженная поверхность считается нейтральной специалистом в данной области техники.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению сохраняет фармацевтическую (т.е. терапевтическую, профилактическую или диагностическую) эффективность представляющего интерес соединения при его сниженной токсичности у указанного субъекта или увеличивает его фармацевтическую эффективность при эквивалентной или сниженной токсичности по сравнению с фармацевтической эффективностью и токсичностью, вызванной указанным соединением при введении в стандартной фармацевтической дозе, как правило, в отсутствие какой-либо наночастицы и/или носителя.

Фармацевтическая композиция по изобретению обычно позволяет уменьшить по меньшей мере на 10% вводимую фармацевтическую дозу соединения по сравнению со стандартной фармацевтической дозой указанного соединения, как правило, в отсутствие какой-либо наночастицы и/или носителя, при сохранении той же фармацевтической эффективности при эквивалентной токсичности, предпочтительно при сниженной токсичности для субъекта, или при увеличении фармацевтической эффективности при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта.

Носитель позволяет высвобождать представляющее интерес соединение предпочтительно контролируемым образом. Носитель, как правило, может быть разработан таким образом, чтобы высвобождать представляющее интерес соединение(я) с заданной или регулируемой скоростью или в ответ на внешний стимул.

В конкретном варианте осуществления носитель позволяет высвобождать представляющее интерес соединение(я), как правило, с помощью контролируемого по времени высвобождения, путем диффузии представляющего интерес соединения из носителя, путем эрозии и/или разложения носителя.

В другом конкретном варианте осуществления носитель позволяет высвобождать представляющее интерес соединение(я) благодаря внутриклеточной или внеклеточной активации, т.е. в ответ на внутриклеточный или внеклеточный стимул, такой как изменение pH или действие фермента.

В другом конкретном варианте осуществления носитель позволяет высвобождать представляющее интерес соединение(я) в ответ на внешний стимул. Примерами внешнего стимула являются электромагнитные излучения (например, ионизирующее излучение, такое как рентгеновское излучение, гамма-излучение, или неионизирующее излучение, такое как УФ, видимый свет или инфракрасное излучение), ультразвуки и магнитное поле. Фармацевтическое соединение, например, высвобождается из носителя, когда указанный носитель подвергается воздействию внешнего стимула, выбранного из электромагнитных излучений, ультразвуков и магнитного поля.

Носителем, не содержащим какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, может быть, например, липосома с температурой фазового перехода мембраны, находящейся между 37 и 45°C, содержащая дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) 62 мол.%, гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC) 22 мол.% и холестерин (Chol) 16 мол.% или дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) 90 мол.% и монопальмитоилфосфатидилхолин (MPPC) 10 мол.%.

Носителем, не содержащим какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, может также быть, например, липосома, содержащая синтетический фосфолипид, такой как 1,3-диамидофосфолипид, чувствительный к напряжению сдвига.

Носителем, не содержащим какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, может также быть, например, липосома, содержащая пептид, который изменяет свою конформацию (альфа-спираль на бета-складчатый слой) при воздействии pH или температуры.



Носителем, не содержащим какого-либо поверхностного стерически стабилизирующего агента, может также быть, например, амфотерная липосома, содержащая 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) в молярном соотношении 3:1 и равное количество слабых катионных и слабых анионных амфифилов, и тех и других полученных из холестерина,  $\alpha$ -(3'-O-холестериноксикарбонил)- $\delta$ -(N-этилморфолин)сукцинамида (MoChol) и холестерилгемисукцината (CHEMS).

Фармацевтическая композиция по изобретению (определяемая комбинацией по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение) может быть применена во многих областях, в частности в медицине человека или ветеринарии. Данную композицию обычно применяют у животного, предпочтительно у млекопитающего, еще более предпочтительно у человека, независимо от его возраста или пола.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть применена для профилактики или лечения заболевания или расстройства, выбранного из сердечно-сосудистого заболевания, заболевания центральной нервной системы (ЦНС), заболевания желудочно-кишечного тракта, генетического расстройства, гематологического расстройства, гормонального расстройства, иммунного расстройства, инфекционного заболевания, нарушения обмена веществ, мышечно-скелетного расстройства, рака, респираторного заболевания и интоксикации и т.д. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для профилактики или лечения заболевания или расстройства, выбранного из сердечно-сосудистого заболевания, заболевания ЦНС, рака, инфекционного заболевания и нарушения обмена веществ.

