



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 437 692** (13) **C2**

(51) МПК
A61N 5/10 (2006.01)
A61N 5/067 (2006.01)
A61M 16/12 (2006.01)
A61K 31/02 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010109034/14, 12.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.03.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.03.2010

(45) Опубликовано: 27.12.2011 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2006276374 A1, 07.12.2006. RU 2296593 C1, 10.04.2007. RU 2084238 C1, 20.07.1997. RU 2320364 C1, 27.03.2008. RU 2250775 C1, 27.04.2005. US 4815446 A, 28.03.1989. US 2008124308 A1, 29.05.2008. МЕШАЛКИН Ю.П. и др. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии (обзор)// Журнал Сибирского Федерального Университета, (см. прод.)

Адрес для переписки:

125502, Москва, ул. Лавочкина, 50, корп. 1,
кв. 24, Н.Л.Цетович

(72) Автор(ы):

Лешков Сергей Юрьевич (RU),
Вихриева Нина Сергеевна (RU),
Кречетов Сергей Петрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Лешков Сергей Юрьевич (RU),
Вихриева Нина Сергеевна (RU)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ИХ МЕТАСТАЗОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано при лечении пациентов с солидными опухолями. Для этого за 1-2 суток до начала химиотерапевтических процедур пациенту внутривенно вводят в дозе 0,5-10·10⁶ клеток/кг препарат мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, нагруженных наночастицами перфторуглеродов, полученных путем инкубации в среде, содержащей

фармацевтически приемлемую водную наноэмульсию перфторуглеродов с диаметром частиц не более 300 нм. Затем осуществляют проведение химиотерапевтических процедур на фоне дыхания газовой смесью, обогащенной кислородом, при нормальном или повышенном давлении. Способ обеспечивает эффективное подавление роста и уменьшение размеров опухоли, в т.ч. за счет повышения чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам. 8 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

Биология 3 (2008, 1), стр.260-266. GUNDERSEN SI, et al. Hemoglobin-based oxygen carrier enhanced tumor oxygenation: a novel strategy for cancer therapy, Biotechnol Prog. 2008 Nov-Dec; 24(6):1353-64, реферат.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

- (51) Int. Cl.
A61N 5/10 (2006.01)
A61N 5/067 (2006.01)
A61M 16/12 (2006.01)
A61K 31/02 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010109034/14, 12.03.2010**

(24) Effective date for property rights:
12.03.2010

Priority:

(22) Date of filing: **12.03.2010**

(45) Date of publication: **27.12.2011 Bull. 36**

Mail address:

125502, Moskva, ul. Lavochkina, 50, korp. 1, kv. 24, N.L.Tsetovich

(72) Inventor(s):

**Leshkov Sergej Jur'evich (RU),
Vikhrieva Nina Sergeevna (RU),
Krechetov Sergej Petrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Leshkov Sergej Jur'evich (RU),
Vikhrieva Nina Sergeevna (RU)**

(54) METHOD OF TREATING SOLID MALIGNANT GROWTHS AND THEIR METASTASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to oncology, also can be used in treating patients with solid tumours. For this purpose, 1-2 days prior to the initiation of chemotherapeutic procedures, a preparation of marrow mesenchymal stem cells coated with perfluorocarbon nanoparticles produced by incubation in a medium containing a pharmaceutically acceptable aqueous perfluorocarbon

nanoemulsion of a particle diameter 300 nm and less is introduced to a patient intravenously in dose 0.5-10·10⁶ cell/kg. Then the chemotherapeutic procedures follow with underlying oxygenated gas mixture inhalations at normal or high pressure.

EFFECT: method provides effective growth inhibition and reduced tumour size, including ensured by increasing tumour cell sensitivity to chemopreparations.

9 cl, 4 ex

RU 2 437 692 C2

RU 2 437 692 C2

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и касается способа лечения солидных опухолей различной локализации и их метастазов с использованием различного вида противоопухолевых процедур, преимущественно химиотерапевтических.

Способ может применяться для лечения неоперабельных солидных опухолей центральной нервной системы, органов желудочно-кишечного тракта, органов выделительной системы, репродуктивных органов, молочной железы, головы и шеи, легких и др., а также снижения метастазирования после хирургического лечения солидных опухолей в составе адъювантной терапии.

Хорошо известны широко применяемые в онкологической практике консервативные способы лечения солидных опухолей - лучевой, химиотерапевтический и фотодинамический. Однако все они имеют невысокую избирательность действия по отношению к опухолевой ткани и характеризуются выраженными побочными эффектами, даже при локальном применении.

Одним из факторов, способствующих повышению чувствительности солидных опухолей к воздействию терапевтических противоопухолевых процедур, является повышение содержания в опухолях кислорода.

Известны, например, способы повышения эффективности противоопухолевой терапии при проведении ее на фоне дыхания чистым кислородом или карбогеном при нормальных или гипербарических условиях в случае химиотерапии, лучевой терапии, фотодинамической терапии (US 7338670, 04.03.2008).

