



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116380** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 33/00**  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 31/7052** (2006.01)  
**A61K 38/00**  
**A61P 41/00**МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

|                                                                                                      |                                          |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(21)</b> Номер заявки:                                                                            | <b>а 2015 13039</b>                      | <b>(72)</b> Винахідник(и):                                      | <b>Поттьє Аньєс (FR),<br/>Леві Лоран (FR),<br/>Мейєр Марі-Едіт (FR),<br/>Дармон Одрі (FR),<br/>Жермен Маттьє (FR)</b>                                                                                                                            |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки:                                                                     | <b>30.05.2014</b>                        | <b>(73)</b> Власник(и):                                         | <b>НАНОБІОТІКС,<br/>60 rue de Wattignies, F-75012 Paris, France<br/>(FR)</b>                                                                                                                                                                     |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними<br>права на винахід:                                              | <b>12.03.2018</b>                        | <b>(74)</b> Представник:                                        | <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.<br/>№115</b>                                                                                                                                                                                               |
| <b>(31)</b> Номер попередньої<br>заявки відповідно до<br>Паризької конвенції:                        | <b>13305712.5,<br/>61/828,794</b>        | <b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги<br>експертизою: | <b>WO 2012/104275 A2, 09.08.2012<br/>WO 2005/063305 A1, 14.07.2005<br/>WO 2007/116954 A2, 18.10.2007<br/>WO 2009/081287 A2, 02.07.2009<br/>WO 2011/151631 A1, 08.12.2011<br/>WO 2010/048623 A1, 29.04.2010<br/>WO 2009/142754 A1, 26.11.2009</b> |
| <b>(32)</b> Дата подання<br>попередньої заявки<br>відповідно до<br>Паризької конвенції:              | <b>30.05.2013,<br/>30.05.2013</b>        |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>(33)</b> Код держави-учасниці<br>Паризької конвенції,<br>до якої подано<br>попередню заявку:      | <b>EP,<br/>US</b>                        |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>(41)</b> Публікація відомостей<br>про заявку:                                                     | <b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>               |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей<br>про видачу патенту:                                             | <b>12.03.2018, Бюл.№ 5</b>               |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>(86)</b> Номер та дата<br>подання міжнародної<br>заявки, поданої<br>відповідно до<br>Договору РСТ | <b>PCT/EP2014/061296,<br/>30.05.2014</b> |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |

**(54) ПОСИЛЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ АБО ПРОФІЛАКТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ СПОЛУКИ****(57) Реферат:**

Винахід стосується способу посилення терапевтичної або профілактичної ефективності фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, у суб'єкта, який потребує цього, причому спосіб включає стадію введення суб'єкту послідовно (i) біосумісної наночастинки, що має найбільший розмір від 4 нм до 500 нм і абсолютне значення поверхневого заряду дорівнює або вище 10 мВ (10 мВ) і (ii) фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, і де вказану наночастинку потрібно вводити суб'єкту від більше 5 хвилин до 72 годин до або після фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, де наночастинка є органічною наночастинкою, вибраною з наночастинки на ліпідній основі, наночастинки на основі білка, наночастинки на основі полімеру, наночастинки на основі співполімеру, наночастинки на основі вуглецю і наночастинки, подібній вірусу.

UA 116380 C2



## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить комбінацію біосумісної частинки і (ii) сполуки, яка представляє інтерес, для введення суб'єкту, який потребує такої сполуки, де наночастинка посилює ефективність даної сполуки. Найбільший розмір біосумісної наночастинки звичайно становить приблизно від 4 до приблизно 500 нм, і абсолютне значення її поверхневого заряду становить щонайменше 10 мВ (10 мВ).

Винахід також стосується такої композиції для застосування з метою введення сполуки, яка представляє інтерес, суб'єкту, який потребує цього, де наночастинку і сполуку, яка представляє інтерес, потрібно вводити вказаному суб'єкту одну за одною звичайно із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год.

Спільне і типовіше послідовне введення суб'єкту біосумісної наночастинки і сполуки, яка представляє інтерес, зберігає фармацевтичну (тобто терапевтичну, профілактичну або діагностичну) користь вказаної сполуки, яка представляє інтерес, при зниженій її токсичності для вказаного суб'єкта або підвищує її корисний фармацевтичний вплив при еквівалентній або зниженій токсичності у порівнянні із корисним фармацевтичним впливом і токсичністю, яка індукується вказаною сполукою, при введенні стандартної фармацевтичної дози.

Фармацевтична композиція за винаходом, як правило, дозволяє знизити фармацевтичну дозу сполуки, яка вводиться, щонайменше на 10 % у порівнянні із стандартною фармацевтичною дозою вказаної сполуки при зберіганні того ж корисного фармацевтичного впливу і еквівалентної токсичності, переважно зниженої токсичності, для суб'єкта або підвищити корисний фармацевтичний вплив при еквівалентній або зниженій токсичності для суб'єкта.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

З метою забезпечення безпеки і ефективності терапевтичні сполуки необхідно селективно доставляти при оптимальній швидкості до місця призначення в організмі суб'єкта, який цього потребує.

Фармакокінетика (рК) є галуззю фармакології, присвяченою визначенню метаболічного шляху речовин, які вводяться ззовні у живий організм. Це визначення включає стадії визначення концентрацій сполуки у всіх важливих тканинах протягом досить тривалого періоду часу, переважно до виведення сполуки. Фармакокінетика необхідна для ефективного опису *in vivo* поведінки сполуки, у тому числі механізмів його абсорбції і поширення, а також хімічних змін в організмі. Можна скласти рК-профіль в крові, застосовуючи різні програми для отримання ключових рК-параметрів, які кількісно описують, як організм справляється із сполукою. Важливі параметри включають максимальну концентрацію ( $C_{max}$ ), період напіврозпаду ( $t_{1/2}$ ), кліренс, площа під кривою (AUC) і середній час перебування (MRT), тобто середній час, протягом якого сполука залишається в організмі. Якщо спостерігається пролонгована циркуляція препарату сполуки у крові, то це звичайно зв'язане із збільшеним  $t_{1/2}$ , зниженим кліренсом, підвищеною AUC і збільшеним MRT. рК-дані часто використовують для визначення оптимальної дози і режиму дозування з метою підтримки необхідної концентрації у крові для підвищення терапевтичної ефективності при мінімальних побічних ефектах. Крім того, фахівцям також відомо, що в більшості випадків концентрація сполуки у крові корелює із її ефективністю і токсичністю, звичайно для вільних лікарських засобів.

Фізико-хімічні властивості терапевтичних, а також профілактичних сполук здійснюють важливий вплив на їх фармакокінетику і метаболічний шлях в організмі. Таким чином, вибір придатних фізико-хімічних властивостей є ключовим при розробці такої сполуки. Однак оскільки сполука не завжди ендogenous забезпечується самим організмом і звичайно вводиться ззовні, її профіль біорозподілу оптимізують для відповідності і переважно для оптимізації її необхідної фармакологічної дії.

Розглядають декілька підходів оптимізації доставки сполуки до місця її призначення. Стратегія полягає в розробці терапевтичної сполуки із стелс-властивостями для пролонгації періоду напіврозпаду у крові і, отже, підвищення її акумуляції по місцю призначення. Одним сприятливим підходом є ковалентне приєднання поліетиленгліколю (PEG) до терапевтичної сполуки, що забезпечує збільшення *in vivo* періоду напіврозпаду ( $t_{1/2}$ ) циркулюючої сполуки, при варіації підвищення рівня *in vivo* періоду напіврозпаду частково залежно від природи сполуки і від природи покриття. Також розроблені носії ліків, такі як ліпосоми, емульсії або міцели, для підвищення терапевтичної ефективності лікарських засобів за допомогою модифікації їх профілю біорозподілу в організмі суб'єкта.

Однак все ще залишається проблема недостатньої селективності біорозподілу терапевтичних сполук. До цього часу погана фармакокінетика і висока токсичність є важливими причинами невдач при розробці терапевтичних сполук.

Як приклад, у разі лікування раку навмисне інгібування життєво важливих функцій організму з метою знищення ракових клітин викликає цілеспрямовану або направлену на механізм токсичності в нормальних клітинах, і клініцисти покладаються на відмінності в реакції на дозу і розподілі терапевтичних сполук для пухлин і нормальних тканин, щоб знайти можливе терапевтичне вікно. Помітимо, гепатотоксичність залишається головною причиною скасування фармацевтичної розробки і клінічного застосування лікарського засобу внаслідок прямих і непрямих механізмів ураження клітин печінки, викликаного лікарським засобом.

