



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010143715/15, 21.04.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.04.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.04.2008 IT PD2008A000125;
08.10.2008 IT PD2008A000283

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2012 Бюл. № 15

(45) Опубликовано: 20.04.2016 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007014784 A2, 08.02.2007. S. Misra et al / Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan / The Journal of Biological Chemistry / 2003, Vol.278. Caroline Thalia Saouma / Synthesis strategies to improve the cytotoxicity of platinum-based cancer therapeutics / Undergraduate thesis / 2005, 78 pages. EP 008776 B1, 09.04.2003. RU (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 22.11.2010

(86) Заявка РСТ:
IB 2009/005309 (21.04.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/130564 (29.10.2009)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ",
пат.пов. А.В.Поликарпову

(72) Автор(ы):

КАМПИЗИ Моника (IT),
РЕНЬЕР Давиде (IT),
ПЬЕРИМАРЧИ Паскуале (IT),
СЕРАФИНО Анналючия (IT)

(73) Патентообладатель(и):

Фидия Фармачеутичи С.п.А. (IT)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, СВЯЗАННЫЕ С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ, В ЛЕЧЕНИИ НЕОПЛАЗИЙ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к биоконъюгатам для изготовления агента для лечения опухолевых патологий, состоящим из гиалуроновой кислоты, имеющей молекулярную массу в диапазоне от 30000 до $0,5 \times 10^6$ Да, ковалентно связанной через спейсер, выбранный

из бромбутанола или бромпропанола и который образует сложноэфирную связь с гиалуроновой кислотой, с противоопухолевым лекарственным средством, которое представляет собой доксорубин, со степенью замещения доксорубина по карбоксильной группе гиалуроновой кислоты от 3 до 20%, и к

фармацевтическим композициям, содержащим указанные биоконъюгаты. Группа изобретений обеспечивает повышение цитотоксической

активности против опухолевых клеток. 4 н. и 10 з.п. ф-лы, 15 пр., 15 ил.

(56) (продолжение):

2228757 С2, 13.11.2002. Крылов Н.Л. / Принципы экспертизы нетрудоспособности онкологических больных / Методический и практический материал, ГВКГ им. Н.Н. Бурденко / 2006.

R U 2 5 8 1 9 7 2 С 2

R U 2 5 8 1 9 7 2 С 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010143715/15, 21.04.2009**

(24) Effective date for property rights:
21.04.2009

Priority:

(30) Convention priority:
22.04.2008 IT PD2008A000125;
08.10.2008 IT PD2008A000283

(43) Application published: **27.05.2012** Bull. № 15

(45) Date of publication: **20.04.2016** Bull. № 11

(85) Commencement of national phase: **22.11.2010**

(86) PCT application:
IB 2009/005309 (21.04.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/130564 (29.10.2009)

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**KAMPIZI Monika (IT),
RENER Davide (IT),
PERIMARCHI Paskuale (IT),
SERAFINO Annaljuchija (IT)**

(73) Proprietor(s):

Fidija Farmaceutichi S.p.A. (IT)

(54) **THERAPEUTIC APPLICATION OF NEW PHARMACEUTICAL PREPARATIONS CONTAINING ANTINEOPLASTIC DRUGS, ASSOCIATED WITH HYALURONIC ACID, IN TREATING NEOPLASMS**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to chemical-pharmaceutical industry, namely to bioconjugates for producing agent for treating malignant pathologies, consisting of hyaluronic acid with molecular weight ranging from 30,000 to 0.5×10^6 Da covalently connected via spacer, selected from bromebutanol or bromopropanol and which forms ester

bond with hyaluronic acid, with anti-cancer drug, which represents doxorubicin, with degree of substitution doxorubicin at carboxyl group of hyaluronic acid from 3 to 20 %, and pharmaceutical compositions containing above bioconjugates.

EFFECT: higher cytotoxic activity against tumour cells.

14 cl, 15 ex, 15 dwg

Задача изобретения

В настоящем изобретении описано новое применение в области онкологии биоконъюгатов, полученных путем конъюгации между гиалуроновой кислотой (НА) и химиотерапевтическим продуктом (идентифицируемым далее под товарным знаком ONCOFID[®]), среди которых, в частности, можно привести иринотекан, доксорубицин, паклитаксел, цис-платин и 5-фторурацил (5-FU), в качестве агентов дифференцировки для лечения первичных опухолей и метастаза. В частности, биологическое поведение описано в отношении механизма действия, эффективности и устойчивости фармацевтических препаратов производного ONCOFID[®], растворимого в воде.

Более конкретно, изобретение относится к неожиданному биологическому и фармакологическому действию, продемонстрированному препаратами, основанными на ONCOFID-S (конъюгаты НА-SN38) и ONCOFID-D (конъюгаты НА-Доксорубицин), способствующему дифференцировке опухолевых клеток в направлении нетрансформированного фенотипа, по сравнению с референсным лекарственным средством иринотеканом (или СРТ11, активная форма которого представлена SN38) и доксорубицином.

Область изобретения

В течение нескольких последних лет все более растущее понимание жизненных процессов, которые определяют начало, развитие, распространение и имплантацию опухоли и ее метастазов, не только обеспечило исследователей возможностью изучения, синтеза и/или тестирования новых химических молекул в качестве новых противоопухолевых агентов, но также облегчило исследование и совершенствование новых способов терапии, которые позволяют преодолеть проблемы, связанные с токсичностью противоопухолевых лекарственных средств. Многочисленные лекарственные средства, обладающие противоопухолевой активностью, фактически, как правило, имеют ряд отрицательных свойств, таких как:

- низкая растворимость в воде, поскольку множество молекул представляют собой гидрофобные вещества, которые трудно вводить;
- низкая селективность в отношении опухолевых клеток и, как следствие, токсичность в отношении неканцерогенных клеток;
- множество нежелательных эффектов на системном уровне;
- малый период полувыведения из плазмы крови с сопутствующей необходимостью повторных введений;
- индукция резистентности к химиотерапевтическому лечению опухоли.

В дополнение к поиску все более эффективных новых активных действующих компонентов в терапии опухоли наука параллельно пытается использовать все возможные молекулы, антибластическая активность которых уже известна, улучшая их эффективность и пытаясь уменьшить отрицательные свойства, описанные выше.

Одна из наиболее широко используемых стратегий уменьшения собственной токсичности противоопухолевых лекарственных средств связана с возможностью направления активного действующего начала непосредственно и избирательно в отношении опухолевой клетки.

Предложен многообещающий подход путем химической конъюгации противоопухолевого лекарственного средства с группами, обеспечивающими активное нацеливание, которое путем специфического взаимодействия с рецепторными областями опухолевой клетки гарантирует высокую селективность лекарственного средства в опухолевых тканях. Отличающийся подход представляет собой связывание с макромолекулами (т.е. полимерами), которые путем обеспечения высокой молекулярной

массы обеспечивают большую аккумуляцию активного действующего начала в новообразованиях благодаря эффекту EPR (увеличенная проницаемость и задержка), т.е. аккумуляцию, связанную с проникновением через имеющий нарушение целостности эпителий сосудов, которые питают опухоль (пассивное нацеливание) с неадекватным
5 отведением лимфатической системой.

По прошествии многих лет множество противоопухолевых лекарственных средств, используемых в области онкологии, были химически модифицированы с получением пролекарств, терапевтически неактивные производные которых обладают активностью только *in vivo* благодаря процессам спонтанного гидролиза и/или ферментативных
10 разрушений, которые приводят к высвобождению активного действующего начала, таким образом увеличивая его терапевтическую эффективность.

Растворимость химиотерапевтических лекарственных средств в системе кровообращения представляет собой существенное условие для их фармакологического действия. Фактически, некоторые лекарственные средства, которые, как оказалось,
15 являются чрезвычайно активными в различных типах опухолей, такие как, например камптотецины, паклитаксел и алкалоиды, являющиеся производными барвинка, ввиду их низкой растворимости создают проблемы при их внутривенном введении (а для гормонов и антигормонов также при внутримышечном), которые могут лимитировать и ограничить их клиническое применение.

Ввиду вышеприведенных причин синтезировали новые химиотерапевтические лекарственные средства, которые созданы путем химического связывания (прямого или опосредованного при помощи вставки) между классическим лекарственным средством и так называемыми терапевтическими полимерами, которые, кроме того, что придают важные физико-химические свойства активному действующему началу
20 (такие как большая растворимость), способны обеспечить ему активное и/или пассивное нацеливание, увеличивая его эффективность. Эти терапевтические полимеры фактически могут действовать в качестве носителя лекарственного средства или они также могут демонстрировать собственную биологическую активность.

Среди этих полимеров, как оказалось, весьма многообещающим является применение гиалуриновой кислоты (НА), чьи благоприятные свойства делают ее подходящим
30 носителем для введения противоопухолевых агентов.

Новые биоконъюгаты НА и противоопухолевых лекарственных средств, идентифицированные под товарным знаком ONCOFID, известные в области техники (WO 2004/035629 и WO 2007/014784), обладают следующими свойствами:

35 - позволяют преодолеть проблему, связанную с собственной токсичностью лекарственного средства, поскольку непосредственно нацелены на опухолевую клетку, так как множество опухолевых фенотипов сверхэкспрессируют на своей поверхности рецептор CD-44, специфический для НА;

40 - увеличивают растворимость, поскольку продемонстрировано, что связывание липорастворимых лекарственных средств с сильногидрофильными молекулами, такими как НА, значительно увеличивает растворимость самого лекарственного средства в кровеносной системе;

- позволяют преодолеть проблему резистентности, вызванной классическими противоопухолевыми лекарственными средствами;

45 - обладают новыми физико-химическими свойствами (такими как, например, увеличение стабильности лекарственного средства и, таким образом, увеличение его пребывания в области опухоли).