Недостатком таких способов является невысокая эффективность оксигенации опухоли в силу малого просвета формирующихся в ней микрокапилляров и невозможности циркуляции в них эритроцитов, а также повышенная оксигенация всех тканей организма, что обуславливает усиление побочных эффектов.

Известен способ улучшения доставки кислорода по мелким капиллярам солидных опухолей, характеризующимся низкой доступностью для эритроцитов, за счет увеличения кислородной емкости внеклеточной части крови (плазмы) путем инфузии перед проведением химиотерапии, лучевой терапии или фотодинамической терапии кровезаменителей с газотранспортной функцией в виде фармацевтически приемлемых микроэмульсий перфторуглеродов (US 5567765, 22.10.1996) или на основе полимерного гемоглобина (US 20090169591, 02.07.2009).

Недостатками применения кровезаменителей с газотранспортной функцией является повышение содержания кислорода во всех тканях организма при усилении побочных эффектов, а также наличие системного сосудосуживающего действия из-за используемых высоких доз кровезаменителей за счет связывания окиси азота (NO), которое уменьшает целевой оксигенирующий эффект вследствие снижения периферического кровотока.

Известен способ ввода насыщенной кислородом микроэмульсии перфторуглеродов непосредственно в гипоксическую зону опухоли с целью локальной оксигенации опухоли для повышения эффективности лучевой терапии (US 4781676, 01.11.1988).

Известный способ характеризуется ограниченными возможностями применения, т.к. инъекции возможны только в случае достижения опухолью размеров, позволяющих провести ее четкую локализацию, а также при курабельном расположении опухоли.

Для устранения побочных системных эффектов противоопухолевой терапии известны способы, в которых используются несущие распознающий элемент системы доставки в опухолевую ткань химиотерапевтических или сенсibiliзирующих веществ. (Friedman M, Ståhl S. Engineered affinity proteins for tumour-targeting

applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009 May; 53(Pt 1):1-29).

Однако успех, достигнутый в области создания вводимых в системный кровоток опухолеспецифических систем доставки лекарственных веществ, носит ограниченный характер в силу необходимости преодоления гистогематического барьера между кровью и тканью, в котором на уровне эндотелиальной выстилки сосудов теряется выраженность специфических маркеров опухоли. Как следствие, при использовании внутривенного введения систем доставки лекарственных веществ *in vivo*, хотя и наблюдается повышение противоопухолевого эффекта за счет улучшения поступления цитотоксических лекарственных веществ в опухолевую ткань, но происходит и их неизбежное поступление практически во все ткани. Такое увеличение поступления этих веществ в другие ткани приводит к сопутствующему усилению побочных эффектов.

Таким образом, описанные выше способы повышения эффективности противоопухолевой терапии характеризуются вместе с положительными эффектами и одновременным усилением выраженности побочных эффектов в силу системного применения используемых средств и недостаточной специфичности используемых систем доставки.

Известен способ, в котором для повышения специфичности накопления в опухоли цитотоксических терапевтических агентов используется способность мезенхимальных и других стволовых клеток проникать через гистогематические барьеры и избирательно накапливаться в опухолевой ткани (US 20070264231, 15.11.2007).

Способ предусматривает внутривенное введение трансдуцированных лигандом, индуцирующим апоптоз с участием фактора некроза опухоли, клеток разных типов, в том числе мезенхимных стволовых клеток для лечения опухолей, в частности лимфомы и рака молочной железы.

Недостатком описанного способа является то, что в нем используются клетки, генетически модифицированные для продуцирования цитотоксических факторов. Это приводит к высокой вероятности озлокачествления используемых клеток как следствия генетической модификации. Кроме того, процедура получения генетически модифицированных клеток является трудоемкой и дорогостоящей.

При этом в настоящее время неизвестны публикации по использованию мезенхимальных стволовых клеток, нагруженных лекарственными субстанциями или содержащими их системами доставки, как лечебного фактора в противоопухолевой терапии.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является способ лечения солидных злокачественных новообразований, который предусматривает проведение инфузии кровезаменителя с газотранспортной функцией водной наноэмульсии перфторуглеродов или производных гемоглобина и проведение химиотерапевтических процедур на фоне дыхания чистым кислородом при нормальном или повышенном давлении (Hochberg F, Prados M, Russell C, Weissman D, Evans R, Cook P, Burton G, Eisenberg PD, Valenzuela R, Verkh L. Treatment of recurrent malignant glioma with BCNU-fluosol and oxygen inhalation. A phase I-II study. *J Neurooncol*. 1997 Mar; 32(1):45-55).

Основным недостатком способа является системное применение как основного противоопухолевого химиотерапевтического препарата, так и вспомогательных средств (инфузия наноэмульсией перфторуглеродов, обогащение вдыхаемого воздуха кислородом). Это приводит к повышенной токсикологической нагрузке не только на опухолевые ткани, но и на весь организм пациента в целом и обуславливает повышенную вероятность проявления нежелательных побочных эффектов.