В контексте настоящего изобретения по меньшей мере одну наночастицу и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение(я), целесообразно вводить субъекту, нуждающемуся в указанном представляющем интерес соединении(ях), с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга, обычно от более чем 5 мин до приблизительно 24 ч, предпочтительно от более чем 5 или 30 мин до приблизительно 12 ч, для оптимизации фармацевтической эффективности соединения(й).

В настоящем изобретении, когда по меньшей мере одну наночастицу и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение(я), целесообразно вводить субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч друг от друга, абсолютная величина поверхностного заряда по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы составляет по меньшей мере 10 мВ (|10 мВ|).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, когда по меньшей мере одну наночастицу и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение(я), целесообразно вводить субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 24 ч друг от друга, абсолютная величина поверхностного заряда по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы преимущественно составляет по меньшей мере 15 мВ (|15 мВ|).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, когда по меньшей мере одну наночастицу и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение, целесообразно вводить субъекту, нуждающемуся в указанном соединении, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 12 ч друг от друга, абсолютная величина поверхностного заряда по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы преимущественно составляет по меньшей мере 20 мВ (|20 мВ|).

Также в настоящем документе описан способ профилактики или лечения субъекта, предположительно предрасположенного к заболеванию, или страдающего от заболевания, такого как те, которые указаны в данном документе, где указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции по изобретению, как правило, по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, как описано в настоящем документе. Любая по меньшей мере одна наночастица или по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение(я), могут быть введены субъекту первыми, если только по меньшей мере одна биосовместимая наночастица и по меньшей мере один носитель, содержащий соединении(я), вводят раздельно, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч. Введение указанной по меньшей мере одной наночастицы или по меньшей мере одного носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), может представлять собой однократное введение каждого, многократные введения каждого, например, несколько последовательных введений каждого. Биосовместимая наночастица может быть введена один раз, и по меньшей мере один носитель, содержащий представляющее интерес соединение(я), может быть введен более одного раза и наоборот.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере одну биосовместимую наночастицу по меньшей мере вводят в начале протокола, включающего несколько введений по меньшей мере одного носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), т.е. по меньшей мере при первом введении указанного по меньшей мере одного носителя, и до или после его введения.

В другом конкретном варианте осуществления биосовместимую наночастицу не вводят в начале

протокола, включающего несколько введений по меньшей мере одного носителя, содержащего представляющее интерес соединение(я), и не вводят до второго или третьего введения указанного по меньшей мере одного носителя, и до или после его введения.

В контексте этих двух последних вариантов осуществления по меньшей мере одну биосовместимую наночастицу можно также вводить вместе (до или после, как описано ранее) по меньшей мере с одним носителем, содержащим представляющее интерес соединение(я), в процессе части или всех последующих введений указанного по меньшей мере одного носителя.

Биосовместимую наночастицу(ы) фармацевтической композиции по изобретению можно вводить любым путем, таким как внутривенный (IV), внутриартериальный, интраперитонеальный путь, интрадермальный путь, через верхние дыхательные пути (ингаляция), внутримышечный путь и/или пероральный путь (per os). Предпочтительным способом введения является внутривенный путь.

Носитель(и), содержащий представляющее интерес соединение(я) фармацевтической композиции по изобретению, можно вводить любым путем, выбранным из подкожного пути, внутривенного (IV) пути, интрадермального пути, внутриартериального пути, через верхние дыхательные пути (ингаляция), интраперитонеального пути, внутримышечного пути, перорального пути (per os) и нескольких различных путей среди ранее упомянутых.