Підхід, який пропонується для нанопорошкових сполук, таких як носії лікарських засобів [Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 11(1):31-59, 1994], представляє попереднє введення приманочного носія для зниження, насичення або навіть інактивації фагоцитуючої здатності ретикулоендотеліальної системи (RES). Погіршення або блокада також можуть бути пов'язані із зниженням рівнів опсонічних молекул у плазмі. Показано, що внутрішньовенне введення деяких агентів, таких як алкілові ефіри жирних кислот, сульфат декстрану, солі рідкоземельних елементів (наприклад,  $GdCl_3$ ), носії лікарських засобів, пустий або інкапсулюючий клодронат, до введення тестових частинок спричиняє зниження (від помірного до різкого) захоплення клітинами Купфера.

Наприклад, у роботі "Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors" [PNAS 2007] автори повідомляють роль RES у кліренсі наночастинок "CREKA-SPIO". У початкових експериментах показано, що наночастинок "CREKA-SPIO", які вводяться внутрішньовенно (IV), неефективно акумулюються в MDA-MB-435 ксенотрансплантатах раку молочної залози. На противагу цьому, спостерігають високу концентрацію частинок в RES тканинах. При виснаженні RES макрофагів у печінці ліпосомальним клодронатом автори виявили 5-кратну пролонгацію періоду напіврозпаду частинок. Однак агент клодронат викликає апоптоз макрофагів печінки і селезінки, і його вважають глобально шкідливим, оскільки виснаження макрофагів підвищує ризики, зв'язані із імуносупресією і інфікуванням. У другому експерименті автори тестують ліпосоми, покриті хелатованим  $Ni(II)$ , як потенційні приманочні частинки, передбачаючи, що оксид заліза і  $Ni(II)$  залучає подібні опсоніни плазми, і що  $Ni$ -ліпосоми можуть, таким чином, виснажувати їх у великому колі кровообігу. Дійсно,  $Ni$ -ліпосоми, які вводяться внутрішньовенно (IV), введені за 5 хв. або 48 год. до ін'єкції наночастинок CREKA-SPIO, допускають п'ятикратне збільшення періоду напіврозпаду наночастинок у крові. Однак спостерігають високу токсичність, яка викликає смерть мишей із пухлинами. Також тестують прості ліпосоми замість  $Ni$ -ліпосом. Однак знижуючи токсичність у порівнянні із вказаними  $Ni$ -ліпосомами, прості ліпосоми є набагато менш ефективними. Дійсно, коефіцієнт збільшення періоду напіврозпаду у крові становить тільки близько 2.

WO2005086639 стосується способів введення необхідного агента селективно по місцю призначення в організмі суб'єкта, звичайно у зв'язку із ультразвуковим або рентгенівським опроміненням або у зв'язку із отриманням зображень магніторезонансним методом (MRI), а також у зв'язку із терапією. Метою описуваного способу є підвищення або збереження ефективності агента, який представляє інтерес, при зниженні загальної дози агентів, які конкретно вводяться, завдяки супутньому введенню приманочного неактивного носія.

У описуваному винаході використовують підхід, оснований на ймовірності. Нецільовий неактивний агент ("неактивний носій") вводять спільно (тобто "по суті, одночасно") із цільовим агентом, який представляє інтерес (який присутній у "активній композиції") і який демонструє аналогічні фізичні властивості, з метою сприяння обходу RES-системи цільовим агентом, який представляє інтерес, дозволяючи тим самим поліпшувати захоплення агента, який представляє інтерес, на потрібному місці. Результатом цього підходу є менший вплив агента, який представляє інтерес, на пацієнтів і, як наслідок, менша ціна дози вказаного агента, який представляє інтерес. Активну композицію і приманочний неактивний носій вводять один за одним протягом 5 хв., переважно один за одним протягом 2 хв. або навіть менше. Цей підхід оснований на присутності великого надлишку нецільового "носія" або "приманочних" розчинників і на ймовірності, що цей приманочний носій у надлишку буде конкурувати із цільовим агентом, який представляє інтерес, по поглинанню ретикулоендотеліальною системою, коли постачається в присутності розчинників, які націлені на потрібне місце. Період напіврозпаду частинок, захоплених RES, залежить від дози, тобто період напіврозпаду циркулюючих частинок збільшується при підвищенні дози. Вважають, що повільніший кліренс, зв'язаний із вищими дозами, сприяє підтримці високої загальної концентрації агентів, дозволяючи зменшувати дозу агента, який представляє інтерес, який треба ввести. Іншими словами, згідно із авторами WO2005086639, збільшений період напіврозпаду всіх агентів внаслідок вищої їх загальної дози повинен бути корисний для цільових агентів. Вимога,

включена при цьому підході, полягає в тому, що активний агент і неактивний агент поведуться однаково відносно характеристик кліренсу в RES, якими б не були їх відповідні композиції.

При цьому підході потрібна квазі-супутня ін'єкція неактивного агента і активного агента для збільшення загальної кількості агентів, присутніх у крові, і, отже, для пролонгування їх періоду напіврозпаду у крові. Така стратегія, яка чітко основана на ймовірному підході, неодмінно вимагає асоціації активного агента із цілевказуючим агентом для досягнення успішної його акумуляції на місці призначення, надаючи вказаному активному агенту перевагу над неактивним агентом. Крім того, через квазі-супутню ін'єкцію може бути потрібна специфічна конструкція неактивного носія залежно від передбачуваного застосування активної композиції.

Як очевидно із попереднього рівня техніки, і, незважаючи на тривалу медичну потребу, покращення сполук (у тому числі терапевтичних, профілактичних, а також діагностичних сполук), які не можна ефективно застосовувати на пацієнтах через їх неприйнятну токсичність або їх несприятливі фармакокінетичні параметри, залишається проблемою.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Даний винахід тепер дозволяє оптимізувати ефективність сполуки, яка представляє інтерес (тут також позначеної просто як "сполука"), при будь-якому її передбачуваному застосуванні у зв'язку із терапією, профілактикою або діагностикою. Описана тут композиція, яка являє собою комбінацію біосумісної частинки і (ii) щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, оптимізує фармакокінетичні параметри щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, і, як наслідок, тепер робить можливою розробку терапевтичних сполук, які інакше не могли б бути розроблені, наприклад, через їх неприйнятну токсичність.

Типова композиція за винаходом (тут звичайно позначена як "фармацевтична композиція") являє собою композицію, яка містить комбінацію біосумісної частинки і (ii) щонайменше однієї сполуки ("сполуки, яка представляє інтерес"), де найбільший розмір біосумісної наночастинки звичайно становить приблизно від 4 нм до приблизно 500 нм, і абсолютне значення поверхневого заряду біосумісної наночастинки становить щонайменше 10 мВ.

Переважаючим предметом винаходу є фармацевтична композиція, яка містить комбінацію біосумісної частинки і фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, де найбільший розмір біосумісної наночастинки становить приблизно від 4 нм до приблизно 500 нм, і абсолютне значення поверхневого заряду біосумісної наночастинки становить щонайменше 10 мВ (|10 мВ|), для застосування з метою введення фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, суб'єкту, який потребує цього, де наночастинку і сполуку, яка представляє інтерес, потрібно вводити суб'єкту, який потребує вказану сполуку, яка представляє інтерес, одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год.

Спільне введення суб'єкту біосумісної наночастинки і сполуки, яка представляє інтерес, за допомогою композиції за винаходом звичайно дозволяє (зберігає) таку ж фармацевтичну (тобто терапевтичну, профілактичну або діагностичну) користь сполуки при зменшеній її токсичності для суб'єкта, або підвищену фармацевтичну користь сполуки при еквівалентній або зменшеній її токсичності для суб'єкта (переважно при зниженій токсичності) у порівнянні із фармацевтичною користю і токсичністю, яка індукується стандартною фармацевтичною дозою вказаної сполуки.

Фармацевтична композиція за винаходом звичайно допускає щонайменше 10 %, переважно щонайменше 15 % зниження фармацевтичної (тобто терапевтичної, профілактичної або діагностичної) дози сполуки, яка вводиться, у порівнянні із стандартною фармацевтичною дозою вказаної сполуки (i) при збереженні такої ж фармацевтичної користі і еквівалентної токсичності, переважно зниженої токсичності для суб'єкта, або (ii) при підвищенні фармацевтичної користі і еквівалентної або зниженої токсичності для суб'єкта.