В связи с изложенным задачей настоящего изобретения является разработка нового способа противоопухолевой терапии, сочетающего в себе повышение эффективности противоопухолевого воздействия без заметного повышения уровня отрицательных побочных эффектов за счет адресного воздействия на опухоль.

5 Технический результат изобретения заключается в эффективном подавлении роста и уменьшении размеров опухоли за счет введение пациенту препарата нагруженных наночастицами перфторуглеродов мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, накапливающихся в опухоли и доставляющих в нее вещества, повышенное
10 содержания которых в опухолевой ткани приводит к росту чувствительности опухолевых клеток к основному химиотерапевтическому воздействию в условиях повышенной оксигенации.

Для достижения указанного технического результата предложен способ лечения
15 солидных злокачественных новообразований, предусматривающий проведение пациенту инфузии кровезаменителя с газотранспортной функцией на основе фармацевтически приемлемой водной наноэмульсии перфторуглеродов или производных гемоглобина и проведение химиотерапевтических процедур на фоне дыхания газовой смесью, обогащенной кислородом, при нормальном или
20 повышенном давлении, при этом за 1-2 суток до начала процедур пациенту внутривенно вводят в дозе $0,5-10 \cdot 10^6$ клеток/кг препарат мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, нагруженных наночастицами перфторуглеродов, полученных путем инкубации в среде, содержащей фармацевтически приемлемую
25 водную наноэмульсию перфторуглеродов с диаметром частиц не более 300 нм.

Предпочтительно, чтобы водная наноэмульсия перфторуглеродов содержала 10-40 об.% перфторуглеродной фазы.

Предпочтительно, чтобы перфторуглеродная фаза представляла собой один перфторуглерод или их смесь с разными температурами кипения из ряда
30 перфтордекалин, перфтороктилбромид, перфторметилциклогексилпиперидин, перфтортрипропиламин, перфтортрибутиламин.

Предпочтительно, чтобы водная наноэмульсия перфторуглеродов содержала в качестве эмульгатора липиды в количестве 0,5-10% по массе или блок-сополимеры
35 полиэтиленоксида-полипропиленоксида в количестве 0,2-20% по массе или их смесь.

Проведение пациенту инфузии кровезаменителя с газотранспортной функцией на основе фармацевтически приемлемой водной наноэмульсии перфторуглеродов или производных гемоглобина предпочтительно проводить с одновременным введением
40 средств, обладающих периферическим сосудорасширяющим действием.

Это позволит увеличить доставку кислорода по мелким капиллярам солидных
40 опухолей, обладающих низкой доступностью для эритроцитов, увеличить кислородную емкость внеклеточной части крови и улучшить микроциркуляцию в опухоли и прилегающих тканях.

Предпочтительно в качестве средств, обладающих периферическим
45 сосудорасширяющим действием, использовать производные никотиновой кислоты или ингибиторы фосфодиэстеразы.

Предпочтительно в качестве кровезаменителя использовать эмульсии типа «Перфторан®» или «Охугент®» или «Fluosol-DA®».

50 При этом после инфузии кровезаменителя и за 5-30 минут до начала химиотерапевтических процедур пациента переводят на дыхание воздухом, обогащенным кислородом. Это может быть чистый кислород или карбоген при нормальном или повышенном давлении. Время процедуры - 0,5-8 часов.

Предпочтительно, для проведения химиотерапевтических процедур использовать зависимые от кислорода противоопухолевые препараты: блеомицин, прокарбазин, актиномицин D и винкристин.

5 Другим вариантом для проведения химиотерапевтических процедур является использование независимых или слабозависимых от кислорода противоопухолевых препаратов: митомицин C, доксорубин, фторурацил, метотрексат, кармустин, циклофосфамид.

Приведенный список противоопухолевых препаратов не ограничивает
10 возможность использования других препаратов с противоопухолевой активностью.

Для приготовления препаратов стволовых мезенхимальных клеток, содержащих депо веществ, обладающих противоопухолевым действием или способствующих
15 противоопухолевому действию факторов химиотерапевтических процедур, могут быть использованы фармацевтически приемлемые вещества, способствующие ускорению (катализу) реакций образования из эндогенных или экзогенных субстратов продуктов, обладающие необходимыми цитотоксическими или регуляторными свойствами.

Очевидно, что в силу наличия продолжительного периода между введением
20 нагруженных стволовых клеток в кровеносное русло и их накоплением в опухоли используемые вещества должны выбираться из неметаболизируемых или слабо метаболизируемых фармацевтически приемлемых веществ, которые необходимо включать в специальные транспортные формы с отсроченным высвобождением (ретардные формы). Без включения в транспортные формы возможно использование
25 веществ, плохо растворимых в воде или несмешивающихся с водой, которые будут присутствовать в клетке в виде постепенно разрушающихся частичек или капелек микро- или наноразмеров.