Соответствующий путь(и) будет выбран практикующим врачом в зависимости от заболевания или расстройства, которое должно быть обнаружено, предотвращено или вылечено.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение без ограничения его объема.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическое представление носителей, не содержащих какого-либо стерически стабилизирующего агента, содержащих по меньшей мере одно представляющее интерес соединение. Носитель может представлять собой сплошной носитель (a, b) или полый носитель (c, d). Представляющее интерес соединение обычно захватывают или импрегнируют (a, c) или "прививают" (связывают) к носителю с помощью линкера или в отсутствие какого-либо линкера (b, d).

Фиг. 2. а) Схематическое представление носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение. Поверхность носителя модифицирована стерически стабилизирующим агентом.

б) схематическое представление фармацевтической композиции согласно изобретению, содержащей комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно представляющее интерес соединение, причем носитель не содержит какого-либо стерически стабилизирующего агента.

Фиг. 3 Химическая формула 1,5-дигексадецилового сложного эфира N-(3-карбоксит-1-оксипропил)-L-глутаминовой кислоты (SA-липид)

#### Примеры

Пример 1. Синтез № 1 липосом в качестве биосовместимых наночастиц.

Липосомы получают с использованием способа регидратации липидной пленки.

а) Липиды солюбилизируют в хлороформе. Хлороформ окончательно выпаривают под током азота. Регидратацию липидной пленки с использованием HEPES 20 mM и NaCl 140 mM при pH 7,4 выполняют при 50°C так, чтобы концентрация липидов составляла 5 mM.

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

б) Циклы замораживания-оттаивания затем выполняют 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню, регулирующую при 50°C.

с) Термоцилиндрический экструдер (экструдер LIPEX™, Northern Lipids) использовали для калибровки размера липосом при контролируемой температуре и давлении. Во всех случаях экструзию проводили при 50°C под давлением 10 бар.

Распределение по размерам свежеприготовленных липосом определяли с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) с HeNe-лазером 633 нм под углом 90°. Суспензию липосом разбавляли в 100 раз в HEPES 20 mM и NaCl 140 mM при pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) был равен приблизительно 170 нм (распределение по интенсивности) с индексом полидисперсности (PDI), равным приблизительно 0,1.

Как понятно специалисту в данной области техники, желаемый поверхностный заряд получали благодаря выбранной липидной композиции, и его величина подтверждается измерением дзета-потенциала с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument).

Липосомы разбавляли в 100 раз в воде и pH полученной суспензии доводили до pH 7,4. Поверхностный заряд липосом был равен приблизительно -14 мВ при pH 7,4.

Пример 2. Синтез № 2 липосом в качестве биосовместимых наночастиц.

Липосомы получают с использованием способа регидратации липидной пленки.

а) Липиды солюбилизируют в хлороформе. Хлороформ окончательно выпаривают под током азота.

Регидратацию липидной пленки с использованием HEPES 20 мМ и NaCl 140 мМ при pH 7,4 выполняют при 65°C так, чтобы концентрация липидов составляла 25 мМ.

Для получения липосом использовали следующую липидную композицию: DSPC (дистеароилфосфатидилхолин):DSPG (дистеароилфосфатидилглицерин):Chol (холестерин) в молярном соотношении 7:2:1.

б) Циклы замораживания-оттаивания затем выполняют 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню, регулирующую при 65°C.

с) Термоцилиндрический экструдер (экструдер LIPEX™, Northern Lipids) использовали для калибровки размера липосом при контролируемой температуре и давлении. Сначала, 5 проходов выполняли через мембрану из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,45 мкм при 5 бар, затем 10 проходов через мембрану из PES с размером пор 0,22 мкм при 10 бар и, наконец, 10 проходов через мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,1 мкм при 15 бар.

Распределение по размерам свежеприготовленных липосом определяли с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) с HeNe-лазером 633 нм под углом 90°. Суспензию липосом разбавляли в 100 раз в HEPES 20 мМ и NaCl 140 мМ при pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) был равен приблизительно 145 нм (распределение по интенсивности) с индексом полидисперсности (PDI), равным приблизительно 0,1.

Желаемый поверхностный заряд, который обычно ниже 10 мВ, получали благодаря выбранной липидной композиции, и его величина подтверждается измерением дзета-потенциала с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument).