Оскільки форма частинки може впливати на її "біосумісність", тут переважні частинки, які мають цілком однотипну форму. Таким чином, по фармакокінетичних причинах переважними є наночастинки, по суті, сферичної, шароподібної або яйцеподібної форми. Така форма також сприяє взаємодії наночастинок із клітинами або поглинанню клітинами. Сферична або шароподібна форма є особливо переважною.

У дусі винаходу термін "наночастинка" стосується продукту, зокрема синтетичного продукту, із розміром частинок у нанометровому діапазоні, звичайно приблизно від 1 нм до приблизно 500 нм, переважно приблизно від 4 нм до приблизно 500 нм, приблизно від 4 до приблизно 400 нм, приблизно від 30 нм до приблизно 300 нм, приблизно від 20 нм до приблизно 300 нм, приблизно від 10 нм до приблизно 300 нм, наприклад, приблизно від 4 нм до приблизно 100 нм, наприклад, приблизно від 10 нм, 15 нм або 20 нм до приблизно 100 нм, або приблизно від 100 нм до приблизно 500 нм, звичайно приблизно від 100 нм до приблизно 300 нм.

Вираз "розмір наночастинки", "найбільший розмір наночастинки" і "самий довгий розмір наночастинки" тут звичайно стосується "самого довгого або найбільшого вимірювання

наночастинки" або "діаметра наночастинки" сфероїдної або яйцеподібної форми. Для визначення розміру наночастинок можна застосовувати трансмісійну електронну мікроскопію (TEM) або кріо-TEM. А також можна застосовувати метод динамічного розсіювання світла (DLS) для визначення гідродинамічного діаметра наночастинок в розчині. Ці два методи можна також

застосовувати один за одним для порівняння вимірювань розмірів і підтвердження вказаного розміру. Переважним є метод DLS (посилання: International Standard ISO22412 Particle Size Analysis-Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008).

Для застосовності в контексті винаходу абсолютний електростатичний поверхневий заряд (тут також позначений як "заряд" або "поверхневий заряд") біосумісної наночастинки повинен

бути вищим  $|10 \text{ мВ}|$  (абсолютне значення). Поверхневий заряд наночастинки звичайно визначають за допомогою вимірювань зета-потенціалу у водному середовищі для концентрації наночастинок від 0,2 до 10 г/л, рН від 6 до 8 і звичайно для концентрацій електролітів у водному середовищі від 0,001 до 0,2М, наприклад, від 0,01М до 0,15М.

Звичайно біосумісна наночастинка, за даним винаходом, має електронний поверхневий

заряд щонайменше  $|10 \text{ мВ}|$ , тобто нижче -10 мВ або вище +10 мВ, наприклад, нижче за величину від (-12 мВ або -15 мВ) до -20 мВ або вище величини від (+12 мВ або +15 мВ) до +20 мВ, звичайно нижче -15 мВ або вище +15 мВ. Переважно, біосумісна наночастинка, за даним винаходом, має абсолютне значення електронного поверхневого заряду ("абсолютне значення поверхневого заряду") більше 10 мВ, причому ще переважніше вказаний заряд є негативним зарядом.

Поки наночастинка, застосовна в контексті винаходу, є зарядженою, вона може бути або органічною, або неорганічною. Також можна застосовувати суміш органічних і неорганічних наночастинок.

Якщо наночастинка є органічною, вона може являти собою наночастинку на ліпідній основі (гліцероліпід, фосфоліпід, стеринліпід і т. д.), наночастинку на основі білка, також позначену тут як "білкова наночастинка" (наприклад, альбумін), наночастинку на основі полімеру ("полімерна наночастинка"), наночастинку на основі співполімеру ("співполімерна наночастинка"), наночастинку на основі вуглецю, наночастинку, подібну вірусу (наприклад, вірусний вектор).

Органічна наночастинка також може являти собою наносферу (звичайна наночастинка) або нанокапсулу (порожниста наночастинка), таку як ліпосома, гель, гідрогель, міцелу, дендример і т. д. Можна також використовувати суміш описаних тут органічних наночастинок. Полімер або співполімер може мати природне або синтетичне походження.

Приклади синтетичних (штучних) і природних полімерів або співполімерів, застосовних в контексті винаходу для отримання органічних наночастинок, можна вибрати із наступних речовин: полімолочна кислота (PLA), полі(лактид-гліколева) кислота (PLGA), поліетиленгліколь (PEG), полігалактин, полілактид, поліоксіетиленові ефіри жирних кислот, поліпропіленгліколь, полісорбат, полівініловий спирт, поліакриламід, поліметилметакрилат, поліалкілціаноакрилат, полілактат-со-гліколат, полі(амідоамін), полі(етиленімін), альгінат, целюлоза і полімери похідні целюлози, колаген, гіалуронова кислота, поліглутамінова кислота (PGA), актин, полісахарид і желатин.

Коли наночастинка є неорганічною, і якщо її найбільший розмір становить величину звичайно менше приблизно 10 нм, наприклад, менше приблизно 8 нм, менше приблизно 7 нм, звичайно приблизно від 7 нм до приблизно 4 нм, наприклад, менше приблизно 6 нм, менше приблизно 5 нм або менше приблизно 4 нм, наночастинка може бути утворена будь-яким неорганічним матеріалом. Неорганічний матеріал може містити, наприклад, металевий елемент із 3, 4, 5, 6 періода періодичної таблиці Менделєєва, у тому числі лантаніди. Якщо найбільший розмір наночастинки становить величину звичайно менше приблизно 10 нм, наночастинки можуть асоціюватися в крупніші структури. Асоціація наночастинок в крупнішу структуру звичайно може запускатися взаємодією між наночастинками і біосумісним полімером(ами), білком(ами) і т. д. Крупнішу структуру також можна отримати шляхом захоплення наночастинок носієм, звичайно простим носієм, таким як желатинова структура (також тут позначена як "желатинова наночастинка"), або порожнистим носієм, таким як ліпосома. Після *in vivo* введення ці крупніші структури можуть далі вивільняти наночастинки.

Коли наночастинка є неорганічною, і якщо її найбільший розмір становить щонайменше 10 нм, звичайно від 10 до 500 нм, то наночастинка може містити щонайменше один із елементів-двовалентних металів, або може складатися із (i) одного або більшої кількості елементів-двовалентних металів, вибраних, наприклад, із Mg, Ca, Ba і Sr, (ii) одного або більшої кількості елементів-тривалентних металів, вибраних, наприклад, із Fe і Al, і (iii) одного або більшої кількості елементів-чотиривалентних металів, які включають Si.

У конкретному варіанті здійснення неорганічний матеріал наночастинки вибраний із (i) одного або більшої кількості елементів-двовалентних металів, вибраних, наприклад, із Mg, Ca, Ba і Sr (ii), одного або більшої кількості елементів-тривалентних металів, вибраних, наприклад, із Fe і Al, і (iii) одного або більшої кількості елементів-чотиривалентних металів, які включають Si.

У іншому конкретному варіанті здійснення неорганічний матеріал наночастинки вибраний із карбонату кальцію ( $\text{CaCO}_3$ ), карбонату магнію ( $\text{MgCO}_3$ ), гідроксиду магнію ( $\text{Mg(OH)}_2$ ), гідроксиду заліза ( $\text{Fe(OH)}_2$ ), оксигідроксиду заліза ( $\text{FeOOH}$ ), оксиду заліза ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  або  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), оксиду алюмінію ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), гідроксиду алюмінію ( $\text{Al(OH)}_3$ ), оксигідроксиду алюмінію ( $\text{AlOOH}$ ) і оксиду кремнію ( $\text{SiO}_2$ ).

Наночастинки, використовувані в описаних тут композиціях, повинні бути біосумісними, тобто сумісними із живими тканинами. Таким чином, якщо потрібно для композиції, наночастинки повинні бути покриті біосумісним матеріалом, щоб стати придатними. Отже, у конкретному варіанті здійснення винаходу на наночастинку, яка згадується тут, наносять біосумісне покриття.

Біосумісний матеріал може являти собою агент, який допускає взаємодію із біологічною мішенню. Такий агент звичайно приносить позитивний або негативний заряд на поверхню наночастинок, коли абсолютний заряд наночастинки становить щонайменше 10 мВ.