Как показали многочисленные исследования авторов, возможно и эффективно
30 использование в противоопухолевой терапии мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, нагруженных фармацевтически приемлемой наноэмульсией перфторуглеродов. Привлекательность использования перфторуглеродов для решения поставленной задачи определяется:

35 - наличием биологической активности, характеризующейся проявлениями, способствующими повышению цитотоксического действия химиотерапевтических, радиотерапевтических или фотодинамических процедур;

40 - способностью к созданию в месте накопления наноэмульсии условий для увеличения содержания NO и S-нитрозилов, приводящего к местному сосудорасширяющему эффекту;

- наличием промышленно выпускаемых водных медицинских наноэмульсий на их основе для инфузионного применения, делающим возможным их применения в рамках медицинских технологий.

Используемая наноэмульсия перфторуглеродов должна иметь диаметр частиц не
45 более 300 нм, предпочтительно 30-100 нм. Частицы указанного размера в отличие от более крупных частиц подвергаются эндоцитозу практически любым типом клеток, что обеспечивает эффективную загрузку стволовых клеток каплями наноэмульсий. Сформулированное требование к размерам загружаемых частиц применимо как в
50 случае использования суспензий и эмульсий, плохо растворимых в воде, или несмешивающихся с водой биологически активных веществ как в чистом виде, так и в случае использования дисперсий любых корпускулярных систем доставки биологически активных веществ. Приведенным требованиям по дисперсности

удовлетворяют все наноэмульсий перфторуглеродов, разрабатываемые в качестве кровезаменителей с газотранспортной функцией, например, «Перфторан[®]», «Oxygent[®]», «Fluosol-DA[®]».

5 Требования по клинически эффективной наноэмульсий перфторуглеродов ограничивает минимальное содержание в ней перфторуглеродов - 10% по объему. Существенное увеличение технологических затрат на производство нанодисперсной эмульсии с содержанием перфторуглеродов более 40% по объему определяет ограничение по содержанию перфторуглеродов сверху.

10 В наноэмульсии перфторуглеродов может быть использован один перфторуглерод или, для увеличения стабильности эмульсии, смесь нескольких перфторуглеродов с разными температурами кипения. При этом перфторуглероды выбирают как из ряда уже используемых в медицинской практике: перфтор декалина, перфтороктилбромида, 15 перфторметилциклогексилпиперидина, перфтортрипропиламина, перфтортрибутиламина, так и из ряда других фармацевтически приемлемых перфторуглеродов. В силу более выраженной способности влиять на клеточный метаболизм более привлекательным является использование циклических и гетероциклических перфторуглеродов, в частности входящих в состав 20 кровезаменителей с газотранспортной функцией «Перфторан[®]» и «Fluosol-DA[®]».

Исходя из практического опыта разработки кровезаменителей с газотранспортной функцией для стабилизации наноэмульсий перфторуглеродов в качестве эмульгатора 25 могут быть использованы фосфолипиды с содержанием 0,5-10% по массе или блок-сополимеры полиэтиленоксида-полипропиленоксида с содержанием 0,2-20% по массе или их смесь. Поскольку использование блок-сополимеров полиэтиленоксида-полипропиленоксида сопровождается замедлением мембранозависимых процессов и внутриклеточного транспорта с участием частиц, на поверхности которых находится эти полимеры, то предпочтительным является использование в заявляемом способе 30 наноэмульсии перфторуглеродов типа «Перфторан[®]», в которой используется только такой эмульгатор.

Для приготовления используемых в изобретении препаратов стволовых клеток могут быть использованы стволовые клетки, получаемые в рамках 35 зарегистрированных медицинских технологий или выпускаемые как уже готовые медицинские препараты. Примерами последних являются препараты мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, выпускаемых в США фирмами Stemedica Cell Technologies, Inc. и Osiris Therapeutics, Inc.

Предлагаемый способ реализуют следующим образом.

40 1. Готовят препараты стволовых мезенхимальных клеток, содержащие депо веществ, обладающих противоопухолевым действием или способствующих противоопухолевому действию факторов химиотерапевтических процедур.

Получение стволовых клеток, нагруженных наночастичками перфторуглеродов, 45 осуществляют в результате инкубации в среде, содержащей наноэмульсию перфторуглеродов из расчета содержания перфторуглеродов 1-100 мг/мл. Для инкубации используют среду, оптимальную для культивирования данного типа клеток, но без добавления сыворотки. Содержание клеток в инкубационной среде составляет 2-10·10⁶ клеток/мл. Время инкубации составляет от нескольких часов до 50 суток. Точное время инкубации, так же как содержание наноэмульсии и клеток в инкубационной среде, определяется особенностями используемых клеток и наноэмульсии перфторуглеродов. По завершению инкубации клетки дважды отмывают двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS)

от непоглощенной эмульсии центрифугированием при 400 g 7 минут. Для инъекций готовят суспензию отмытых клеток в физиологическом растворе с концентрацией $5 \cdot 10 \cdot 10^6$ клеток/мл.