SN-38 представляет собой активный метаболит иринотекана, являющегося

фармакологическим производным камптотецина, применение которого относится к лечению различных типов опухолей, таких как меланомы, рак молочной железы, опухоли яичников, желудка, легкого, головного мозга, поджелудочной железы и колоректальный рак. Это лекарственное средство обладает высокой противоопухолевой активностью, но не может быть введено самостоятельно, так как оно нерастворимо в воде и по этой причине химически конъюгировано с НА.

Колоректальные опухоли представляют собой одни из наиболее агрессивных форм опухоли и представляют собой одну из наиболее частых причин смерти вследствие новообразования в западных странах.

Формирование рака в толстой и прямой кишке обусловлено неконтролируемым делением клеток слизистой оболочки, которая выстилает этот орган, причем его этиология до сих пор не известна даже в том случае, если эпидемиологические исследования идентифицировали возможные факторы риска, такие как:

- особенности питания,
- генетические факторы,
- опухолевые полипы,
- интестинальные воспалительные заболевания.

Известно, что один из прогностических биологических факторов карциномы и аденомы толстой и прямой кишки представляет собой ген APC (аденоматозный полипоз толстой кишки). Будучи ответственными за семейный полипоз толстой кишки, соматические мутации этого гена представляют первый случай в естественной истории аденом и карцином в толстой кишке.

В нормальных условиях (в отсутствие опухолей) ген APC локализован на хромосоме 5 и кодирует цитоплазматический белок (APC белок), который играет ключевую роль в регуляции апоптоза в клеточном цикле, межклеточном взаимодействии и адгезии, процессах миграции дополнительно к метастазированию опухолей. Наиболее хорошо известная функция белка APC представляет собой его ассоциацию с белком GSK-3 β (белок гликоген-синтетазы киназы 3 β) для регуляции, количества свободного β -катенина, представленного в цитоплазме, и следовательно, в ядре: фактически, вышеупомянутые белки путем фосфорилирования свободного β -катенина на цитоплазматическом уровне способствуют его деградации. β -Катенин представляет собой белок, способный связываться с цитоплазматическим доменом мембранного белка E-кадгерина, вовлеченного в процесс клеточной адгезии. Деструкция внутриклеточного комплекса E-кадгерин- β -катенин (явление, связанное с превращением неопухолевой клетки в опухолевую клетку) приводит к утрате способности к межклеточной адгезии и таким образом способствует образованию метастазов. Имеется множество научных свидетельств, указывающих на то, как происходит этот процесс на первых стадиях и при развитии различных новообразований, например при раке молочной железы, раке кожи (в частности, меланомах), раке кости, раке головного мозга и щитовидной железы и при опухолях головы и шеи, опухолях лимфатической системы, раке легкого и раке мезотелия, пищевода, желудка, толстой кишки, толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, печени, почек, мочеточников и мочевого пузыря, предстательной железы, эндометрия и яичников (со всеми другими органами брюшной полости). В соответствии с этим утверждением эксперименты, направленные на восстановление нормального синтеза/уровня E-кадгерина в опухолевых клеточных линиях, продемонстрировали реверсию злокачественной опухолевой формы по сравнению с нетрансформированным фенотипом, таким образом больше не являющейся опухолевой (Birchmeier W. et al., Biochim Biophys Acta, 1994, 1198 (1); 11-26; De Vita V. et al., CANCER, 6th Edition, 2001,

Chapters).

При множестве карцином мутация гена APC приводит к образованию аномального неактивного белка APC, не способного связываться с белком GSK-3 β и таким образом регулировать β -катенин, который таким образом мигрирует из цитоплазмы в ядро, где он аккумулирует и образует комплексы с транскрипционными факторами (такими как Tcf-4), действуя в качестве коактиватора онкогенов активаторов роста и клеточной пролиферации (с-МУС, циклин 01) дополнительно к внеклеточным протеазам (ММР7), которые облегчают процессы инвазии и метастазы (см. фиг.1). На фиг.1 продемонстрирована схема β -катениновой регуляции в нормальной клетке (справа) и в опухолевой клетке (слева).

Таким образом, β -катенин обладает всеми свойствами онкобелка, тогда как комплекс APC/GSK-3 β благодаря его способности регулировать активность β -катенина определяют как онкосупрессор (Kollings F. et al, Digestion, 2002, 66: 131-144). Быстрая понижающая регуляция β -катенина, аккумулированного в ядре, фактически достигается благодаря действию белков APC (немутированного) и GSK-3 β , которые при движении в ядро связываются с онкобелком, разрушая его, и/или вновь транспортируют его в цитоплазму, где он фосфорилируется, а затем разрушается (Neufeld K. et al., EMBO reports, 2000, 1, 6: 519-523). Этот процесс отсутствует в опухолевых клетках, где комплекс APC/GSK-3 β не активен, таким образом, отсутствие регуляции количества β -катенина в ядре и его активности представляют собой явления, имеющие первоочередную важность в развитии и метастазировании злокачественных новообразований.

Химиотерапия имеет фундаментальную роль в лечении опухолей. При лечении пациентов, пораженных карциномами толстой и прямой кишки, в фазе метастазирования общепринятыми являются различные терапевтические процедуры: системная химиотерапия, местно-регионарная химиотерапия, аблативные виды терапии и хирургическое вмешательство.

Химиотерапевтическое лечение представляет собой основу терапевтических возможностей, доступных для этой группы пациентов. Объективная процентная доля ответа, полученная с использованием химиотерапии, составляет 20% для ответа краткосрочного действия и низкая процентная доза полных ответов (только 5%); стабилизации заболевания составляют приблизительно 30-40%.

На протяжении 40 лет 5-фторурацил (5-FU) представлял собой единственное терапевтическое оружие, доступное при карциномах толстой и прямой кишки в прогрессирующей фазе.

В последние годы исследованы новые лекарственные средства, связанные с 5-FU или без него, в попытке улучшить выживание пациентов, пораженных метастазирующими аденомами и карциномами толстой и прямой кишки. Среди них иринотекан и оксалиплатин играют фундаментальную роль. Недавно продемонстрировано, что иринотекан, связанный с 5-FU, обладает большей процентной долей объективного ответа и временем прогресса у пациентов по сравнению с пациентами, которых лечат только 5-FU, с общим выживанием приблизительно 17 месяцев.

Иринотекан, также известный как СРТ-11, имеется в форме гидрохлорида и действует путем образования трехкомпонентного комплекса лекарственное средство-ДНК-топоизомераза I, представляющего собой фермент, который превращает суперспирализованную молекулу ДНК в молекулу без напряжения кручения в процессах транскрипции или репликации ДНК. Образование трехкомпонентного комплекса с вышеуказанным камптотецином создает стабилизацию в системе в фазе развертывания

ДНК и приводит к тому, что клетка больше не способна делиться, что вызывает смерть путем апоптоза.

Иринотекан сам является неактивным, но гидролиз *in vivo* карбаминовой связи приводит к высвобождению активного метаболита SN38 (фиг.2), который представляет собой настоящее лекарственное средство, ответственное за цитотоксическое действие, но которое, будучи нерастворимым в воде, требует конкретных дополнительных средств для его введения. На фиг.2 продемонстрирована химическая структура Irinotecan[®] и SN38 соответственно.

В настоящем изобретении заявитель описывает новое биологическое и фармакологическое поведение конъюгатов - НА-противоопухолевые лекарственные средства, идентифицированных под товарным знаком ONCOFID[®], описанных в WO 2004/035629 и WO 2007/014784, поскольку оно значительно отличается от действия, продемонстрированного неконъюгированными референсными лекарственными средствами в том, что включает новые терапевтические и фармакодинамические свойства.

Таким образом, в настоящем изобретении описано и заявлено удивительное и неожиданное биологическое и фармакологическое действие, полученное для препаратов, основанных на ONCOFID[®], способствующее антипролиферативному терапевтическому действию (таким образом противоопухолевому) благодаря дифференцировке/реверсированию опухолевых клеток в направлении нетрансформированного фенотипа, а не в направлении индукции апоптоза.

Подробное описание изобретения

Известно, что производные ONCOFID[®], как указано ранее, придают противоопухолевым лекарственным средствам благоприятные свойства, такие как растворимость в воде, стабильность, селективность в отношении опухолевых тканей, уменьшение резистентности к химиотерапии и усиление фармакологической эффективности.

Известно, что одна из наиболее широко распространенных смертельных опухолей представлена карциномами или аденомами толстой и прямой кишки, и что один из наиболее эффективных способов терапии при лечении этого новообразования представляет собой способ, основанный на внутрибрюшинном введении СРТ-11. Как указано выше, известно, что при этом типе опухоли мутация/инактивация гена APC приводит к серии событий, которые ведут к ядерной аккумуляции β -катенина и, следовательно, активации транскрипционных факторов, которые облегчают клеточную инвазию и метастазы.