Пример 3. Способ, позволяющий повысить эффективность и/или снизить токсичность после введения субъекту представляющего интерес соединения, включенного в фармацевтическую композицию согласно изобретению, по сравнению с той же дозой представляющего интерес соединения в монотерапии.

Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая комбинацию (i) по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и (ii) по меньшей мере одного носителя, содержащего доксорубин, вводят "голым" мышам, несущим ксенотрансплантированную опухоль MDA-MB-231-lucD3H2LN, следующим образом:

а) введение первой группе "голых" мышей (путем внутривенной инъекции) Dox-NP® (пэгелированная липосомальная композиция доксорубина);

введение второй группе "голых" мышей (путем внутривенной инъекции) доксорубина;

введение третьей группе "голых" мышей (путем внутривенной инъекции) биосовместимых наночастиц;

введение четвертой группе "голых" мышей (путем внутривенной инъекции) биосовместимых наночастиц и, с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 72 ч после введения биосовместимых наночастиц четвертой группе голых мышей, введение (путем внутривенной инъекции) указанной четвертой группе "голых" мышей носителя, содержащего доксорубин, где носитель не содержит какого-либо стерически стабилизирующего агента;

б) оценка любого клинического признака токсичности у "голых" мышей после введения Dox-NP® (первая группа), доксорубина (вторая группа), биосовместимых наночастиц (третья группа) и фармацевтической композиции (четвертая группа);

с) измерение задержки повторного роста опухоли после введения Dox-NP® (первая группа), доксорубина (вторая группа), биосовместимых наночастиц (третья группа) и фармацевтической композиции (четвертая группа).

Пример 4. Синтез № 3 липосом в качестве биосовместимых наночастиц.

Липосомы получают с использованием способа регидратации липидной пленки.

а) Липиды солибилизируют в хлороформе. Хлороформ окончательно выпаривают под током азота с образованием липидной пленки на стенках трубки Рутха. Регидратацию липидной пленки с использованием HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4 выполняют при 60°C так, чтобы концентрация липидов составляла 50 мМ.

Для получения заряженных липосом использовали следующую липидную композицию: DPPC (дипальмитоилфосфатидилхолин): 58 мол.%; HSPC (гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин): 21 мол.%; Chol (холестерин): 16 мол.%; POPS (1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилсерин): 5 мол.%.

б) Циклы замораживания-оттаивания затем выполняют 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню, регулирующую при 60°C. Ультразвуковую обработку раствора липосом выполняют в течение 30 с каждые 3 цикла замораживания-оттаивания и непосредственно перед экструзией.

с) Термоцилиндрический экструдер (экструдер LIPEX™, Northern Lipids) используют для калибровки размера липосом при контролируемой температуре и давлении. Экструзию проводят при 60°C. Применяют десять проходов через мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,1 мкм под давлением 10 бар.

Распределение по размерам свежеприготовленных липосом определяют с помощью динамического

рассеяния света (DLS) с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) с HeNe-лазером 633 нм под углом 173°. Раствор липосом разбавляют в 200 раз в HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) равен приблизительно 170 нм (распределение по интенсивности) с индексом полидисперсности (PDI), равным приблизительно 0,2.

Как понятно специалисту в данной области техники, желаемый поверхностный заряд получают благодаря выбранной липидной композиции, и его величина подтверждается измерением дзета-потенциала с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument). Раствор липосом разбавляют в 200 раз в растворе хлорида натрия с концентрацией 1 мМ и pH раствора доводят до pH 7. Поверхностный заряд липосом равен приблизительно -40 мВ при pH 7, NaCl 1 мМ.

Конечную липидную концентрацию в растворе липосом измеряют колориметрическим анализом (способ Бартлетта). Способ основан на определении общего количества фосфора посредством кислотного сбраживания фосфолипида. Высвобождающийся неорганический фосфат подвергают взаимодействию с молибдатом аммония, причем комплекс дает темно-синий цвет. Концентрация липидов равна приблизительно 50 мМ.