2. Вводят подготовленные описанным образом клетки в дозе $0,5 \cdot 10 \cdot 10^6$ клеток/кг внутривенно за 1-2 суток до проведения противоопухолевой терапии.

3. До начала проведения противоопухолевых (химиотерапевтических) процедур проводят пациенту инфузию кровезаменителя с газотранспортной функцией, способствующего увеличению кислородной емкости внеклеточной части крови (плазмы) для увеличения содержания в опухоли ткани кислорода.

Для инфузии кровезаменителя с газотранспортной функцией используют фармацевтически приемлемую водную наноэмульсию перфторуглеродов типа медицинских эмульсий ПФУ «Перфторан®» «Охугент®» и «Fluosol-DA®».

Наноэмульсию перфторуглеродов вводят в дозе 1-3 0 мл/кг ($40 \cdot 1200$ мл/м²) исходя из требований к клиническому применению указанных наноэмульсий.

Практически все требования к физико-химическим свойствам наноэмульсий перфторуглеродов, сформулированные выше при описании загрузки наночастицами перфторуглеродов стволовых клеток, применимы для газотранспортных наноэмульсий при их использовании по прямому назначению. Предпочтительным является использование наноэмульсий перфторуглеродов с максимальной дисперсностью, поскольку это обеспечивает большую эффективность протекания плазмы по микрокапиллярам и, как следствие, большую эффективность оксигенации тканей с плохой васкуляризацией.

Для инфузии с целью увеличения кислородной емкости внеклеточной части крови (плазмы) также могут быть использованы кровезаменители с газотранспортной функцией в виде растворов или суспензий наноинкапсулированных форм фармацевтически приемлемых или поперечно-сшитого гемоглобина, или полимерного гемоглобина, или конъюгированного гемоглобина.

4. Вместе с инфузией наноэмульсии перфторуглеродов пациенту могут вводить препарат, обладающий периферическим сосудорасширяющим действием. Его введение направлено на улучшение микроциркуляции в околоопухолевой ткани за пределами области интенсификации обмена NO, обусловленной эффектом накопления стволовых клеток, нагруженных перфторуглеродов. Потребность в дополнительном ведении сосудорасширяющих средств обусловлена необходимостью устранения системного сосудосуживающего действия кровезаменителей с газотранспортной функцией, в частности, при введении наноэмульсии перфторуглеродов в дозе, приводящей к содержанию перфторуглеродов в крови более 0,5% масса/объем. В качестве препаратов, обладающих периферическим сосудорасширяющим действием, могут использоваться производные никотиновой кислоты; ингибиторы фосфодиэстеразы; препараты, способствующие увеличению синтеза окиси азота, и другие.

5. За 5-30 минут до начала противоопухолевых (химиотерапевтических) процедур и на время их проведения пациента переводят на дыхание воздухом, обогащенным кислородом, чистым кислородом или карбогеном при нормальном или повышенном давлении. Суммарная продолжительность дыхания в условиях повышенного содержания кислорода составляет 0,5-8 часов в соответствии с нормами проведения простой и гипербарической кислородной терапии, а также особенностями проводимых противоопухолевых терапевтических процедур.

6. Через указанное время после начала дыхания в условиях повышенного содержания кислорода в соответствии с используемым протоколом лечения

диагностированной солидной опухоли пациенту вводят противоопухолевое химиотерапевтическое средство.

Образующие описанный выше способ приемы повторяются с периодичностью применения химиотерапевтических процедур в соответствии с используемым протоколом лечения диагностированной солидной опухоли.

Использование локального повышения содержания кислорода в сочетании с повышенным уровнем зависимых от кислорода цитотоксических факторов в опухоли само по себе создает локальную цитотоксическую нагрузку в опухолевой ткани. Это имеет следствием повышение эффективности не только зависимых от кислорода противоопухолевых препаратов (блеомицин, прокарбазин, актиномицин D, винкристин). За счет повышенной суммарной цитотоксической нагрузки усиливается противоопухолевое действие химиотерапевтических препаратов, являющихся независимыми или слабозависимыми от кислорода (митомидин С, доксорубин, фторурацил, метотрексат, кармустин и др. алкилирующие препараты).

Использование заявляемого способа приводит к повышению чувствительности клеток опухоли к воздействию химиотерапевтических процедур при лечении солидных опухолей различной локализации, а также может быть полезно при профилактике метастазирования после оперативного лечения этих опухолей с использованием химиотерапевтических процедур в качестве адьювантных.

Следующие примеры иллюстрируют предложенный способ, не ограничивая его по существу.

Пример 1.

Приготовление препарата мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека путем их нагрузки наноэмульсией перфторуглеродов *in vitro*.