В настоящем изобретении описано и заявлено новое терапевтическое применение в области онкологии новых композиций, основанных на ONCOFID[®], в частности ONCOFID-S, представленных биоконъюгатом НА-SN38, и ONCOFID-D, представленных биоконъюгатом НА-доксорубицин.

Композиции, основанные на ONCOFID-S и ONCOFID-D, содержащие определенные концентрации вышеприведенных биоконъюгатов, фактически приводят к удивительным и совершенно неожиданным результатам в лечении опухолей толстой и прямой кишки и меланом *in vitro* и *in vivo*, обладая отличным механизмом действия, чем у неконъюгированного лекарственного средства, таким образом, обеспечивая возможность для отличающегося применения биоконъюгата, поскольку он особенно эффективен в дозах, отличающихся от доз, которые в настоящее время рассматриваются как терапевтически активные.

Оценка эффектов в отношении клеточной пролиферации, указанная в Примере 10, неожиданно выявила, как ONCOFID® вызывает механизм блокировки клеточной пролиферации, приписываемый к дифференцирующему эффекту опухолевой клетки, которая, таким образом, претерпевает процесс реверсирования фенотипа злокачественной опухолевой клетки в направлении нетрансформированного фенотипа, т.е. неопухолевого, при помощи: активации белкового комплекса APC/GSK-3 β для уменьшения ядерной аккумуляции β -катенина; и для регуляции процессов, связанных с действием β -катенина и E-кадгерина, таким образом повторного установления способности к клеточной адгезии и контактного ингибирования, особенно нетрансформированной дифференцированной клетки, следовательно, не вызывая смерть опухолевой клетки путем апоптоза (как известно, в противоположность для SN38). В конце своего клеточного цикла вышеприведенные клетки погибают, не вызывая образование новых метастазов и не внося вклад в рост первичной опухоли.

Кроме того, в последующих экспериментах заявитель продемонстрировал, как конъюгаты ONCOFID способны радикально модифицировать различные жизненные фазы опухолевой клетки путем того, что вызывают резкую остановку фазы 1 (определенную как разрыв 1) и фазы S, увеличивая фазу 2 (определенную как разрыв 2), в которой клетка "остается заблокированной". Этот результат доказывает, что конъюгаты ONCOFID способны модулировать все жизненные фазы опухолевых клеток (где фаза S синтеза ДНК клеточного цикла значительно увеличена), приводя их к дифференцировке и блокированию фаз синтеза новых ДНК, таким образом активной клеточной пролиферации. Затем достигается блокирование процесса роста первичной опухоли и процесса метастазирования.

В конце экспериментальных тестов, Пример 13, ясно продемонстрирована наибольшая противоопухолевая эффективность *in vivo* конъюгатов ONCOFID-S по сравнению с неконъюгированным лекарственным средством, вводимым в той же самой дозе.

Как представлено в результатах, применение данного лекарственного средства в качестве новой фармакологической терапии новообразований является возможным, поскольку конъюгат HA-SN38 вызывает значительное уменьшение системной токсичности SN38, таким образом увеличивая терапевтический индекс самого лекарственного средства, поскольку оно растворимо в воде и более эффективно при гораздо меньших дозах по сравнению с обычно используемыми в клинических протоколах.

В настоящем изобретении раскрыто и заявлено применение биоконъюгатов, состоящих из гиалуроновой кислоты, связанной с противоопухолевыми лекарственными средствами:

- для изготовления агента, дифференцирующего опухолевую клетку в направлении нетрансформированного неопухолевого фенотипа для лечения опухолевых патологий;
- для изготовления лекарственного средства для лечения опухолевых патологий, связанных с ядерной аккумуляцией β -катенина;
- для изготовления лекарственного средства для лечения опухолевых патологий, связанных с инактивацией комплекса APC-GSK-3 β ;
- для изготовления лекарственного средства для лечения опухолевых патологий, связанных с увеличением S фазы опухолевого клеточного цикла;
- для изготовления лекарственного средства для лечения первичной опухоли или ее метастаза.

Примеры таких опухолевых патологий, связанных соответственно с ядерной

аккумуляцией β -катенина, инактивацией комплекса APC-GSK-3 β и увеличением S фазы опухолевого клеточного цикла, представляют собой: опухоли молочной железы, кожи (и, в частности, меланому), костей, головного мозга, щитовидной железы, головы и шеи, опухоли лимфатической системы, легких и мезотелия, рак пищевода, желудка, толстой кишки, толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, печени, почек, мочеочников и мочевого пузыря, предстательной железы, эндометрия и яичников (со всеми другими органами брюшной полости).

Вышеуказанное лекарственное средство может быть введено системно (внутривенно или внутриаартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутрь лимфатической системы, подкожно или перорально), внутриоболочечно, оно может быть использовано для местного применения (с трансдермальной абсорбцией или путем эндотрахеального закапывания) или может быть введено непосредственно в область опухоли путем прямой инъекции (местно-регионарного лечения).

В следующих примерах заявитель продемонстрировал как приготовление конъюгатов НА с противоопухолевыми лекарственными средствами, такими как SN38 (ONCOFID-S) и доксорубин (ONCOFID-D), со степенью дериватизации от 1 до 20% масс./масс., позволяет получить производные ONCOFID, которые являются растворимыми и эффективными в водных растворах в концентрации от 2 до 15 мг/мл.

В частности, заявитель продемонстрировал при помощи экспериментальных исследований *in vitro*, проведенных с использованием опухолевых клеточных линий аденокарциномы толстой кишки и человеческой меланомы (необходимых для понимания механизма действия), совершенно неожиданное биологическое и фармакологическое поведение вышеприведенных биоконъюгатов. На основе этих данных можно сделать заключение, что блокирование клеточной пролиферации осуществляется посредством механизма, отличающегося от апоптотического действия референсного лекарственного средства, таким образом делая ONCOFID[®] лекарственным средством, обладающим новой терапевтической активностью и гораздо большей эффективностью, полученной для различных доз, для лечения новообразований, таких как опухоли молочной железы, кожи (и, в частности, меланома), костей, головного мозга, щитовидной железы и головы и шеи, опухоли лимфатической системы, легких и мезотелия, пищевода, желудка, толстой кишки, толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, печени, почек, мочеочников и мочевого пузыря, предстательной железы, эндометрия и яичников (со всеми другими органами брюшной полости). Для демонстрации этого заявитель привел результаты исследований *ex-vivo*, полученных на эксплантированных тканях после введения *in vivo* конъюгатов, и результаты исследований *in vivo*, которые выявили удивительную способность ONCOFID[®] ингибировать опухоль.

ONCOFID[®] (как описано ранее) определяет новую группу биоконъюгатов, основанных на гиалуроновой кислоте (НА) и противоопухолевых лекарственных средствах, ковалентно связанных через спейсер, которая включает:

- антиметаболиты, такие как, например, аналоги фолиевой кислоты (например, метотрексат), аналоги пиримидина (например, 5-фторурацил и 1- β -D-арабино-фуранозилцитозин (Ara-C));

- алкалоиды/природные продукты, такие как, например, винкристин и винбластин (алкалоиды барвинка), активный метаболит иринотекана: SN38, таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел;

- антибиотики и аналогичные продукты, такие как, например, доксорубин и эпирубин;

- модификаторы биологического ответа;
 - дитерпеноиды;
 - алкилирующие агенты, например нитрозомочевины;
 - координационные комплексы платины, такие как, например, карбоплатин и
- 5 цисплатин;
- синтетические гормоны и антигормоны, такие как, например, эстрадиол.

Для задач настоящего изобретения особенно подходят доксорубицин, паклитаксел и метаболит иринотекана SN38.

Гиалуроновая кислота, используемая в настоящем изобретении, имеет молекулярную
10 массу, варьирующую от 400 до 3000000 Да, предпочтительно от 5000 до 1000000 Да, и еще более предпочтительно от 30000 до 500000 Да; она может быть экстрактивного, ферментативного или биосинтетического происхождения. Ковалентная связь со спейсером включает карбоциклическую группу D-глюкуроновой кислоты повторяющейся единицы полимера, в процентном содержании, варьирующем от 1 до
15 100% (степень замещения), которая образует сложноэфирную или амидную связь с функциональной группой выбранного молекулярного спейсера, который, таким образом, действует как спейсер между гиалуроновой кислотой и химиотерапевтическим лекарственным средством. Спейсерный агент состоит из алифатической, аралифатической, алициклической или гетероциклической цепи, линейной или
20 разветвленной, с гетероатомами или без них, который включает гидроксильные, карбоксильные, карбонильные группы, аминокгруппы (за исключением гидразидов и полипептидов), эпоксигруппы, хлорангидриды, тиолы, нитрилы, галогены, ангидриды, изоцианаты и изотиоцианаты; причем предпочтительны бромиды, йодиды и хлориды карбоновых кислот с C₂-C₁₀алифатической цепью, и, в частности, бромиды, такие как
25 бромпропионовая кислота, броммасляная кислота, бромбутанол или бромпропанол. Степень замещения предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 50% масс./масс. и еще более предпочтительно от 1 до 25%; для конъюгации с доксорубицином предпочтительно замещение от 3 до 20%, тогда как для SN38 от 1 до 15% масс./масс.