Агент, утворюючий позитивний заряд на поверхні наночастинки, можна вибрати, наприклад, із амінопропілтриетоксисилану або полілізіну. Агент, утворюючий негативний заряд на поверхні наночастинки, можна вибрати, наприклад, із фосфату (наприклад, поліфосфату, метафосфату, пірофосфату і т. д.), карбоксилату (наприклад, цитрату або дикарбонової кислоти, зокрема сукцинової кислоти) або сульфату.

У конкретному варіанті здійснення, поки абсолютний заряд наночастинки становить щонайменше 10 мВ (10 мВ), наночастинка може мати покриття із біосумісного матеріалу, вибраного із агента, який демонструє стеричну групу. Така група може бути вибрана, наприклад, із поліетилєнглїколю (PEG); поліетилєноксиду; полівінілового спирту; поліакрилату; поліакриламїду (полі(N-ізопропілакриламїду)); полікарбамїду; біополїмеру; полісахариду, такого як декстран, ксилан і целюлоза; колагену; цвіттерїйної сполуки, такої як полісульфобетайн; і т. д.

Біосумісне покриття переважно може являти собою "повне покриття" (цїлий моношар). Це має на увазі наявність дуже високої щільності біосумісних молекул, які створюють придатний заряд на всій поверхні наночастинки.

Біосумісне покриття може додатково містити маркувальний агент, звичайно агент, який дозволяє візуалїзацію кольору із використанням стандартного фотодетектора.

Спільне введення біосумісної наночастинки разом із сполукою, яка представляє інтерес, зберігає фармацевтичну (тобто терапевтичну, профїлактичну або діагностичну), звичайно терапевтичну, користь сполуки, яка представляє інтерес, при зниженій токсичності, або підвищує фармацевтичну користь сполуки при еквівалентній або зниженій токсичності для суб'єкта, звичайно, якщо введення агентів суб'єкту, який потребує сполуку, яка представляє інтерес, проводять одне за одним із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год., у порівнянні із фармацевтичною користю і токсичністю, яка індукується стандартною фармацевтичною, звичайно терапевтичною, дозою вказаної сполуки.

У конкретному варіанті здійснення, спільне введення біосумісної наночастинки і сполуки, яка представляє інтерес, дозволяє знизити терапевтичну дозу сполуки, яка вводиться, щонайменше на 10 %, переважно щонайменше на 15 %, звичайно, якщо введення агентів суб'єкту, який потребує сполуку, яка представляє інтерес, проводять одне за одним із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год., у порівнянні із стандартною терапевтичною дозою вказаної сполуки при зберїганні такої ж терапевтичної користі і еквівалентної токсичності або зниженої токсичності (переважно зниженої токсичності) сполуки для суб'єкта; або при підвищенні терапевтичної користі і еквівалентної або зниженої токсичності сполуки для суб'єкта. У конкретному варіанті здійснення наночастинку(и) вводять із декількома сполуками, які представляють інтерес, звичайно двома сполуками, які представляють інтерес.

Наночастинка переважно виводиться із організму суб'єкта, якому була введена, звичайно протягом періоду від 1 год. до 6 тижнів, наприклад, протягом 1 місяця (4 тижні), від 1 год. до 1 місяця, наприклад, від 1 год. до 3 тижнів, або від 1 год. до 2 тижнів, або від 1 год. до 1 тижня, після її введення суб'єкту, який потребує сполуку, яка представляє інтерес.

Матеріал, який складає наночастинку (разом із її біосумісним покриттям, якщо таке є), є важливим для визначення біостійкості наночастинки. Наночастинка може вважатися біодеградуованою (якщо складається, наприклад, із біодеградуованого полімеру, такого як PLGA або PLA), розчинною (наприклад, оксид заліза) або небіодеградуованою і нерозчинною.

Біодegradовані і розчинні наночастинки полегшують швидкий кліренс наночастинок із організму суб'єкта.

Згідно із даним описом можна використовувати різні молекули або агенти як щонайменше одну сполуку, яка представляє інтерес, звичайно як щонайменше одну фармацевтичну сполуку, яка представляє інтерес, яка вводиться в комбінації із біосумісною наночастиною, як описано тут вище. Дана сполука може являти собою терапевтичну, профілактичну або діагностичну сполуку, як пояснювалося раніше. Вона може бути органічною сполукою або неорганічною сполукою.

Приклади органічної сполуки, придатної як сполука, яка представляє інтерес, можна вибрати із біологічної сполуки, антитіла, олігонуклеотиду, синтезованого пептиду, низькомолекулярних цільових терапевтичних засобів, цитотоксичної сполуки і будь-яких відповідних проліків або її похідного і т. д.

У конкретному варіанті здійснення сполука, яка представляє інтерес, яка застосовується в контексті даного винаходу, являє собою органічну сполуку, переважно вибрану із біологічної сполуки, низькомолекулярного цільового терапевтичного засобу і цитотоксичної сполуки. У іншому конкретному варіанті здійснення сполука, яка представляє інтерес, вибрана із антитіла, олігонуклеотиду і синтезованого пептиду.

Біологічна сполука являє собою, наприклад, антитіло, переважно моноклональне антитіло ("mAb"), таке як інфліксимаб, адаліумаб, бевацизумаб, ритуксимаб, трастузумаб, ранібізумаб, суегксимаб, панатимумаб; білок або рекомбінантний білок, такий як енбрел (етанерцепт) або інтерферон бета-1а; пептид або рекомбінантний пептид, такий як інсулін гларгін або бетасерон; вакцину, таку як превнар 13 або гардазил; біоаналог, такий як епогін; фермент або рекомбінантний фермент, такий як реплагал або среон; і т. д.

Олігонуклеотид являє собою, наприклад, антисмисловий олігонуклеотид, аптамер, такий як міпомерсен натрію або пурсенід і т. д.

Синтезований або штучний пептид, такий як глатирамерацетат або леупролідацетат.

Низькомолекулярний цільовий терапевтичний засіб звичайно інгібує ферментативні домени на мутованому, понадміру експресованому або іншому критичному білку (потенційної мішені у контексті лікування раку) у злоскісних клітинах. Деякі терапевтичні агенти включають агенти, які націлені на поділ клітин (наприклад, інгібітор авроракинази або інгібітор цикліна залежної кінрази), а також інші біологічні механізми, такі як оновлення білка і модифікація хроматину (наприклад, інгібітор гістондеацетилази). Низькомолекулярний цільовий терапевтичний засіб являє собою, наприклад, іматиніб, рапаміцин, гефітініб, ерлотиніб, сорафеніб, сунітиніб, нілотиніб, дазатиніб, лапатиніб, бортезоміб, аторвастатин і т. д.

Цитотоксична сполука являє собою, наприклад, ДНК-модифікуючий агент, такий як антрациклін (наприклад, доксорубіцин, даунорубіцин і т. д.), алкілюючий агент (наприклад, мелфалан або темозоломід), а також ліки, дуже суворо інтерферуючі із певними фізіологічними механізмами, такими як полімеризація мікротрубочок (наприклад, таксол) або синтез метаболітів (наприклад, метотрексат). У контексті фотодинамічної терапії звичайно використовують цитотоксичну сполуку (наприклад, фотофрин), що активується, і для продукування терапевтичного ефекту його потрібно активувати за допомогою зовнішнього джерела, такого як лазерне джерело. Інші типові цитотоксичні сполуки звичайно вибрані із хіміотерапевтичних агентів, які описані тут або відомі фахівцям онкологам.

Проліки (наприклад, капецитабін або іринотекан) утворюються у вигляді своєї активної форми в процесі *in vivo* метаболізму, продукуючи передбачуваний терапевтичний ефект.

Приклади неорганічної сполуки, придатної як сполука, яка представляє інтерес, можна вибрати із координаційного комплексу перехідного металу, радіофармацевтичної сполуки, наночастинки і т. д.

Координаційні комплекси перехідних металів пропонують потенційні переваги у порівнянні із звичайнішими ліками на органічній основі, включаючи широкий діапазон координаційних чисел і геометрії, досяжні окислювально-відновні стани, 'регульованість' термодинаміки і кінетики лігандного заміщення, а також широка структурна різноманітність. Речовини на основі металу взаємодіють із клітинними молекулярними мішенями, впливаючи на біохімічні функції, в результаті чого відбувається деструкція злоскісних клітин. Координаційні комплекси перехідних металів звичайно являють собою цитотоксичні агенти (наприклад, координаційні комплекси платини: цисплатин, карбоплатин, оксалоплатин - або координаційні комплекси рутенію або золота), які впливають на структуру ДНК.