В экспериментах использовали препараты мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, производимые фирмой Stemedica Cell Technologies, Inc. (США). Клетки хранили в жидком азоте и размораживали перед экспериментом в соответствии с протоколом, предоставленным фирмой-производителем. После размораживания клетки дважды отмывали двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса от среды хранения центрифугированием при 400 g 7 минут и помещали в среду, получаемую добавлением к культуральной среде RPMI наноэмульсии перфторуглеродов «Перфторан®» в количестве 0, 5, 10, 20, 50, 100%. Содержание клеток в инкубационной среде составляло 5-10⁶ клеток/мл. В указанных условиях клетки инкубировали 2,0, 8,0, 12 часов. По завершению инкубации клетки дважды отмывали двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса от непоглощенной эмульсии центрифугированием при 400 g 7 минут. Перед последним центрифугированием в полученной суспензии определяли долю жизнеспособных клеток с использованием окраски трипановым синим.

Для определения содержания перфтордекалина использовали осадок отмытых клеток. Из клеток перфторуглероды экстрагировали ресуспензированием в 0.5 мл эмульсии, содержащей 20% по объему фторуглерода C₆F₁₃CH=HCF₁₃C₆, характеризующегося высокой чистотой и длительным временем удерживания на хроматографической колонке, и 1% Triton X-100. После 2-часовой экстракции при комнатной температуре эмульсия разрушалась добавлением равного объема этанола. Каплю отделившихся фторуглеродов осаждали центрифугированием и несколько раз отмывали водой, после чего использовали для хроматографического анализа. Количественное определение перфтордекалина в пробах проводили на хроматографе «Chrom-5» со стеклянной колонкой (2 м×2.5 м), заполненной 25% OV-1 на Gas Chrom Q,

80-100 меш. Детектор - пламенно-ионизационный газ-носитель - азот, давление на выходе колонки - 0.6 атм, температуры дозатора, термостата и детектора - 160, 60, 120°C соответственно.

5 Согласно полученным результатам накопление перфторуглеродов в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека существенно замедляется между 8 и 12 часами инкубации. При этом жизнеспособность клеток при содержании наноэмульсии перфторуглеродов в инкубационной среде не более 50% 10 меняется незначительно. Значительное изменение жизнеспособности выявлено лишь при инкубации мезенхимальных стволовых клеток человека в 100% наноэмульсии перфторуглеродов в течение 12 часов.

Пример 2.

15 Определение накопления мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов, в перевиваемой опухоли *in vivo*.

В экспериментах использовали самок бестимусных мышей *nude* в возрасте 4-6 недель. Животных содержали при цикле освещения/темноты по 12 часов в условиях 20 свободного доступа к стерильной воде и стерильному корму для грызунов.

20 Непосредственно перед инокуляцией опухоли животным имплантировали под кожу межлопаточной области пеллеты 60-дневного высвобождения с 1,5 мг эстродиола (Innovative Research of America, США) с использованием прецизионного троакара. Клетки аденокарциномы человека MCF-7 в количестве $5 \cdot 10^6$ инокулировали в 0,2 мл культуральной среды подкожно в грудную жировую складку. Два раза в 25 неделю животных обследовали с измерением максимального (а) и минимального (b) размеров образующихся опухолей и рассчитывали их объем по формуле $V=0,4 \cdot a \cdot b^2$. После достижения среднего размера опухолей 500 мм^3 проводили эксперимент по изучению накопления в опухолевой ткани мезенхимальных стволовых клеток, нагруженные наноэмульсией ПФУ.

30 Для изучения накопления в опухолевой ткани мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, нагруженные наноэмульсией перфторуглеродов «Перфторан®», получали по методике, описанной в примере 1 в условиях замещения 50% 35 культуральной среды наноэмульсией и инкубации в течение 12 часов. После двух отмывок двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса от непоглощенной эмульсии центрифугированием при 400 g 7 минут клетки суспензировали в физиологическом растворе из расчета $10 \cdot 10^6$ клеток/мл. Полученную суспензию вводили опытной группе животных в хвостовую вену в дозе 1 мл/кг. 40 Контрольной группе животных вводили в хвостовую вену такое же количество разведенной в 20 раз физиологическим раствором наноэмульсии «Перфторан®». Через 6 часов и на 1, 2, 3 сутки забивали по три животных в опытной и контрольной группах. У забитых животных вырезали опухоль, тщательно удаляя прилегающие 45 ткани, а также печень, селезенку и кусочки массой около 0,3 г из бедренной мышцы и брюшной стенки в районе паха. Извлеченный биоматериал подсушивали, без усилия зажимая между листами фильтровальной бумаги, взвешивали, помещали во флаконы с герметично закрывающимися крышками и хранили в замороженном состоянии до проведения пробоподготовки для хроматографического определения 50 перфторуглеродов.