В частности, ONCOFID-P представляет собой конъюгат между HA и паклитакселем,
30 ONCOFID-S представляет собой конъюгат между HA и SN38, ONCOFID-D представляет собой конъюгат между HA и доксорубицином, и ONCOFID-Pt представляет собой конъюгат между HA и цисплатином.

Более конкретно, ONCOFID-S представляет собой сложноэфирное производное HA (имеющее молекулярную массу 200 кДа) и SN38, ранее связанное со спейсером с
35 четырьмя атомами углерода, таким как броммасляная кислота. Степень замещения может варьировать от 1 до 15% на основе мольного отношения, используемого для фаз синтеза.

Синтез ONCOFID-S хорошо описан в подробном описании и в примерах 1-2 патентной заявки PCT WO 2007/014784.

40 ONCOFID-D представляет сложный эфир гиалуроновой кислоты со спейсером, такой как бромбутанол или бромпропанол, в свою очередь связанный с доксорубицином путем карбаминовой связи. Синтез ONCOFID-D также хорошо описан в подробном описании и в Примере 10 патентной заявки PCT WO 2007/014784.

ONCOFID-P ранее был подробно описан в патентной заявке PCT №WO 2004/035629.

45 Наконец, заявитель описывает изготовление различных водных фармацевтических композиций, в которых данные биоконъюгаты, как оказалось, являются особенно хорошо растворимыми (т.е. в присутствии β-циклодекстрина, глюкозы или липосом), но главным образом композиций, которые дают возможность для введения активных

действующих начал в терапевтически активных дозах без проблем, связанных с биодоступностью/растворимостью рассматриваемых лекарственных средств, таким образом, внося вклад посредством новых химических/физических/терапевтических свойств, описанных выше и продемонстрированных ниже, в увеличение эффективности.

5 Некоторые примеры изготовления композиций ONCOFID приведены ниже для чисто иллюстративных и не ограничивающих объем изобретения задач вместе с некоторыми примерами исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, которые демонстрируют конкретное биологическое поведение описанных выше конъюгатов.

10 Пример 1. Получение эфирного производного гиалуроновой кислоты с ММ (молекулярной массой) 200 кДа и SN-38 со степенью замещения 8%

Первая фаза: 500 мг SN-38 растворяют в DMF (диметилформамид). Затем добавляют 0,8866 г EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид гидрохлорид), 0,7011 4-броммасляной кислоты и наконец 0,1163 г DMAP (диметиламинопиридина).

15 Взаимодействие контролируют при помощи TLC (тонкослойной хроматографии) (силикагель 60 F₂₅₄) с использованием смеси CHCl₃/CH₃CN 60/40.

Приблизительно через 1 ч считают, что взаимодействие завершено, и добавляют 10 мл метанола, и смесь перемешивают в течение приблизительно 30 мин. Продукт затем осаждают в воде, фильтруют, добавляют к CHCl₃ и промывают H₂O, слегка подкисленной HCl (рН приблизительно 4), при помощи делительной воронки.

20 Высушенные органические фазы позволяют получить желтоватый продукт, который очищают в гравитационной хроматографической колонке и элюируют градиентом от CHCl₃ 100% до CHCl₃/CH₃OH 95:5.

Выделенный BrC4SN38 сушат в роторном испарителе и оставляют сушиться на ночь.

25 Вторая фаза: 1,4347 г НАТВА (200 кДа) (тетраалкиламмониевую или тетрабутиламмониевую соль гиалуроновой кислоты) загружают в трехгорлый стеклянный реактор, оснащенный рубашкой и магнитной мешалкой, и растворяют в 100 мл DMSO (диметилсульфоксид); смесь перемешивают до полного растворения, реактор термостатируют при 38°C.

30 380 мг промежуточного соединения BrC4SN38, растворенного в DMSO, добавляют к раствору НАТВА, и смесь оставляют перемешиваться в течение приблизительно 48 часов при 38°C.

35 В конце взаимодействия добавляют 14 мл насыщенного раствора NaBr, и смесь перемешивают в течение приблизительно 60 минут до полного обмена катионов TBA-Na и получения натрий-НА. Затем осуществляют осаждение этанолом; полученное твердое вещество выделяют путем фильтрования на Gooch 4 и переносят в стакан для последовательных промываний этанолом и наконец сушат в вакууме при 40°C.

Пример 2. Получение эфирного производного гиалуроновой кислоты с ММ 200 кДа и SN-38 со степенью замещения приблизительно 3,5%

40 Первая фаза: 199 мг SN-38 растворяют в 100 мл ACN (ацетонитрила) и к раствору добавляют 383 мг 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (EDC), 258 мг 4-броммасляной кислоты и 60 мг DMAP. Состояние в растворе контролируют при помощи TLC (неподвижная фаза диоксида кремния с флуоресцентным индикатором и элюентом хлороформ-ацетонитрил 60:40). Продукт выделяют путем удаления растворителя в вакуумном испарителе и очищают путем хроматографии на колонке диоксида кремния. Получающееся таким образом промежуточное соединение сушат при комнатной температуре в высоком вакууме и наконец взвешивают.

45 Вторая фаза: 160 мг промежуточного соединения BrC4SN38 растворяют в 20 мл NMP

и затем добавляют к раствору НАТВА 1,2 г в 120 мл NMP, ранее термостатируемому при 38°C. Смесь оставляют при 38°C на 72 ч и затем разбавляют 5 мл воды и 8 мл насыщенного раствора бромида натрия. Смесь полностью оставляют перемешиваться в течение 1 часа для того, чтобы обеспечить замену натрия на ион ТВА. Продукт затем осаждают путем добавления по каплям этанола и наконец очищают путем отмываний в этаноле и сушат в вакууме при 40°C.

Пример 3. Получение эфирного производного гиалуроновой кислоты с ММ 200 кДа и доксорубицином со степенью замещения приблизительно 10%

Первая фаза: 770 мг гидрохлорида доксорубицина взвешивают и растворяют в 120 мл безводного DMF в присутствии 770 мкл триэтиламина, затем добавляют 560 мг 3-бромбутанола, ранее активированного N-гидроксисукцинимидом. Взаимодействие контролируют при помощи TLC (неподвижная фаза диоксида кремния с флуоресцентным индикатором и элюентом хлороформ-этанол 80:20), и считают, что оно завершено через 15 минут. Продукт осаждают в деминерализованной воде и выделяют путем фильтрации на Gooch 5. Твердый остаток добавляют к CHCl_3 , промывают H_2O , слегка подкисленной HCl (pH приблизительно 4), при помощи делительной воронки.

Высушенные органические фазы позволяют получить темно-красный продукт, который наносят в гравитационную хроматографическую колонку и элюируют градиентом от CHCl_3 100% до $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 95:5 для очистки.

Выделенное промежуточное соединение BrC30Dox сушат в роторном испарителе и оставляют сушиться в течение ночи.

Вторая фаза: 964 мг НАТВА (200 кДа) загружают в трехгорлый стеклянный реактор, оборудованный рубашкой и магнитной мешалкой, и растворяют в 100 мл DMSO; смесь перемешивают до полного растворения, реактор термостатируют при 38°C.

550,5 мг промежуточного соединения BrC30Dox, растворенного в DMSO, добавляют к раствору НАТВА; взаимодействие поддерживают при перемешивании в течение приблизительно 48 часов при 38°C.

В конце взаимодействия по каплям добавляют 8 мл насыщенного раствора NaBr, и смесь перемешивают в течение приблизительно 30 минут до полного обмена катионов ТВА-Na и получения натрий-НА. Затем осуществляют осаждение этанолом; полученное твердое вещество выделяют путем фильтрации на Gooch 4 и переносят в стакан для последовательных промываний этанолом, и наконец сушат в вакууме при 40°C.

Пример 4

Получение эфирного производного гиалуроновой кислоты с ММ 200 кДа и платинового соединения со степенью замещения приблизительно 12%

200 мг цис-диамино(дихлор)платины (II) (0,666 ммоль) растворяют в 20 мл деминерализованной воды и приводят во взаимодействие в течение 6 ч при 60°C с двумя эквивалентами AgNO_3 для превращения в диамин(динитрат)платину (II). Затем добавляют 140 мг бромантарной кислоты (0,7 ммоль), и реакцию обмена лигандами осуществляют при 60°C в течение 24 ч. На фиг.3 представлена схема синтеза промежуточного соединения бромсукцинатдиаминоплатины. Промежуточное соединение синтеза осаждают и очищают для последующего взаимодействия с гиалуроновой кислотой.

240 мг Бромсукцинатдиаминоплатины (II) растворяют в 20 мл DMSO и медленно добавляют к раствору тетрабутиламмониевой соли гиалуроновой кислоты (НАТВА) в DMSO (1,750 г в 150 мл). Взаимодействие осуществляют при 38°C в течение 48 ч, после чего добавляют 14 мл насыщенного раствора NaBr при перемешивании в течение

приблизительно 60 минут для полного обмена катионов ТВА-Na и получения натрий-НА. Затем осуществляют осаждение этанолом; полученное твердое вещество выделяют путем фильтрования на Gooch 4 и промывают этанолом и наконец сушат в вакууме при 40°C. Содержание платины в конъюгате определяют при помощи способа ICP

5 (индуктивно-связанной плазмы).

Пример 5. Изготовление раствора, основанного на ONCOFID-Pt, в глюкозатном растворе при 5% масс./об.