Радіофармацевтичні сполуки випускають випромінювання для діагностичних цілей або з метою селективного руйнування злоскісних клітин. Типові радіофармацевтичні препарати можуть містити, наприклад, стронцій-89, талій-201, технецій-99, самарій-83 і т. д.

Наночастинка звичайно може бути вибрана із наночастинки оксиду металу (дивись, наприклад, WO 2009/147214 і WO 2007/118884), наночастинки металу (наприклад, наночастинок золота, платини або срібла), наночастинки сульфїду металу (наприклад,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ) і будь-якої їх суміші (наприклад, наночастинок золота, покритих оксидом гафнію). Наприклад, наночастинка являє собою наночастинку, яку можна активувати за допомогою зовнішнього джерела, такого як джерело електромагнітного випромінювання, ультразвукового джерело, магнітного джерело і т. д.

Сполуку, яка представляє інтерес, яку вводять в комбінації із біосумісною наночастинкою, яка описана тут вище (звичайно вводять послідовно, як тут описано), можна інкапсулювати в носій або прищепити (або зв'язати) до такого носія способами, відомими фахівцям. Типовим носієм є, наприклад, ліпосома (така як DOXIL або ThermoDox, у якій використаний термочутливий ліпід), міцела, полімерний носій (або "полімер"), гідрогель, гель, співполімерний носій, білковий носій, неорганічний носій.

Фармацевтичну композицію за винаходом (яка визначається комбінацією представляючої інтерес сполуки і наночастинки) можна застосовувати у багатьох галузях, зокрема для лікування людини або ветеринарії. Звичайно дана композиція призначена для застосування на тварині, переважно на ссавці (наприклад, у ветеринарній медицині), ще переважніше на людях будь-якого віку і статі.

Фармацевтичні композиції за винаходом можна застосовувати при серцево-судинних захворюваннях, захворюваннях центральної нервової системи (ЦНС), шлунково-кишкових захворюваннях, генетичних порушеннях, гематологічних порушеннях, гормональних порушеннях, імунологічних, інфекційних захворюваннях, метаболічних порушеннях, скелетом'язових порушеннях, онкології, респіраторних захворюваннях, токсикології і т. д. У переважному варіанті фармацевтичну композицію застосовують при серцево-судинних захворюваннях, ЦНС-захворюваннях, онкології, інфекційних захворюваннях, метаболічних порушеннях.

У контексті даного винаходу наночастинку і сполуку(и) ("сполуку(и), яка представляє інтерес") переважно потрібно вводити суб'єкту, який потребує вказану сполуку, одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год., звичайно від 5 хв. до приблизно 24 год., переважно від 5 хв. або 30 хв. до приблизно 12 год., з метою оптимізації фармацевтичної ефективності сполуки.

У даному винаході, якщо наночастинку і сполуку(и) ("сполуку(и), яка представляє інтерес") переважно вводять суб'єкту, який потребує вказану сполуку, одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год., то абсолютне значення поверхневого заряду біосумісної наночастинки становить щонайменше 10 мВ ( $\geq 10$  мВ).

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу, якщо наночастинку і сполуку(и) ("сполуку(и), яка представляє інтерес") переважно вводять суб'єкту, який потребує вказану сполуку, одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 24 год., то абсолютне значення поверхневого заряду біосумісної наночастинки переважно становить щонайменше 15 мВ ( $\geq 15$  мВ).

У іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу, якщо наночастинку і сполуку(и) ("сполуку(и), яка представляє інтерес") переважно вводять суб'єкту, який потребує вказану сполуку, одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 12 год., то абсолютне значення поверхневого заряду біосумісної наночастинки переважно становить щонайменше 20 мВ ( $\geq 20$  мВ).

Також тут описаний спосіб лікування суб'єкта страждаючого від такого захворювання як захворювання, які згадуються тут, де вказаний спосіб включає введення вказаному суб'єкту фармацевтичної композиції за винаходом, звичайно введення біосумісної наночастинки і щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, яка тут описана. Першим можна вводити суб'єкту будь-який компонент із наночастинки або щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, доки біосумісну наночастинку і сполуку вводять одну за одною із інтервалом від 5 хв. до приблизно 72 год. Введення будь-якого компонента із вказаної наночастинки або щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, може бути разовим введенням кожного, багаторазовим введенням кожного, наприклад, декілька послідовних введень кожного компонента.

Біосумісну наночастинку можна вводити одноразово і щонайменше одну сполуку, яка представляє інтерес, можна вводити більше одного разу і навпаки.

У конкретному варіанті здійснення біосумісну наночастинку вводять щонайменше на початку протоколу, який включає декілька введень сполуки, яка представляє інтерес, тобто щонайменше при першому введенні вказаної сполуки, яка представляє інтерес, і до або після її введення.

У іншому конкретному варіанті здійснення біосумісну наночастинку не вводять на початку протоколу, який включає декілька введеннь сполуки, яка представляє інтерес, і не вводять перед другим або третім введенням вказаної сполуки, яка представляє інтерес, і до або після її введення.

5 У контексті цих двох останніх варіантів здійснення також можна вводити біосумісну наночастинку разом (до або після, як пояснюється раніше) із сполукою, яка представляє інтерес, при деяких або при всіх подальших введеннях вказаної сполуки, яка представляє інтерес.

10 У конкретному варіанті здійснення наночастинку за винаходом вводять суб'єкту до введення вказаному суб'єкту щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес, звичайно за (5 хв. - приблизно 72 год.) до введення щонайменше однієї сполуки, яка представляє інтерес.

У даному контексті термін "наночастинка" конкретніше стосується продукту, зокрема синтетичного продукту, із розміром частинок приблизно від 4 нм до приблизно 100 нм, наприклад, приблизно від 10 нм, 15 нм або 20 нм до приблизно 100 нм. Прикладом сполуки, яка 15 представляє інтерес і використовується із такими наночастинками, є органічна сполука, звичайна біологічна сполука. Вона переважно вибрана із антитіла, олігонуклеотиду, синтезованого пептиду, низькомолекулярного цільового терапевтичного засобу і цитотоксичної сполуки і переважно являє собою антитіло, низькомолекулярний цільовий терапевтичний засіб і/або цитотоксичну сполуку. По-іншому, термін "наночастинка" може стосуватися продукту, 20 зокрема синтетичного продукту із розміром частинок приблизно від 100 нм до приблизно 500 нм, звичайно приблизно від 100 нм до приблизно 300 нм. Прикладом сполуки, яка представляє інтерес і використовується із такими наночастинками, є неорганічна сполука, звичайно вибрана із наночастинки металу, наночастинки оксиду металу, наночастинки сульфід металу і будь-якої їх суміші або будь-якої сполуки, яка представляє інтерес, інкапсульованої в носій або 25 прищепленої на такий носій.

Біосумісну наночастинку фармацевтичної композиції за винаходом можна вводити будь-яким способом, наприклад, внутрішньовенно (IV), внутрішньоартеріально і/або внутрішньоочеревинно. Переважним способом введення є внутрішньовенний спосіб.

30 Сполуку(и) фармацевтичної композиції, яка представляє інтерес за винаходом, можна вводити різними способами, такими як підшкірний, внутрішньовенний (IV), інтрадермальний, внутрішньоартеріальний, повітряний (інгаляція), внутрішньоочеревинний, внутрішньом'язовий і/або пероральний спосіб (через рот).

Наступні приклади ілюструють винахід, не обмежуючи його галузь.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

35 Фіг. 1: схематичне зображення можливих способів виведення терапевтичних сполук із кровообігу залежно від розміру сполуки (найбільший розмір).

Фіг. 2: схематичне представлення розкладу обробок для фармацевтичної композиції, яка містить (i) біосумісні наночастинки за прикладом 3 і (ii) ксенотрансплантати Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN.

40 Фіг. 3: затримка поновлення росту пухлини при застосуванні фармацевтичної композиції, яка містить біосумісні наночастинки за прикладом 3 і ксенотрансплантати Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN (середній RTV  $\pm$ SD).

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Синтез № I ліпосом як біосумісних наночастинок

45 Ліпосоми отримують, застосовуючи спосіб регідратації ліпідної плівки.

а) Ліпіди розчиняють в хлороформі. Хлороформ зрештою випаровують у потоці азоту. Регідратацію ліпідної плівки за допомогою HEPES 20 мМ і NaCl 140 мМ при pH 7,4 проводять при 50°C, так що концентрація ліпідів становить 5 мМ.