Пример 5. Синтез № 4 липосом в качестве биосовместимых наночастиц.

Липосомы получают с использованием способа регидратации липидной пленки.

а) Липиды сольбилизируют в хлороформе. Хлороформ окончательно выпаривают под током азота с образованием липидной пленки на стенках трубки Ругех. Регидратацию липидной пленки с использованием HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4 выполняют при 60°C так, чтобы концентрация липидов составляла 50 мМ.

Для получения заряженных липосом использовали следующую липидную композицию: DPPC (дипальмитоилфосфатидилхолин): 45,15 мол.%; Chol (холестерин): 45,15 мол.%; DSPE-PEG (дистеарилфосфатидилэтаноламин[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]): 0,60 мол.%; 1,5-дигексадециловый сложный эфир N-(3-карбоксо-1-оксопропил)-L-глутаминовой кислоты (SA-липид): 9,10 мол.% SA-липид приносит группы COOH на поверхность липосом.

б) Циклы замораживания-оттаивания затем выполняют 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню, регулируемую при 60°C.

в) Термоцилиндрический экструдер (экструдер LIPEX™, Northern Lipids) используют для калибровки размера липосом при контролируемой температуре и давлении. Экструзию проводят при 60°C. Применяют семь проходов через мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,45 мкм под давлением 3 бара и десять проходов через мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,22 мкм под давлением 10 бар. Распределение по размерам свежеприготовленных липосом определяют с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) с HeNe-лазером 633 нм под углом 173°. Раствор липосом разбавляют в 200 раз в HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) равен приблизительно 230 нм (распределение по интенсивности) с индексом полидисперсности (PDI), равным приблизительно 0,2.

Как понятно специалисту в данной области техники, желаемый поверхностный заряд получают благодаря выбранной липидной композиции, и его величина подтверждается измерением дзета-потенциала с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument). Раствор липосом разбавляют в 200 раз в растворе хлорида натрия с концентрацией 1 мМ, и pH раствора доводят до pH 7. Поверхностный заряд липосом равен приблизительно -60 мВ при pH 7, NaCl 1 мМ.

Конечную липидную концентрацию в растворе липосом измеряют колориметрическим анализом (способ Бартлетта). Способ основан на определении общего количества фосфора посредством кислотного сбраживания фосфолипида. Высвобождающийся неорганический фосфат подвергают взаимодействию с молибдатом аммония, причем комплекс дает темно-синий цвет. Концентрация липидов равна приблизительно 50 мМ.

Пример 6. Синтез № 5 липосом в качестве биосовместимых наночастиц

Липосомы получают с использованием способа регидратации липидной пленки.

а) Липиды сольбилизируют в хлороформе. Хлороформ окончательно выпаривают под током азота с образованием липидной пленки на стенках трубки Ругех. Регидратацию липидной пленки с использованием HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4 выполняют при 60°C, и концентрация липидов составляет 50 мМ. Для получения заряженных липосом использовали следующую липидную композицию: DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин): 60 мол.%, Chol (холестерин): 35 мол.% и сукцинил PE (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-сукцинил): 5 мол.%.

б) Циклы замораживания-оттаивания затем выполняют 6 раз, последовательно погружая образец в жидкий азот и в водяную баню, регулируемую при 60°C. Ультразвуковую обработку раствора липосом выполняют в течение 30 с каждые 3 цикла замораживания-оттаивания и перед экструзией.

в) Термоцилиндрический экструдер (экструдер LIPEX™, Northern Lipids) используют для калибровки размера липосом при контролируемой температуре и давлении. Экструзию проводят при 60°C. Применяют 12 проходов через мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с размером пор 0,22 мкм под

давлением 12 бар.