60 мг ONCOFID-Pt, полученного как описано в Примере 4, со степенью замещения по остаткам карбоновой кислоты от 3 до 15% масс./масс., растворяют в 29 мл водного раствора, содержащего 5% масс./об. глюкозы. Раствор оставляют перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения конъюгата; его затем фильтруют через стерилизующие фильтры из регенерированной целлюлозы (RC) с использованием шприца 0,22 мкм. Титр в растворе (3 мг/мл в ONCOFID) определяют при помощи спектрофотометрии до и после фильтрования для подтверждения полного превращения конъюгата после фильтрования.

Пример 6. Фармацевтический препарат, основанный на ONCOFID-S, в растворе β-циклодекстрина в концентрации 1,5% масс./об.

62 мг ONCOFID-S, полученного как описано ранее, со степенью замещения остатков карбоновой кислоты от 3 до 15% масс./масс., растворяют в 22 мл водного раствора, содержащего 1,5% масс./об. β-циклодекстрина. Раствор оставляют перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения конъюгата; его затем фильтруют через стерилизующие фильтры из регенерированной целлюлозы (RC) с использованием шприцов 0,22 мкм. Титр раствора (2,8 мг/мл в ONCOFID-S) определяют при помощи спектрофотометрии до и после фильтрования для подтверждения полной регенерации конъюгата после фильтрования.

Пример 7. Фармацевтический препарат, основанный на ONCOFID-S, в растворе глюкозы в концентрации 5% масс./об.

56 мг ONCOFID-S, полученного как описано ранее, со степенью замещения карбоксильных остатков от 3 до 15% масс./масс., растворяют в 20 мл водного раствора, содержащего 5% масс./об. глюкозы. Раствор оставляют перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения конъюгата; его затем фильтруют через стерилизующие фильтры из регенерированной целлюлозы (RC) с использованием шприца 0,22 мкм. Титр в растворе (2,8 мг/мл в ONCOFID-S) определяют при помощи спектрофотометрии до и после фильтрования для подтверждения полной регенерации конъюгата после фильтрования.

Пример 8. Фармацевтический препарат, основанный на ONCOFID-P, в растворе глюкозы в концентрации 5% масс./об.

100 мг ONCOFID-P, полученного как описано в Примерах 5, 6, 7, 9 и 10 в патенте WO 2004035629, растворяют в 20 мл водного раствора, содержащего 5% масс./об. глюкозы. Раствор оставляют перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения конъюгата; его затем фильтруют через стерилизующие фильтры из регенерированной целлюлозы (RC) с использованием шприца 0,22 мкм. Титр в растворе (5 мг/мл в ONCOFID-P) определяют при помощи спектрофотометрии до и после фильтрования для подтверждения полной регенерации конъюгата после фильтрования.

Пример 9. Фармацевтический препарат, основанный на ONCOFID-D, в глюкозатном растворе в концентрации 5% масс./об.

60 мг ONCOFID-D, полученного как описано ранее, со степенью замещения карбоксильных остатков от 3 до 15% масс./масс., растворяют в 20 мл водного раствора,

содержащего 5% масс./об. глюкозы. Раствор оставляют перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения конъюгата; его затем фильтруют через стерилизующие фильтры из регенерированной целлюлозы (RC) с использованием шприца 0,22 мкм. Титр раствора (3 мг/мл в ONCOFID-D) определяют при помощи спектрофотометрии до и после фильтрования для подтверждения полного выделения конъюгата после фильтрования.

Пример 10. Эксперимент *in vitro* с биоконъюгатом ONCOFID-S в доклинических моделях аденокарциномы толстой кишки

Задача этого эксперимента *in vitro* в основном заключается в том, чтобы определить профиль активности биоконъюгата, состоящего из НА, связанного с SN38, полученного в Примере 2, приготовленного в водном растворе, для оценки/сравнения противоопухолевой активности производных ONCOFID по сравнению с референсными лекарственными средствами, таким образом определяя их фармакологическую эффективность по сравнению с противоопухолевым агентом, используемым для сравнения, и механизм действия.

Тестируемые продукты и тестируемые активные действующие начала

SN38: контрольный референсный продукт;

ONCOFID-S: эфирное производное НА, ковалентно связанное с SN38 с % этерификации по карбоксилу (масс./масс.) 3,5%

Тестируемые фармацевтические препараты

SN28 растворили в смеси, состоящей из DMSO/CH₃CN/EtOH (10:45:45), при комнатной температуре.

Раствор ONCOFID-S в β-циклодекстрине: получен, как описано в Примере 6.

Используемые клеточные линии

Клетки аденокарциномы толстой кишки крысы DHD/K12/Trb, экспрессирующие рецептор для НА CD44

Экспериментальный протокол:

1) исследуемую клеточную линию высевают в концентрации 6×10^4 клеток на см² в плоскодонные планшеты с 24 лунками;

2) через 24 ч тестируемые растворы, подходящим образом разведенные в культуральной среде, добавляют к клеткам;

3) через 24 или 48 ч после обработки клеточную жизнеспособность оценивают при помощи способа исключения трипанового голубого, представляющего собой краситель, вытесняемый из жизнеспособных и метаболически активных клеток, но удерживаемый мертвыми клетками, которые приобретают синюю окраску.

Результаты

Результаты, полученные в отношении жизнеспособности клеток DHD/K12/Trb в зависимости от дозы дополнительно к значениям IC₅₀ (средней ингибирующей концентрации) для нового конъюгата ONCOFID-S по сравнению с результатами для неконъюгированного SN38 после 24 ч обработки, продемонстрировали большую эффективность ONCOFID-S по сравнению с SN38. Обнаружено, что значения IC₅₀ для SN38 и ONCOFID-S составляют 1,4 мкг/мл и 0,4 мкг/мл соответственно. Принимая во внимание то, что рассматриваемый конъюгат ONCOFID-S был дериватизирован при 3,5% по массе в SN38, значение IC₅₀ эквивалента SN38 (конъюгированного с НА) даже еще меньше (0,014 мкг/мл), т.е. в 100 раз большая активность по сравнению с референсным лекарственным средством, подтверждая усиление его фармакологической эффективности при его конъюгации с гиалуроновой кислотой.

На фиг.4 продемонстрирован график клеточной жизнеспособности в зависимости от времени после обработки НА, SN38 или ONCOFID-S в концентрации 0,5 мкг/мл.

Вследствие важности роли регуляции β -катенина в формировании и прогрессировании колоректальных карцином проверяли, способна ли обработка Oncofid-S модифицировать
5 внутриклеточную экспрессию и распределение молекул, вовлеченных в процесс контроля вышеуказанного белка, как описано ранее. Таким образом, эффект обработки ONCOFID-S на внутриклеточное распределение E-кадгерина, β -катенина, APC и GSK-3 β в клетках DHD/Trb анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии. Специфические антитела использовали для вышеприведенных белков, визуализируя их
10 с применением вторичных антител, связанных с флуорохромами, такими как родамин и флуоресцеин.

Полученные результаты продемонстрировали, что антипролиферативному и таким образом противоопухолевому действию обработки биоконъюгатом Oncofid-S, представленному на фиг.4, предшествовала:

15 - транслокация в ядро белка APC и киназы GSK-3S (фиг.4a), где они способны регулировать аккумуляцию β -катенина путем фосфорилирования (как указано ранее) с последующей остановкой клеточной пролиферации;

- транслокация β -катенина из ядра (где, как описано ранее, известно, что он
20 аккумулируется и активирует онкогены, вовлеченные в пролиферацию опухолевых клеток), в цитоплазму (фиг.4b), где путем комбинирования на уровне клеточной мембраны с E-кадгерином он перестраивает внутриклеточный комплекс E-кадгерин- β -катенин, который регулирует клеточную адгезию и представляет собой явный сигнал клеточной дифференцировки;

- последующая увеличенная экспрессия E-кадгерина (фиг.4b), представляющего
25 собой мембранный белок, вовлеченный в процессы межклеточной адгезии, и образование межклеточного соединения (которое, как известно, играет фундаментальную роль в определении контактного ингибирования и клеточной дифференцировке); увеличение экспрессии E-кадгерина фактически рассматривается в качестве маркера дифференцировки неопухолевых эпителиальных клеток здоровой слизистой оболочки
30 толстой кишки;

- увеличение экспрессии цитокератина 20 (CK20), 2^{го} маркера дифференцировки неопухолевых эпителиальных клеток здоровой слизистой оболочки толстой кишки (фиг.5). Все вышеприведенные модификации, связанные с клеточной дифференцировкой,
35 не выявлены в образцах, обработанных неконъюгированным SN38.

Эти данные ясно демонстрируют, что механизм остановки пролиферации опухолевых клеток в образцах, обработанных ONCOFID-S, представленный на фиг.4, может быть отнесен к дифференцирующему действию, а не к индукции массовой клеточной гибели путем апоптоза, как известно, наоборот, для SN38.