50 Для отримання заряджених ліпосом використовують наступну ліпідну композицію: DPPC (дипальмітоїлфосфатидилхолін): 86 % мольн.; MPPC (монопальмітоїлфосфатидилхолін): 10 % мольн.; DSPE-PEG (дистеарилфосфатидилетаноламін-[метокси(поліетилєнглїколь)-2000]): 4 % мольн.

б) Потім виконують цикл заморожування-відтавання 6 разів, послідовно занурюючи зразок в рідкий азот і у водяну баню із регульованою температурою 50°C.

55 с) Для калібрування розміру ліпосом використовують термобарабаний екструдер (LIPLEX™ Extruder, Northern Lipids) при регульованій температурі і тиску. У всіх випадках екструзію проводять при 50°C і тиску 10 бар.

60 Розподіл по розмірах отриманих таким чином ліпосом визначають методом динамічного розсіювання світла (DLS), використовуючи прилад Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) із 633 нм HeNe лазером із кутом 90°C. Суспензію ліпосом розводять 100-кратно в HEPES 20 мМ і NaCl

140 мМ із рН 7,4. Розмір ліпосом (тобто гідродинамічний діаметр) дорівнює приблизно 170 нм із коефіцієнтом полідисперсності (PDI), який дорівнює приблизно 0,1.

Фахівцям зрозуміло, що бажаний поверхневий заряд отримують, завдяки вибраній ліпідній композиції, і його величину підтверджують, вимірюючи зета-потенціал із використанням приладу Zetasizer NanoZS (Malvern instrument).

Ліпосоми розводять 100-кратно у воді і рН результуючої суспензії доводять до рН 7,4. Поверхневий заряд ліпосом дорівнює приблизно - 14 мВ із рН 7,4.

Приклад 2. Спосіб, який дозволяє знизити щонайменше на 10 % дозу терапевтичної сполуки, яку потрібно ввести суб'єкту для отримання еквівалентної терапевтичної ефективності сполуки в організмі суб'єкта.

Фармацевтичну композицію за пунктом 1, яка містить біосумісну наночастинку і активовану наночастинку оксиду для протиракової терапії (використовувані як "сполуки" або "фармацевтична сполука"), яка може генерувати електрон і/або високоенергетичний протон під впливом іонізуючого випромінювання, такого як рентгенівське випромінювання, вводять "голим" мишам, які несуть ксенотрансплантовану пухлину, таким чином:

а) введення кожній "голій" миші (за допомогою внутрішньовенної ін'єкції) біосумісних наночастинок;

б) через проміжок часу, який дорівнює від 5 хв. до 72 год., після стадії а) введення (за допомогою внутрішньовенної ін'єкції) кожній миші із стадії а) терапевтичної сполуки при меншій дозі (на 10 %) у порівнянні із дозою, яка звичайно застосовується;

с) визначення концентрації терапевтичної сполуки в зразках крові і плазми від кожної миші для отримання фармакокінетичних параметрів терапевтичної сполуки, причому вказану концентрацію вимірюють один раз або переважно декілька разів через проміжок часу від 1 хв. до 24 год. після введення терапевтичної сполуки;

д) оцінка якої-небудь клінічної ознаки токсичності після введення фармацевтичної композиції і

е) визначення акумулювання в пухлині терапевтичної сполуки через 24 год. після внутрішньовенного (IV) її введення.

Приклад 3. Синтез № 2 ліпосом як біосумісних наночастинок

Ліпосоми отримують, застосовуючи спосіб регідратації ліпідних плівок.

а) Ліпіди розчиняють в хлороформі. Хлороформ зрештою випаровують у потоці азоту. Регідратацію ліпідної плівки за допомогою HEPES 20 мМ і NaCl 140 мМ із рН 7,4 проводять при 60°C, так що концентрація ліпиду становить 25 мМ.

Для отримання заряджених ліпосом використовують наступну ліпідну композицію: DPPC (дипальмітоїлфосфатидилхолін) 62 % мольн.; HSPC (гідрований соєвий фосфатидилхолін) 20 % мольн.; CHOL (холестерин) 16 % мольн.; POPS (1-пальмітоїл-2-олеїлфосфатидилсерин) 1 % мольн.; DSPE-PEG (дистеарилфосфатидилетаноламін-[метокси(поліетилєнглїколь)-2000]) 1 % мольн.

б) Потім виконують цикл заморожування-відтавання 6 разів, послідовно занурюючи зразок у рідкий азот і у водяну баню із регульованою температурою 60°C.

с) Для калібрування розміру ліпосом використовують термобарабанний екструдер (LIPLEX™ Extruder, Northern Lipids) при регульованій температурі і тиску. У всіх випадках екструзію проводять при 60°C і тиску 5 бар, із полівініліденфторидною (PVDF) мембраною, яка має розмір пор 0,1 мкм.

Розподіл по розмірах отриманих таким чином ліпосом визначають методом динамічного розсіювання світла (DLS), використовуючи прилад Zetasizer NanoZS (Malvern instrument) із 633 нм HeNe лазером при куті 90°C. Суспензію ліпосом розводять 100-кратно в HEPES 20 мМ і NaCl 140 мМ із рН 7,4. Розмір ліпосом (тобто гідродинамічний діаметр) дорівнює приблизно 145 нм із коефіцієнтом полідисперсності (PDI), дорівнює приблизно 0,1.

Фахівцям зрозуміло, що бажаний поверхневий заряд отримують, завдяки вибраній ліпідній композиції, і його величину підтверджують за допомогою вимірювання зета-потенціалу, використовуючи прилад Zetasizer NanoZS (Malvern instrument).

Ліпосоми розводять 100-кратно в розчині хлориду натрію із концентрацією 1 мМ і доводять рН результуючої суспензії до рН 7,4. Поверхневий заряд ліпосом дорівнює приблизно -25 мВ при рН 7,4, NaCl 1 мМ.

Приклад 4. Затримка поновлення росту пухлини при застосуванні фармацевтичної композиції, яка містить суспензію біосумісних наночастинок за прикладом 3 і ксенотрансплантати Dox-NP®, на MDA-MB-231-lucD3H2LN (фігури 2 і 3)

Даний аналіз проводять з метою дослідження ефективності фармацевтичної композиції, яка містить (i) біосумісні наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (ліпосомальний

інкапсульований доксорубіцин) як терапевтичну сполуку, яка представляє інтерес, на моделі пухлини MDA-MB-231-luc-D3H2LN, ксенотрансплантованої NMRI "голим" мишам.

Клітинну лінію аденокарциноми людської молочної залози MDA-MB-231-luc-D3H2LN купують у Caliper Life Science (Villepinte, France). Клітини культивують у мінімальному підтримуючому середовищі із збалансованим сольовим розчином Ерла MEM/EBSS, доповненої 10 % фетальної телячої сироватки, 1 % несуттєвих амінокислот, 1 % L-глутаміну і 1 % пірувату натрію (Gibco).

6-7-тижневих "голих" мишей NMRI (20-25 г) замовляють в Janvier Labs (France). Мишей піддають загальному опроміненню 3 Гр за допомогою цезій-137 опромінюючого пристрою за день до інокуляції ракових клітин з метою отримання ксенотрансплантата.

Пухлини MDA-MB-231-luc-D3H2LN отримують, роблячи підшкірну ін'єкцію  $4,10^6$  клітин в 50 мкл в нижню частину правого боку миші. Пухлину вирощують до досягнення об'єму близько 100 мм<sup>3</sup>. Вимірюють діаметр пухлини, використовуючи штангенциркуль із цифровою індикацією, і розраховують об'єм пухлини в мм<sup>3</sup>, використовуючи формулу:

$$\text{Об'єм пухлини (мм}^3\text{)} = \frac{\text{довжина (мм)} \times (\text{ширина (мм)})^2}{2}$$

Мишей розподіляють випадковим чином по окремих клітках і ідентифікують за номером (тату на лапі). Чотири групи обробляють, як показано на фігурі 2.

Група 1: стерильна 5 % глюкоза (контрольна група (носій)).

Чотирьом (4) мишам вводять внутрішньовенно (IV) стерильний 5 % розчин глюкози в день 1, день 7 і день 14. Кожний раз (день) виробляють дві ін'єкції 5 % глюкози. Першу ін'єкцію 5 % розчину глюкози проводять за 4 год. до другої ін'єкції.