d) Конъюгация п-аминофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозида (MAN) с липосомой сукцинила PE: поверхность липосомы сукцинила PE, модифицируют с помощью производного маннозы, лиганда п-аминофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозида (MAN), используя сочетание с карбодиимидом, с образованием конъюгированной с маннозой липосомы. MAN ковалентно связан своей аминогруппой с карбоксильной группой сукцинила PE, присутствующей на поверхности предварительно образованной липосомы сукцинила PE. Вкратце, к предварительно образованному раствору липосомы сукцинила PE добавляют EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимидгидрохлорид), (молярное соотношение сукцинила PE/EDC 1:10) и N-гидроксисукцинимид (NHS) (молярное соотношение NHS/EDC 1:2,5). Затем pH суспензии доводят до 6 с помощью 1 M NaOH и полученную суспензию перемешивают в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем pH раствора доводят до 7 с помощью 1 M NaOH и добавляют водный раствор MAN (молярное соотношение сукцинила PE/MAN 1:2) к раствору. pH доводят до 7 с помощью 1 M NaOH, и суспензию перемешивают в течение 2 дополнительных часов при комнатной температуре. Избыточные несвязанные молекулы MAN, EDC и NHS удаляют тремя стадиями диализа с коэффициентом разбавления ( $\times 500$ ,  $\times 500$ ,  $\times 500$ ), используя целлюлозную мембрану 50 кДа.

Следует отметить, что из-за возможного разбавления при диализе раствор липосом может быть сконцентрирован центрифугированием (как правило, центрифугой Sigma 3-15K при 5°C, 1200 об/мин) с использованием мембранной ультрафильтрации на концентраторах Vivaspin с мембраной из полиэтиленсульфона (PES) и отсечением 300 кДа.

Распределение по размерам свежеприготовленных липосом определяют с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) с HeNe-лазером 633 нм под углом 173°. Раствор липосом разбавляют в 200 раз в HEPES 25 мМ и NaCl 150 мМ при pH 7,4. Размер липосом (т.е. гидродинамический диаметр) равен приблизительно 230 нм (распределение по интенсивности) с индексом полидисперсности (PDI) приблизительно 0,2. Как понятно специалисту в данной области техники, желаемый поверхностный заряд получают благодаря выбранной липидной композиции, и его величина подтверждается измерением дзета-потенциала с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument). Раствор липосом разбавляют в 200 раз в растворе хлорида натрия с концентрацией 1 мМ и при pH 7. Поверхностный заряд липосом равен приблизительно -70 мВ при NaCl 1 мМ, pH 7. Конечную липидную концентрацию в растворе липосом измеряют колориметрическим анализом (способ Бартлетта). Способ основан на определении общего количества фосфора посредством кислотного сбраживания фосфолипида. Высвобождающийся неорганический фосфат подвергают взаимодействию с молибдатом аммония, причем комплекс дает темно-синий цвет. Концентрация липидов равна приблизительно 50 мМ.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий стадию введения по меньшей мере одного носителя, содержащего по меньшей мере одно фармацевтическое соединение, субъекту, нуждающемуся в указанном по меньшей мере одном фармацевтическом соединении, и отдельную стадию введения по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы указанному субъекту, где фармацевтическое соединение представляет собой химиотерапевтическое средство, где по меньшей мере один носитель представляет собой наночастицу на основе липидов и поверхность носителя не содержит полимер, выбранный из декстрана, полисиаловой кислоты (PSA), гиалуроновой кислоты, хитозана, гепарина, поливинилпирролидона (PVP), поливинилового спирта (PVA), полиакриламида, поли(этиленгликоля) (PEG) и сополимера на основе PEG; где наибольший размер по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы составляет от приблизительно 4 до приблизительно 500 нм, как измерено с помощью динамического рассеяния света (DLS), величина поверхностного заряда по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы представляет собой значение отрицательного поверхностного заряда ниже -10 мВ, причем по меньшей мере одну биосовместимую наночастицу не применяют как таковую в качестве фармацевтического соединения и указанную по меньшей мере одну биосовместимую наночастицу, представляющую собой наночастицу на основе липидов, вводят субъекту с интервалом от более чем 5 мин до приблизительно 24 ч по меньшей мере до одного носителя, содержащего по меньшей мере одно фармацевтическое соединение.

2. Способ по п.1, где наночастица дополнительно покрыта биосовместимым покрытием.

3. Способ по п.1, где носитель представляет собой сплошной носитель.