Для извлечение перфторуглеродов к отобраным образцам после размораживания добавляли по 1 мл эмульсии, содержащей 20% по объему фторуглерода $C_6F_{13}CH=$ $HC_6F_{13}C_6$ и 1% Triton X-100. Полученные пробы гомогенизировали 1 минуту

при 20000 об/минуту на диспергаторе ULTRA-TURRAX[®] T 10 basic2 (IKA[®] Werke GmbH & Co., Germany). После 2-часовой экстракции при комнатной температуре из каждой пробы отбиралось по 0,5 мл и отобранная эмульсия разрушалась добавлением
5 равного объема этанола. Каплю отделившихся фторуглеродов осаждали центрифугированием и несколько раз отмывали водой, после чего отделившуюся смесь ПФУ использовали для хроматографического анализа, который проводили, как описано в примере 1.

Согласно полученным результатам при введении мышам с привитой солидной
10 опухолью аденокарциномы человека MCF-7 мезенхимальных стволовых клеток человека, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов, максимальное удельное содержание перфторуглеродов наблюдается в опухоли и достигается на 2 сутки, практически не меняясь к 3 суткам.

При этом удельное содержание перфторуглеродов в других исследованных
15 тканях (печени, селезенке, мышечной ткани и тканях брюшной стенки) оказывается существенно меньше. В случае самостоятельного введения наноэмульсии перфторуглеродов в кровеносное русло уже через 6 часов наблюдается повышенное удельное содержание перфторуглеродов в печени и несколько меньшее в селезенке по
20 сравнению с мышечной тканью, тканями брюшной стенки и опухолевой тканью. Отмеченные различия несколько усиливаются к 1 суткам и практически не меняются в дальнейшем.

Полученные данные свидетельствуют об избирательном накоплении
25 мезенхимальных стволовых клеток в опухолевой ткани и о возможности использования их для накопления в опухоли медленно выводящихся форм лекарственных средств.

Пример 3.

Изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток, нагруженных наноэмульсией
30 перфторуглеродов, на эффективность противоопухолевой терапии в условиях повышенной оксигенации в эксперименте на мышах.

В экспериментах использовали самок бестимусных мышей nude, которым прививали опухоль аденокарциномы человека MCF-7, как описано в примере 2. Мезенхимальные стволовые клетки, нагруженные наноэмульсией перфторуглеродов
35 «Перфторан[®]», получали по методике, описанной в примере 1, в условиях замещения 50% культуральной среды наноэмульсией и инкубации в течение 12 часов. После двух отмывок двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса от непоглощенной эмульсии центрифугированием при 400 g 7 минут клетки
40 суспензировали в физиологическом растворе из расчета $10 \cdot 10^6$ клеток/мл.

После достижения среднего объема опухолей 50 мм^3 всем экспериментальным животным, за исключением одной контрольной группы, в качестве
45 химиотерапевтической процедуры три раза с перерывом в неделю внутрибрюшинно вводили 15 мг/кг 5-фторурацила.

Первой опытной группе животных каждый раз за двое суток до инъекции 5-
фторурацила в хвостовую вену вводили приготовленную, как описано выше, суспензию мезенхимальных стволовых клеток, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов в дозе 1 мл/кг. За десять минут до инъекции 5-фторурацила
50 животных этой группы помещали в камеру с карбогеном (95% кислорода и 5% углекислого газа), в которой они находились еще час после инъекции.

Вторая опытная группа отличалась от первой внутривенным введением такого же количества мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, не нагруженных

наноэмульсией перфторуглеродов, которые лишь дважды отмывались от культуральной среды двукратным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса, как описано выше. Животные дышали обогащенной кислородом газовой смесью.

5 В третьей опытной группе инъекция 5-фторурацила сопровождалась переводом животных на дыхание карбогеном по описанной выше схеме без введения каких-либо дополнительных препаратов.

Животным четвертой опытной группы вводили только 5-фторурацил без введения клеточных препаратов и дыхания обогащенной кислородом газовой смесью.

Животные контрольной группы не подвергались каким-либо терапевтическим воздействиям.

15 Оценка противоопухолевого эффекта проведенных процедур была проведена по результатам измерений размеров опухолей через два месяца после первой инъекции 5-фторурацила. Наименьший размер имели опухоли у животных первой группы, которым дополнительно вводились мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, нагруженные наноэмульсией перфторуглеродов. У животных второй группы, получавших интактные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, и животных третьей группы, которым не вводилось клеточных препаратов, но которые дышали обогащенной кислородом газовой смесью, как и первые две группы, размеры опухолей были заметно больше и близки между собой. Животные четвертой группы, которым вводился только 5-фторурацил без введения клеточных препаратов и дыхания обогащенной кислородом газовой смесью, имели еще более крупные опухоли. Самые крупные опухоли имели животные контрольной группы, не подвергавшиеся каким-либо терапевтическим воздействиям.

25 Таким образом, описанный эксперимент демонстрирует положительный терапевтический эффект мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов, при лечении солидных опухолей в условиях повышенной оксигенации.

Пример 4.

Изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов, на эффективность противоопухолевой терапии в условиях 35 повышенной оксигенации в эксперименте на мышцах при наличии метастазов.