На фиг.5 продемонстрирован анализ путем сканирующей электронной микроскопии
40 (SEM) морфологических модификаций, вызванных обработкой *in vitro* опухолевых клеток, проанализированных после эксперимента, причем модификаций, которые подтверждают дифференцирующее действие биоконъюгата в отношении опухолевых клеток в направлении нетрансформированного фенотипа, т.е. неопухолевого, таким образом восстанавливая межклеточную адгезионную способность, ответственную за
45 контактное ингибирование, таким образом вызывая блокирование пролиферации опухоли. На фиг.5 продемонстрирован эффект ONCOFID-S после 48 ч обработки в отношении экспрессии CK20 и в отношении морфологии клеток аденокарциномы толстой кишки крыс DHD/K12/Trb: после обработки количество клеток,

экспрессирующих СК20, увеличилось по сравнению с необработанным контролем и клеточными культурами, обработанными гиалуроновой кислотой. Морфология клеток, обработанных биоконъюгатом, демонстрирует типичные свойства дифференцированной эпителиальной клетки, такие как большую адгезию в отношении субстрата, большее
5 уплощение и присутствие прочных межклеточных соединений.

Выводы

На клеточной линии аденокарциномы толстой кишки, которая является положительной в отношении экспрессии рецепторов CD44, производное ONCOFID-S в низких дозах демонстрирует неожиданное антипролиферативное действие, вследствие
10 не столько индукции апоптоза, как обнаружено и известно для SN38, сколько дифференцировки/обращения клеток аденокарциномы в нетрансформированные эпителиальные клетки, т.е. неопухолевые, таким образом непролиферирующие. Как только они завершают свой клеточный цикл, вышеуказанные клетки погибают, не образуя новых метастазов и не внося вклад в рост новообразования.

15 Пример 11. Эксперимент *in vitro* с биоконъюгатом ONCOFID-S в доклинических моделях аденокарциномы толстой кишки

Задача этого эксперимента *in vitro* в основном заключалась в том, чтобы определить профиль активности производного ONCOFID с более высокой степенью дериватизации и приготовленного в водном глюкозатном растворе, для оценки/сравнения
20 противоопухолевой активности с активностью референсного лекарственного средства, таким образом, определяя фармакологическую эффективность по сравнению с используемым для сравнения противоопухолевым агентом.

Схема эксперимента

Тестируемые продукты и тестируемые активные действующие начала:

25 SN38: контрольный референсный продукт;

ONCOFID-S: эфирное производное НА, ковалентно связанное с SN38 с % этерификации по карбоксилу (масс./масс.) 8%, полученное в соответствии с Примером 1.

Тестируемые фармацевтические препараты

30 SN28, растворенный в смеси, состоящей из DMSO/CH₃CN/EtOH (10:45:45), при комнатной температуре. Раствор ONCOFID-S в глюкозате получают, как описано в Примере 7.

Используемые клеточные линии

Клетки аденокарциномы толстой кишки крысы DHD/K12/Trb.

35 Протокол эксперимента

1) исследуемую клеточную линию высевают в концентрации 6×10^4 клеток на см² в плоскодонные планшеты с 24 лунками,

2) через 24 ч тестируемые растворы, подходящим образом разведенные в
40 культуральной среде, добавляют к клеткам,

3) через 24 или 48 ч после обработки клеточную жизнеспособность оценивают при помощи способа исключения трипанового голубого, представляющего собой краситель, вытесняемый из жизнеспособных и метаболически активных клеток, но удерживаемый мертвыми клетками, которые приобретают синюю окраску.

Результаты

45 Результаты, полученные в отношении клеточной жизнеспособности в зависимости от тестируемой дозы ONCOFID-S (концентрации 0,125, 0,25, 0,5, 1 мкг/мл) после 48 ч обработки, приведены далее в графической форме (фиг.6).

Доза 250 нг/мл соответствует IC_{50} и подтверждает гораздо большую эффективность ONCOFID-S, полученного в соответствии с Примером 2, по сравнению с полученным в соответствии с Примером 1 (IC_{50} эквивалентен 0,4 мкг/мл, как приведено в результатах Примера 5); следовательно, эффективность гораздо выше, чем эффективность

неконъюгированного SN38. Этот результат может быть отнесен к более высокому проценту дериватизации в SN38, т.е. 8% по массе по сравнению с ONCOFID-S(OH-S), дериватизированному на уровне 3,5%.

Далее приведены данные со значениями IC_{50} для 2 конъюгатов, обладающих различной степенью замещения (3,5 и 8%), и соответствующими эквивалентами для конъюгированного SN38 по сравнению с неконъюгированным референсным лекарственным средством SN38.

| | IC_{50} |
|------------------------|--------------|
| SN38 неконъюгированный | 1,4 мкг/мл |
| OF-S 3,5% масс./масс. | 0,4 мкг/мл |
| SN38 экв. | 0,014 мкг/мл |
| OF-S 8% масс./масс. | 0,25 мкг/мл |
| SN38 экв. | 0,02 мкг/мл |

Выводы

Производное ONCOFID-S демонстрирует эффективность в пять раз более высокую по сравнению с наблюдаемой для неконъюгированного лекарственного средства SN38, но учитывая концентрацию эквивалента SN38, эффективность оказывается приблизительно в 70 раз выше, чем эффективность референсного лекарственного средства. Кроме того, сравнение с исследованиями конъюгата, обладающего меньшей процентной долей дериватизации, демонстрирует, что чем больше гиалуроновой кислоты дериватизировано в SN38, тем выше будет эффективность ONCOFID-S.

Пример 12. Эксперимент *in vitro* с биоконъюгатом ONCOFID-S в доклинических моделях аденокарциномы толстой кишки

Задача вышеприведенного эксперимента заключалась в том, чтобы исследовать влияние производного ONCOFID-S на различные фазы клеточного цикла для оценки его активности по сравнению с референсным лекарственным средством SN38.

Схема эксперимента

Тестируемые продукты и тестируемые активные действующие начала

- SN38: контрольный референсный продукт;

- ONCOFID-S: эфирное производное НА, ковалентно связанное с SN38 с % этерификации по карбоксилу (масс./масс.) 3,5%, полученное в соответствии с Примером 2.

Тестируемые фармацевтические препараты

- SN28, растворенный в смеси, состоящей из DMSO/CH₃CN/EtOH (10:45:45), при комнатной температуре.

- Раствор ONCOFID-S в глюкозате, полученный как описано в Примере 7.

Используемые клеточные линии

Клетки аденокарциномы толстой кишки крысы DHD/K12/Trb

Протокол эксперимента

Как описано для Примеров 8 и 9.

Результаты

Действие конъюгата ONCOFID-S (в концентрации 0,5 мкг/мл) определяли с

использованием анализа цитофлуориметрического типа; после 24 ч фармакологической обработки клеточные фазы идентифицируют при помощи FACS (клеточный сортер с активацией флуоресценции)-Scan (Becton Dickinson) путем цитофлуориметрического анализа содержания DNA после окрашивания клеток пропидий йодидом.

5 На фиг.7 продемонстрированы полученные результаты: обработка рассматриваемым конъюгатом приводит к резкому прекращению фаз gap1 и S, тогда как фаза gap2 увеличивается, что отличает ONCOFID от референсного лекарственного средства, которое, с другой стороны, увеличивает как первую фазу, так и фазу S.

10 Для оценки того, сохраняются ли полученные данные во времени, провели тест отмывания, в котором после 48 ч обработки культуральную среду заменяют свежей средой без обработки: клеточные фазы вновь определяли в момент времени, определяемый как T0, и после 24 ч в культуре T24.

15 Полученные результаты можно видеть на фиг.8: они ясно демонстрируют, что даже после 24 ч фармакологической суспензии сохраняется блокирование фаз gap 1 и S, свидетельствуя о том, что действие лекарственного средства таким образом является необратимым.

Выводы

В каждой пролиферирующей клетке млекопитающего репликация его генома и деление самой клетки происходит в течение специфических фаз клеточного цикла, 20 идентифицированных как gap1, S, gap2. В фазе gap1 клетка претерпевает все биохимические модификации, которые должны подготовить ее для фазы S, на которой синтезируется новая DNA: в S формируется фактически точная копия генетического материала клетки, которая делится на две дочерние клетки путем последующего процесса митоза M. Фаза, которая следует за S и предшествует M, идентифицирована как gap2 25 и представляет собой фазу подготовки к митозу. Полученные результаты демонстрируют, что биоконъюгат ONCOFID эффективен для существенного уменьшения наиболее важных фаз клеточного цикла опухолевых клеток: фаза S активного синтеза новой DNA для последующей пролиферации и роста опухоли, которая существенно увеличена в опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми. Таким образом, 30 оказалось, что в низких дозах новое лекарственное средство способно модулировать фазы клеточного роста за счет блокирования опухолевой пролиферации существенно иным путем, чем референсное лекарственное средство SN38.

Пример 13. Эксперимент *in vitro* с биоконъюгатом ONCOFID-D в доклинических моделях человеческой меланомы

35 Задача этого эксперимента *in vitro* в основном заключалась в том, чтобы определить профиль активности производного ONCOFID-D, приготовленного в водном глюкозатном растворе, для оценки/сравнения противоопухолевой активности с активностью референсного лекарственного средства, таким образом определяя фармацевтическую эффективность по сравнению с используемым для сравнения 40 противоопухолевым агентом (доксорубицин).

Схема эксперимента

Тестируемые продукты и тестируемые активные действующие начала

- Доксорубицин: контрольный референсный продукт;
- ONCOFID-D: эфирное производное НА, ковалентно связанное с доксорубицином 45 с % этерификации по карбоксилу (масс./масс.) 10%, полученное в соответствии с Примером 3;

Тестируемые фармацевтические препараты

- Доксорубицин растворяли в растворе глюкозы в концентрации 5% масс./об. при

комнатной температуре.