Група 2: біосумісні наночастинки за прикладом 3 (контрольна група).

Чотирьом (4) мишам вводять внутрішньовенно (IV) стерильний 5 % розчин глюкози і біосумісні наночастинки за прикладом 3 (10 мл/кг) в день 1, день 7 і день 14. Кожний раз (день) проводять ін'єкцію біосумісних наночастинок за прикладом 3 за 4 год. до ін'єкції 5 % розчину глюкози.

Група 3: Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) (експериментальна група).

П'яти (5) мишам вводять внутрішньовенно (IV) стерильний 5 % розчин глюкози і Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) в день 1, день 7 і день 14. Кожний раз (день) проводять ін'єкцію стерильного 5 % розчину глюкози за 4 год. до ін'єкції Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину).

Група 4: фармацевтична композиція, тобто комбінація (i) біосумісних наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) (експериментальна група).

П'яти (5) мишам вводять внутрішньовенно (IV) біосумісні наночастинки за прикладом 3 (10 мл/кг) і Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) в день 1, день 7 і день 14. Кожний раз (день) ін'єкцію біосумісних наночастинок за прикладом 3 проводять за 4 год. до ін'єкції Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину).

Вводять Dox-NP® (Avanti Polar Lipids - ліпосомальний препарат 2 мг/мл доксорубіцин. HCl із pH 6,5-6,8 в 10 mM гістидиновому буфері із 10 % мас./об. сахарози) без додаткового розведення в об'ємі, необхідному для отримання 3 мг/кг доксорубіцину, який вводиться.

Суспензію біосумісних наночастинок за прикладом 3 використовують без додаткового розведення.

Вводять Dox-NP® і біосумісні наночастинки за прикладом 3, проводячи внутрішньовенну ін'єкцію (IV) в латеральну хвостову вену за допомогою 100 Од (0,3 мл) інсулінового шприца (TERUMO, France).

Мишей спостерігають, відстежуючи клінічні ознаки, масу тіла і розмір пухлини.

Об'єм пухлини визначають по двох просторових вимірюваннях об'єму пухлини за допомогою штангенциркуля із цифровою індикацією, використовуючи наступну формулу:

$$\text{Об'єм пухлини (мм}^3\text{)} = \frac{\text{довжина (мм)} \times (\text{ширина (мм)})^2}{2}$$

У кожній групі відносний об'єм пухлини (RTV) виражають як відношення  $V_t/V_0$  ( $V_t$  відповідає об'єму пухлини в даний день в період обробки і  $V_0$  відповідає об'єму пухлини на початку обробки).

Ефективність обробки визначають, використовуючи питома сповільнення росту (SGD) протягом періоду подвійного подвоєння (період одного подвоєння дорівнює часу, протягом якого пухлина подвоюється в об'ємі) і оптимальне процентне значення T/C (% T/C).

SGD розраховують за період подвійного подвоєння таким чином:

$$\text{SGD} = \frac{\text{Т4d обробка}}{\text{Т4d контроль}}$$

де T4d відповідає часу, необхідного для подвійного подвоєння пухлини в об'ємі (середній RTV від 100 мм<sup>3</sup> до 400 мм<sup>3</sup>).

Процентне значення T/C ("T/C") розраховують, проводячи розподіл середнього відносного об'єму пухлини тварин із оброблених груп (групи 2, 3, 4) відносно контрольної групи (група 1) у дні 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 і 24, і множачи результат вказаного розподілу на 100 (дивись таблицю 2). Найменші значення % T/C, отримані за 2 тижні після обробки із введенням ін'єкції (в присутності або за відсутності біосумісних наночастинок, які застосовуються в контексті даного винаходу) відповідають оптимальним значенням % T/C.

На фігурі 3 показаний середній відносний об'єм пухлини (середній RTV) для всіх груп, який отриманий (в описаних вище умовах) після IV ін'єкцій:

- носія (стерильна 5 % глюкоза) в дні 1, 7 і 14 (група 1);
- біосумісних наночастинок за прикладом 3 за 4 год. до кожної ін'єкції носія (стерильна 5 % глюкоза) в дні 1, 7 і 14 (група 2);
- Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) в дні 1, 7 і 14 (група 3); або
- біосумісних наночастинок за прикладом 3 за 4 год. до ін'єкції Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) в дні 1, 7 і 14 (група 4).

Як показано на фігурі 3, помітне інгібування росту пухлини спостерігають після першої ін'єкції фармацевтичної композиції, яка містить комбінацію (i) біосумісних наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину), у порівнянні із введенням тільки Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину).

Розраховують час (виражений у днях), необхідний для кожної пухлини, щоб двічі подвоїтися в об'ємі (T4d) (як міру тривалості ефектів обробки). Визначають T4d для фармацевтичної композиції, яке дорівнює приблизно 31 дню відносно приблизно 14 днів для введення тільки Dox-NP® (таблиця 1). Крім того, питома сповільнення росту (SGD), що визначається із росту пухлин протягом періоду подвійного подвоєння (виходячи із середнього RTV від 100 мм<sup>3</sup> до 400 мм<sup>3</sup>), дорівнює приблизно 2 для фармацевтичної композиції відносно приблизно 0 для введення тільки Dox-NP® (таблиця 1).

Таблиця 1

| Групи                                                                                                              | T4d (в днях) від 100 до 400 мм <sup>3</sup> (середн. RTV) | SGD |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----|
| Група 1: носій (контрольна група)                                                                                  | 11                                                        | -   |
| Група 2: біосумісні наночастинок за прикладом 3                                                                    | 11                                                        | 0   |
| Група 3: тільки Dox-NP® (3 мг/кг)                                                                                  | 14                                                        | 0   |
| Група 4: фармацевтична композиція, яка містить (i) біосумісні наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (3 мг/кг) | 31                                                        | 2   |

Таблиця 1: час, необхідний, щоб пухлина двічі подвоїлася в об'ємі (T4d) і питома сповільнення росту (SGD), яке визначається по росту пухлини протягом періоду подвійного подвоєння. Td4 представляє кількість днів до досягнення періоду подвійного подвоєння (середній RTV від 100 мм<sup>3</sup> до 400 мм<sup>3</sup>). У контрольній групі вводять тільки носій (5 % глюкозу) (-).

Крім того, процентне значення T/C (%T/C) (яке розраховується до дня умертвіння тварин із групи 1) знижується швидше для фармацевтичної композиції, ніж для введення тільки Dox-NP®. Це демонструє помітний вплив фармацевтичної композиції. Оптимальне значення T/C 25, яке спостерігається в день 24, дійсно отримане для фармацевтичної композиції, тобто комбінації (i) біосумісних наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину), притому що оптимальне значення %T/C 38, яке спостерігається в день 21, отримане для групи із введенням тільки Dox-NP® (таблиця 2).

Таблиця 2

| Дні | Група 2:<br>тільки біосумісні<br>наночастинки | Група 3:<br>тільки Dox-NP® (3 мг/кг) | Група 4: фармацевтична<br>композиція, яка містить (i)<br>біосумісні наночастинки і (ii) Dox-<br>NP® (3 мг/кг) |
|-----|-----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 100                                           | 100                                  | 100                                                                                                           |
| 3   | 104                                           | 126                                  | 121                                                                                                           |
| 7   | 90                                            | 106                                  | 80                                                                                                            |
| 10  | 87                                            | 76                                   | 60                                                                                                            |
| 13  | 103                                           | 80                                   | 55                                                                                                            |
| 15  | 98                                            | 74                                   | 45                                                                                                            |
| 18  | 98                                            | 56                                   | 43                                                                                                            |
| 21  | 87                                            | 38                                   | 33                                                                                                            |
| 24  | 98                                            | 40                                   | 25                                                                                                            |

Таблиця 2: процентне відношення Т/С (% Т/С розраховують, проводячи розподіл середнього відносного об'єму пухлини тваринних груп із обробкою (групи 2, 3, 4) відносно контрольної групи (група 1) в дні 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 і 24 і множаючи результат вказаного розподілу на 100. Контрольною групою є група 1 (тільки носій-стерильна 5 % глюкоза). %Т/С розраховують для дня 24, який відповідає дню умертвіння тварин із групи 1 (контрольної групи). Оптимальне значення %Т/С показане для кожної групи в сірих клітинках.