В экспериментах использовали мышей линии C57B 1/6 обоего пола в возрасте 2-3 месяца. Животных содержали при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (сбалансированный по составу корм для лабораторных крыс и мышей). 40 Всем экспериментальным животным производили трансплантацию солидной опухоли - аденокарциномы легких Льюиса, - внутримышечным введением в мышцу левого бедра по $5 \cdot 10^6$ клеток в 0,1 мл физиологического раствора.

Первой группе экспериментальных животных через семь суток в хвостовую вену вводили приготовленную, как описано в примерах 2 и 3, суспензию мезенхимальных 45 стволовых клеток костного мозга, нагруженных наноэмульсией перфторуглеродов в дозе 1 мл/кг. На 9 сутки животным этой группы в неповрежденную хвостовую вену вводили наноэмульсию перфторуглеродов «Перфторан» в дозе 30 мл/кг и помещали их в камеру с карбогеном (95% кислорода и 5% углекислого газа). Затем через 30 50 минут животным внутрибрюшинно вводили циклофосфан в дозе 100 мг/кг в виде 1% раствора в физиологическом растворе и оставляли их в камере с карбогеном еще на 1 час.

Вторая группа экспериментальных животных отличалась от первой тем, что

входящим в нее особям не вводили наноэмульсию перфторуглеродов.

Третьей группе не вводили наноэмульсию перфторуглеродов и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга при сохранении режима нахождения в камере с карбогеном и введения циклофосфана, как описано для первой группы.

Контрольная группа животных не подвергалась каким-либо терапевтическим воздействиям.

Каждая экспериментальная группа включала по 10 животных. На 25-е сутки животных подвергали декапитации, задние конечности отделяли и по разности их веса определяли массу опухоли. Для выявления метастазов извлекали легкие и фиксировали их в 10% формалине, а затем под бинокулярной лупой оценивали наличие метастатических узлов. Противоопухолевый и антиметастатический эффекты процедур оценивали по снижению массы опухоли и среднему количеству метастазов в легких.

Результаты проведенных экспериментов показали, что в опытных группах сформировались опухоли, меньшие по массе при сравнении с контролем. Так, средняя масса опухоли у животных первой группы была на 54%, во второй - на 37% и в третьей - на 24% меньше средней массы опухоли у животных контрольной группы.

При этом метастазы в легких были выявлены у 2 животных в первой, у 5 - во второй, 7 - в третьей группах и у всех животных контрольной группы.

Приведенные данные подтверждают повышение эффективности противоопухолевых химиотерапевтических процедур при применении заявляемого способа. Это выражается как в большей степени подавления развития солидной опухоли, так и в меньшем количестве формирующихся метастазов.

Формула изобретения

1. Способ лечения солидных злокачественных новообразований и их метастазов, включающий проведение пациенту инфузии кровезаменителя с газотранспортной функцией на основе фармацевтически приемлемой водной наноэмульсии перфторуглеродов или производных гемоглобина и проведение химиотерапевтических процедур на фоне дыхания газовой смесью, обогащенной кислородом, при нормальном или повышенном давлении, отличающийся тем, что за 1-2 суток до начала химиотерапевтических процедур пациенту внутривенно вводят в дозе $0,5-10 \cdot 10^6$ клеток/кг препарат мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, нагруженных наночастицами перфторуглеродов, полученных путем инкубации в среде, содержащей фармацевтически приемлемую водную наноэмульсию перфторуглеродов с диаметром частиц не более 300 нм.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что водная наноэмульсия перфторуглеродов содержит 10-40 об.% перфторуглеродной фазы.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что перфторуглеродная фаза представляет собой один перфторуглерод или их смесь с разными температурами кипения из ряда перфтордекалин, перфтороктилбромид, перфторметилциклогексилпиперидин, перфтортрипропиламин, перфтортрибутиламин.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что водная наноэмульсия перфторуглеродов содержит в качестве эмульгатора липиды в количестве 0,5-10% по массе, или блоксополимеры полиэтиленоксида-полипропиленоксида в количестве 0,2-20% по массе, или их смесь.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно вместе с инфузией кровезаменителя пациенту вводят средства, обладающие периферическим

сосудорасширяющим действием.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что в качестве средств, обладающих периферическим сосудорасширяющим действием используют производные никотиновой кислоты или ингибиторы фосфодиэстеразы.

5 7. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве кровезаменителя используют эмульсии «Перфторан®», или «Охугент®», или «Fluosol-DA®».

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что для проведения химиотерапевтических процедур используют зависимые от кислорода противоопухолевые препараты
10 блеомецин, прокарбазин, актиномицин D, винкристин.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что для проведения химиотерапевтических процедур используют независимые или слабо зависимые от кислорода
15 противоопухолевые препараты циклофосфамид, митомицин C, доксорубицин, фторурацил, метотрексат, кармустин.

20

25

30

35

40

45

50