- Раствор ONCOFID-D в глюкозате, полученный как описано в Примере 9.

Используемые клеточные линии

Клетки человеческой меланомы M14, экспрессирующие рецептор для HA CD44.

5 Протокол эксперимента:

- исследуемую клеточную линию высевают в концентрации 6×10^4 клеток на см^2 в плоскодонных планшетах с 24 лунками;

- через 24 ч тестируемые растворы, подходящим образом разбавленные в культуральной среде, добавляют к клеткам;

10 - через 24 ч после обработки цитотоксичность оценивают при помощи конфокальной микроскопии путем окрашивания Живой/Мертвый в тесте анализа клеточной жизнеспособности (Molecular Probes, Eugene, OR). Наблюдение осуществляли при помощи конфокального микроскопа LEICA TCS SP5.

Результаты

15 Цитотоксический эффект, вызванный ONCOFID-D (OF-D) и неконъюгированным доксорубицином, представлен здесь в графической форме (фиг.9) в зависимости от дозы (концентрации 0,25, 0,5, 20 мкг/мл) после 24 ч обработки клеточной линии меланомы M14.

Выводы

20 Линия клеток меланомы, как оказалось, является строго положительной в отношении экспрессии рецепторов CD44; оценка цитотоксичности путем конфокальной микроскопии свидетельствует о том, что ONCOFID-D способен оказывать большее цитотоксическое действие в отношении этой линии меланомы по сравнению с действием соответствующего неконъюгированного доксорубицина. Кроме того, принимая во

25 внимание то, что в биоконъюгате ONCOFID-D процентная доля конъюгированного доксорубицина составляет 10% по массе, активность лекарственного средства является в 10 раз более высокой.

30 Пример 14. Оценка противоопухолевых действий *in vivo* биоконъюгата ONCOFID-S в экспериментальной модели опухоли, вызванной у крыс при помощи линии карциномы сингенного трансплантата толстой кишки

Для подтверждения того, что высокая эффективность, продемонстрированная производными ONCOFID в цитотоксическом действии *in vitro*, также при помощи эксперимента *in vivo*, BDIX крыс использовали для индукции абдоминальной опухоли. Инокуляция клеточной линии DHD/K12/Trb, осуществленная внутрибрюшинно,

35 фактически приводила к перитонеальному карциноматозу и опухолевому асциту.

Затем сравнивали противоопухолевую эффективность *in vivo* СРТ-11 в концентрации 40 мг/кг с активностью ONCOFID-S, вновь в концентрации 40 мг/кг (которая соответствует 3,2 мг/кг активного действующего начала SN38, биоконъюгат дериватизирован на 8%), оба из которых вводили внутрибрюшинно.

40

Задачи исследования *in vivo*:

1) оценка опухолевого роста по сравнению с контрольной группой и/или уменьшения или исчезновения опухолевых поражений в брюшной полости и обнаружение асцита;

2) подтверждение результатов достигнутого в исследованиях *in vitro* противоопухолевого действия;

45 3) оценка гематологической и тканевой токсичности, вызванной путем лечения.

Схема эксперимента

Используемые лекарственные средства: тестируемые активные действующие начала

- Irinotecan[®] (СРТ-11): контрольный референсный продукт;

- ONCOFID-S: эфирное производное НА, ковалентно связанное с SN38 с % этерификации по карбоксилу (масс./масс.) 8%, полученное в соответствии с Примером 1;

Тестируемые фармацевтические препараты

- Иринотекан, растворенный в нагретом (70°C) глюкозатном растворе в концентрации 5% масс./об., в течение приблизительно 1 ч.

- Раствор ONCOFID-S в глюкозате получают, как описано в Примере 7.

Обрабатываемые животные: 36 самцов крыс BDIX в возрасте 7 недель (приблизительно 200 г) разделяли в соответствии с экспериментальными критериями на следующие группы (каждая группа состоит из 12 животных):

1. Контрольная группа; инокулум DHD/K12/trb.

2. Группа СРТ-11: инокулум DHD/K12/trb+обработка СРТ-11 40 мг/кг внутрибрюшинно.

3. Группа ONCOFID-S: инокулум DHD/K12/trb+обработка ONCOFID-S 40 мг/кг внутрибрюшинно.

После 14 суток содержания 1×10^6 клеток DHD/K12/trb на крысу инокулировали внутрибрюшинно. Через 7 суток инициировали предполагаемую терапевтическую обработку, состоящую из 4 терапевтических циклов. Умерщвление животных осуществляли через 7 суток после последней фармакологической обработки. Животных оценивали один раз в неделю в отношении возникновения возможных симптомов токсичности путем измерения массы организма и в отношении возможного возникновения асцита. В момент умерщвления осуществляли внутрисердечный отбор образцов у всех животных и оценивали гематологическую токсичность вследствие фармакологической обработки. Опухоли и асцит извлекали и измеряли. Извлеченные ткани фиксировали в формалине для гистологической и иммуногистохимической оценки.

Результаты

Оценка объемов карциноматоза в брюшной полости

Оценку роста опухолевых узелков осуществляли в конце обработок; на фиг. 10 показано как в конце теста (Т28) объем усредненной опухоли выявил хороший ответ на лечение в группе СРТ-11 (5,9 см³) и превосходный ответ в группе ONCOFID-S (1,8 см³) по сравнению с необработанной контрольной группой (15,5 см³).

Оценка присутствия кровяных асцитов

Кровяные асциты возникают вследствие распространения опухоли в брюшной полости; клинически они в основном ассоциируются с опухолями желудочно-кишечной и яичниковой локализации. Механизм, ответственный за образование злокачественных асцитов, прежде всего, заключается в блокировании лимфатического оттока, тем не менее, продемонстрировано, что когда концентрация опухолевых клеток в асцитной жидкости высока (больше 4000/мм³), тогда само присутствие может вызвать образование асцитов вследствие продукции химических медиаторов (цитокинов, гистаина, молочной кислоты), обладающих раздражающим действием.

На фиг.11, что полностью согласуется с результатом для объемов опухолей, продемонстрировано как в конце теста (Т28) средний объем кровяных асцитов (опухолевых) составляет 46,7 мл в контроле, 21,5 мл в группе, обработанной СРТ-11, и только 1,9 мл в группе, обработанной ONCOFID-S.

Следует отметить, что хотя 100% и 83% животных в контрольной группе и группе, обработанной СРТ-11, имеют кровяной асцит, только 16% животных в группе, обработанной ONCOFID-S, имеют умеренные количества асцита.

Оценка гематологической токсичности

На фиг.12 проиллюстрирован анализ (в момент T28) гематоцитометрического профиля обрабатываемых животных. Приведены значения для гранулоцитов, представляющих собой популяцию белых глобул, на которые главным образом влияет химиотерапевтическая обработка.

В группе, обработанной ONCOFID-S, без асцита, не зарегистрирована лейкопения в результате фармакологической токсичности, тогда как у животных, у которых развивается умеренное количество асцита, имеется некоторое количество гранулоцитов, которое лежит в пределах нормальных значений, таким образом, подтверждая отсутствие токсичности биоконъюгата по настоящему изобретению.

Выводы

Согласуясь с результатами, полученными в результате исследований *in vitro*, эксперименты, проведенные *in vivo*, демонстрируют удивительное различие в эффективности лекарственного средства, конъюгированного с НА, по сравнению со свободным лекарственным средством. Производное ONCOFID-S не только вызывает среднее уменьшение опухолевой массы на 88% (по сравнению с 62% в группе, обработанной СРТ-11), но это также обнаружено в соответствии с данными гематологической токсичности и измерения объема асцита, показателя развития опухоли, уменьшенной фармакологической токсичности, вызванной рассматриваемой обработкой.

Пример 15. Исследования *ex vivo* для оценки механизма действия биоконъюгата ONCOFID-S

Для того чтобы подтвердить удивительное биологическое/фармакологическое поведение производных ONCOFID, которые демонстрируют антипролиферативное действие дифференцирующего, нежели чем апоптотического типа, опухоли, индуцированные, как описано выше, подвергали иммуногистохимическим исследованиям.

Протокол эксперимента

Опухоли, извлеченные непосредственно после экстракции, осторожно промывали физиологическим раствором, фиксировали забуференным формалином, подвергали заключению в парафин и делали срезы, имеющие толщину 4 мкм. Гистологический анализ проводили на срезах, окрашенных гематоксилином/эозином, тогда как иммунологический анализ осуществляли с применением антител, специфических в отношении исследуемых белков, выявляемых при помощи вторичных антител, связанных с пероксидазой, для анализа, который можно провести под оптическим микроскопом.

Результаты

В результате иммуногистохимического анализа *ex-vivo* внутрибрюшинных опухолей получили подтверждение данных, полученных *in vitro*, в отношении механизма действия биоконъюгата, связанного с регуляцией комплекса E-кадгерин- β -катенин, свидетельствующих об эффекте дифференцирующего и, следовательно, непролиферативного, а не апоптотического типа.