Скрізь результати демонструють сприятливе сповільнення росту пухлини при застосуванні фармацевтичної композиції за даним винаходом [відповідної комбінації (i) біосумісних наночастинок за прикладом 3 і (ii) Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину)], що не спостерігається, якщо застосовують тільки Dox-NP® (3 мг/кг доксорубіцину) (тобто у відсутність біосумісних наночастинок, які застосовуються у контексті даного винаходу). Це сповільнення росту пухлини спостерігають, якщо біосумісні наночастинки за прикладом 3 і сполуку, яка представляє інтерес (Dox-NP®), вводять послідовно, причому біосумісні наночастинки вводять суб'єктам за 4 год. до Dox-NP®.

Заявники відтворюють даний експеримент для підтвердження, що аналогічний результат спостерігається доти, доки сполуку, яка представляє інтерес, і біосумісні наночастинки вводять суб'єкту одну за одною із інтервалом від 5 хв. до 72 год.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб посилення терапевтичної або профілактичної ефективності фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, у суб'єкта, який потребує цього, причому спосіб включає стадію введення суб'єкту послідовно (i) біосумісної наночастинки, що має найбільший розмір від 4 нм до 500 нм і абсолютне значення поверхневого заряду дорівнює або вище 10 мВ (10 мВ), і (ii) фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, і де вказану наночастинку потрібно вводити суб'єкту від більше 5 хвилин до 72 годин до або після фармацевтичної сполуки, яка представляє інтерес, де наночастинка є органічною наночастинкою, вибраною з наночастинок на ліпідній основі, наночастинок на основі білка, наночастинок на основі полімеру, наночастинок на основі співполімеру, наночастинок на основі вуглецю і наночастинок, подібної вірусу.

2. Спосіб за п. 1, де наночастинка має абсолютне значення поверхневого заряду більше 10 мВ, причому вказаний заряд є негативним зарядом.

3. Спосіб за п. 1, де наночастинка додатково має біосумісне покриття.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, де послідовне введення біосумісної наночастинки і сполуки зберігає терапевтичну користь сполуки при зниженій токсичності або підвищує терапевтичну користь сполуки при еквівалентній або зниженій токсичності для суб'єкта, в порівнянні з терапевтичною користю і токсичністю, що індукується стандартною терапевтичною дозою вказаної сполуки.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де послідовне введення біосумісної наночастинки і сполуки дозволяє знизити щонайменше на 10 % терапевтичну дозу сполуки, що вводиться, в порівнянні зі стандартною терапевтичною дозою вказаної сполуки при збереженні такої ж терапевтичної користі і еквівалентної токсичності або зниженої токсичності для суб'єкта або при підвищенні терапевтичної користі і еквівалентної або зниженої токсичності для суб'єкта.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, де наночастинка виводиться з організму суб'єкта, якому була введена, протягом періоду від 1 години до 6 тижнів після її введення суб'єкту, який потребує фармацевтичної сполуки, що представляє інтерес і згадується в п. 1.

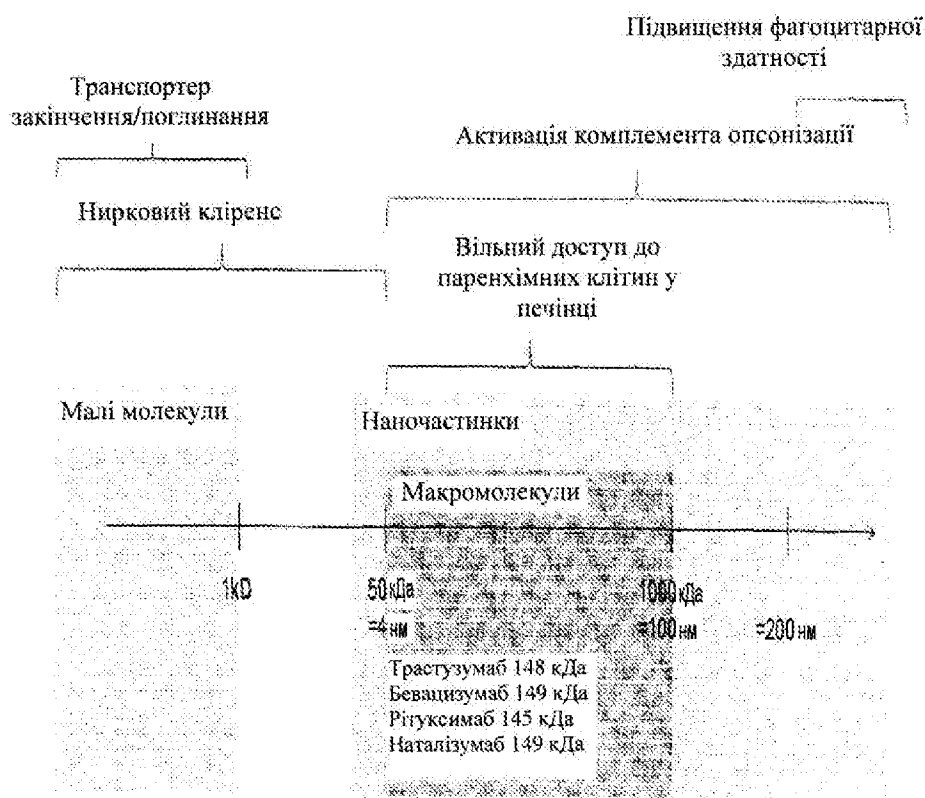
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де сполука являє собою органічну сполуку, переважно вибрану з біологічної сполуки, низькомолекулярного цільового терапевтичного засобу і цитотоксичної сполуки.

8. Спосіб за п. 7, де сполука вибрана з антитіла, олігонуклеотиду і синтезованого пептиду.

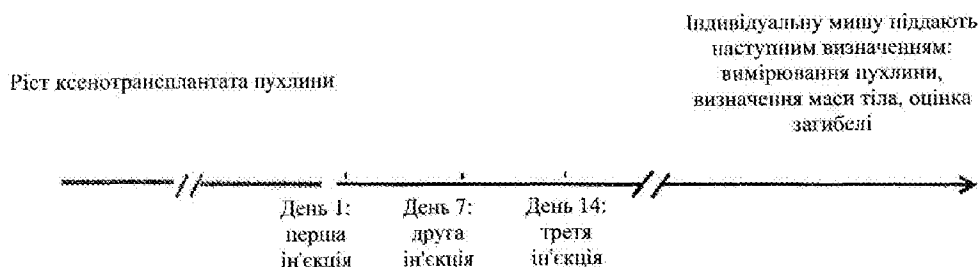
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де сполука являє собою неорганічну сполуку, вибрану з наночастинок металу, наночастинок оксиду металу, наночастинок сульфиду металу і будь-якої їх суміші.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, де сполука, яка представляє інтерес, інкапсульована в носій.

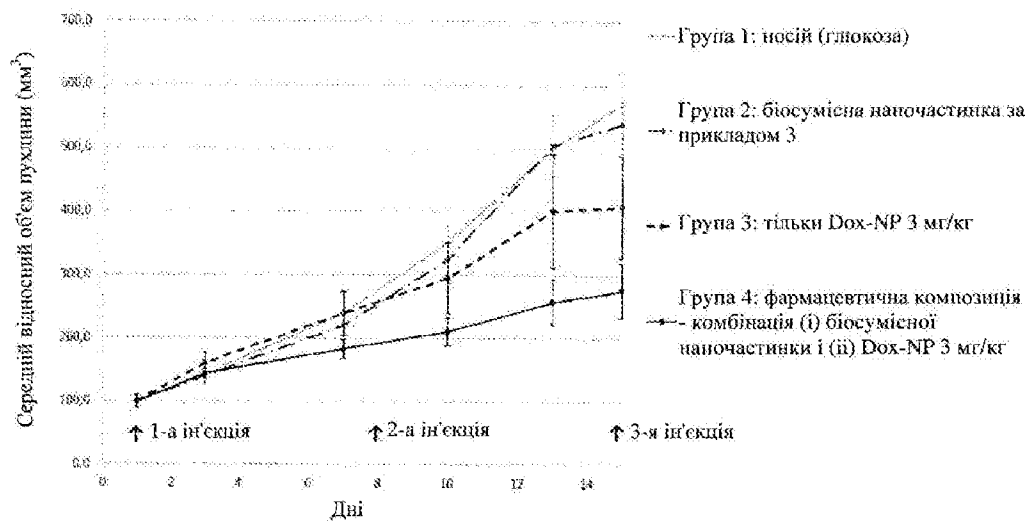
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, де сполука, яка представляє інтерес, пов'язана з носієм.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601