4. Способ по п.1, где носитель представляет собой полый носитель.

5. Способ по п.1, где носитель представляет собой липосому и поверхность носителя не содержит какого-либо полиэтиленгликолевого (PEG) полимера.

6. Способ по п.1 или 5, где носитель представляет собой липосому и липосома содержит 62 мол.% дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), 22 мол.% гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина (HSPC) и 16 мол.% холестерина (Chol); 90 мол.% дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и 10 мол.% монопальмитоилфосфатидилхолина (MPPC) или 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) в молярном соотношении 3:1 и равное

количество  $\alpha$ -(3'-О-холестериноксикарбонил)- $\delta$ -(N-этилморфолин)сукцинамида (MoChol) и холестерил-гемисукцината (CHEMS).

7. Способ по п.1, где введение по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего фармацевтическое соединение(я), увеличивает терапевтическую эффективность указанного фармацевтического соединения(й) при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта по сравнению с терапевтической эффективностью и токсичностью, вызванной стандартной терапевтической дозой(ами) указанного соединения(й) в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

8. Способ по п.1, где введение по меньшей мере одной биосовместимой наночастицы и по меньшей мере одного носителя, содержащего фармацевтическое соединение(я), позволяет уменьшить по меньшей мере на 10% вводимую терапевтическую дозу(ы) фармацевтического соединения(й) или при увеличении терапевтической эффективности при эквивалентной или сниженной токсичности для субъекта по сравнению со стандартной терапевтической дозой(дозами) указанного соединения(й) в отсутствие какой-либо биосовместимой наночастицы и/или носителя.

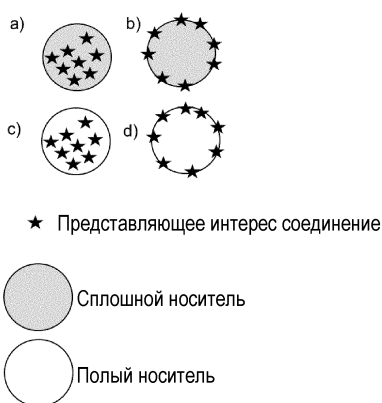
9. Способ по п.1, где наночастица выводится из субъекта, которому она была введена, в течение от 1 ч и до 6 недель после его введения субъекту, нуждающемуся по меньшей мере в одном фармацевтическом соединении, указанном в п.1.

10. Способ по п.1, где фармацевтическое соединение инкапсулировано в носитель, импрегнировано в носитель или связано с носителем.

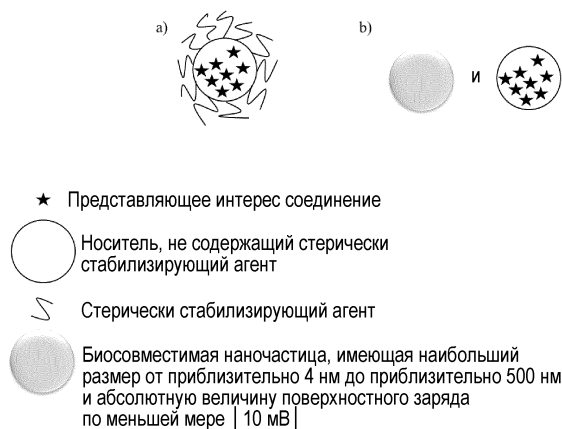
11. Способ по п.1, где фармацевтическое соединение высвобождается из носителя путем контролируемой по времени диффузии, эрозии и/или разложения носителя.

12. Способ по п.1, где фармацевтическое соединение высвобождается из носителя в ответ на внутриклеточный или внеклеточный стимул.

13. Способ по п.1, где фармацевтическое соединение высвобождается из носителя, когда указанный носитель подвергается воздействию электромагнитных излучений, ультразвуков и магнитного поля.

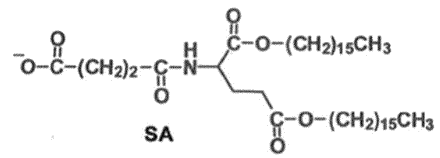


Фиг. 1



Фиг. 2

047692



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---