Кратко, результаты, полученные в результате анализа *ex-vivo*, являются следующими:

1) в опухолях, извлеченных из организмов животных, обработанных ONCOFID-S, можно наблюдать картину экспрессии комплекса онкобелок/онкосупрессор, которая полностью напоминает картину, обнаруженную в клеточной модели, используемой *in vitro*, свидетельствуя о реверсировании опухолевого фенотипа в направлении нормального. В опухолях, извлеченных из организмов животных, обработанных ONCOFID-S, фактически происходит сдвиг β -катенина из ядра в направлении

межклеточных соединений, тогда как белок APC и GSK3 β двигаются в ядро (фиг.10).

2) E-кадгерин и CK20, представляющие собой маркеры дифференцировки эпителиальных клеток слизистой оболочки толстой кишки в опухоли, извлеченной из организмов животных, обработанных ONCOFID-S, имеют увеличенную экспрессию по сравнению с контрольными животными, точно как обнаружено в модели обработки клеток *in vitro*. Эта увеличенная экспрессия также является показателем обращения недифференцированного опухолевого фенотипа в направлении дифференцированного и исчезновение пролиферирующего фенотипа, так же как и опухолевого (фиг.13).

Выводы

Конкретное биологическое/фармакологическое поведение производного ONCOFID также подтвержденное *in vivo*, заключается в блокировании клеточной пролиферации, стимулировании дифференцировки опухолевых клеток в направлении нетрансформированного неопухолевого фенотипа.

В свете вышеприведенного описания изобретения очевидно, что эти способы могут быть различным образом модифицированы. Эти модификации не следует рассматривать как отступления от сущности и перспектив изобретения, и все модификации, которые могут быть очевидны для эксперта в этой области, включены в объем следующей формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Биоконъюгат, состоящий из гиалуриновой кислоты, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, для изготовления агента для лечения опухолевых патологий, где указанный биоконъюгат состоит из гиалуриновой кислоты, имеющей молекулярную массу в диапазоне от 30000 до $0,5 \times 10^6$ Да, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, которое представляет собой доксорубин, ковалентно связанный через спейсер, выбранный из бромбутанола или бромпропанола, который образует сложноэфирную связь с гиалуриновой кислотой, со степенью замещения доксорубина по карбоксильной группе гиалуриновой кислоты в диапазоне от 3 до 20%.

2. Биоконъюгат, состоящий из гиалуриновой кислоты, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, для изготовления лекарственного средства для лечения опухолевых патологий, связанных с инактивацией белкового комплекса APC-GSK-3 β (белок аденоматозного полипоза толстой кишки - белок гликоген-синтетазы киназы 3 β), где указанный биоконъюгат состоит из гиалуриновой кислоты, имеющей молекулярную массу в диапазоне от 30000 до $0,5 \times 10^6$ Да, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, которое представляет собой доксорубин, ковалентно связанный через спейсер, выбранный из бромбутанола или бромпропанола, который образует сложноэфирную связь с гиалуриновой кислотой, со степенью замещения доксорубина по карбоксильной группе гиалуриновой кислоты в диапазоне от 3 до 20%.

3. Биоконъюгат по п.1 или 2, где указанные патологии выбраны из опухолей молочной железы, кожи, костей, головного мозга, щитовидной железы и опухолей головы и шеи, опухолей лимфатической системы, легких и мезотелия, пищевода, желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, печени, почек, мочеточников и мочевого пузыря, предстательной железы, эндометрия и яичников.

4. Биоконъюгат по п.1 или 2, где указанная патология представляет собой опухоль толстой и прямой кишки.

5. Биоконъюгат по п.1 или 2, где указанная патология представляет собой меланому.

6. Биоконъюгат по п.1, где указанный агент является подходящим для системного, местного введения или прямой инъекции в область опухоли.

7. Биоконъюгат по п.2, где указанное лекарственное средство является подходящим для системного, местного введения или прямой инъекции в область опухоли.

5 8. Биоконъюгат по п.6 или 7, где указанное введение осуществляют при помощи внутривенного или внутриартериального, внутримышечного, трансдермального, внутрибрюшинного, внутрибололочечного, внутрилимфатического введения, введения путем эндотрахеальной инстилляций, подкожного, перорального или местно-регионарного введения.

10 9. Фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, состоящий из гиалуроновой кислоты, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, вместе с одним или более чем одним фармакологически приемлемым адьювантом и/или эксципиентом, в качестве агента для лечения опухолевых патологий, где указанный биоконъюгат состоит из гиалуроновой кислоты, имеющей молекулярную массу в
15 диапазоне от 30000 до $0,5 \times 10^6$ Да, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, которое представляет собой доксорубин, ковалентно связанный через спейсер, выбранный из бромбутанола или бромпропанола, который образует сложноэфирную связь с гиалуроновой кислотой, со степенью замещения доксорубина по карбоксильной группе гиалуроновой кислоты в диапазоне от 3 до 20%.

20 10. Фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, состоящий из гиалуроновой кислоты, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, в качестве активного действующего начала, вместе с одним или более чем одним фармакологически приемлемым адьювантом и/или эксципиентом, для лечения опухолевых патологий, связанных с инактивацией белкового комплекса APC-GSK-3 β ,
25 где указанный биоконъюгат состоит из гиалуроновой кислоты, имеющей молекулярную массу в диапазоне от 30000 до $0,5 \times 10^6$ Да, связанной с противоопухолевым лекарственным средством, которое представляет собой доксорубин, ковалентно связанный через спейсер, выбранный из бромбутанола или бромпропанола, который
30 образует сложноэфирную связь с гиалуроновой кислотой, со степенью замещения доксорубина по карбоксильной группе гиалуроновой кислоты в диапазоне от 3 до 20%.

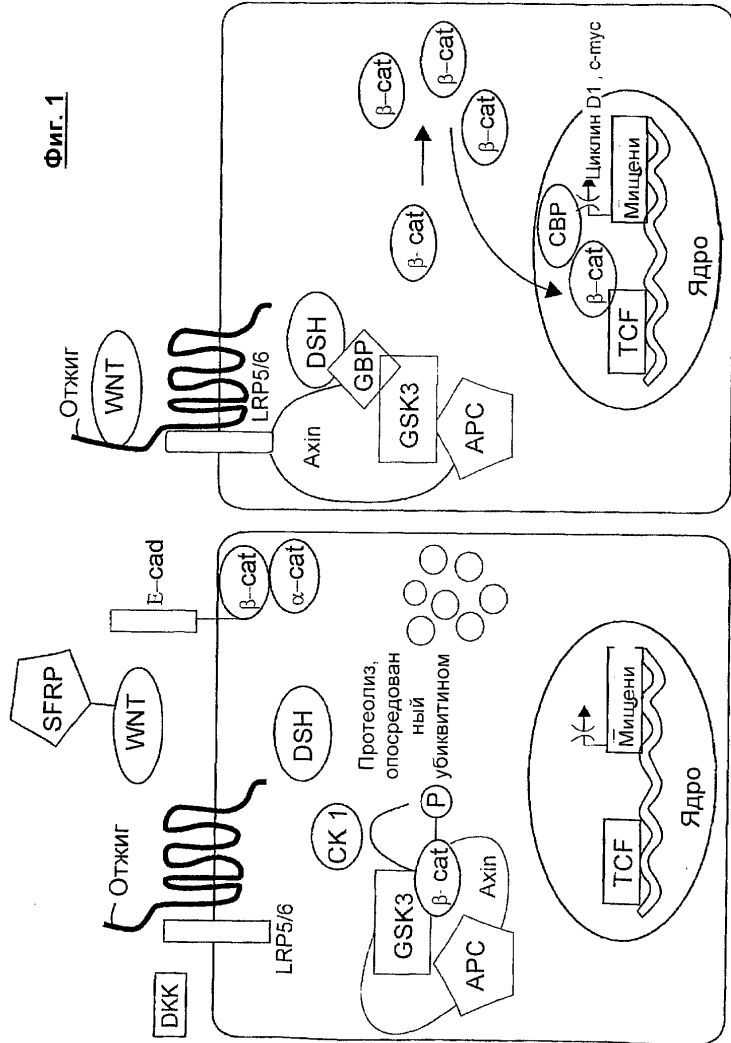
11. Фармацевтическая композиция биоконъюгата по любому из пп.9, 10, содержащая β -циклодекстрин или липосомы.

35 12. Фармацевтическая композиция биоконъюгата по п.11, содержащая β -циклодекстрин в концентрации 1,5% масс./об.

13. Фармацевтическая композиция биоконъюгата по любому из пп.9, 10, содержащая глюкозу.

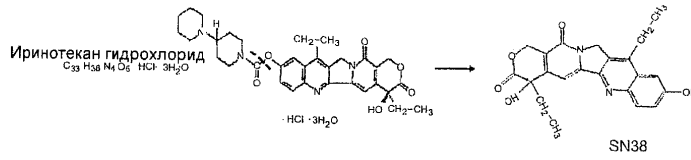
40 14. Фармацевтическая композиция биоконъюгата по п.13 в растворе глюкозы в концентрации 5% масс./об.

1
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

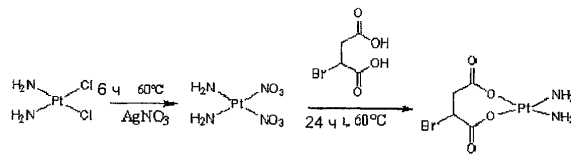


2
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

Фиг. 2

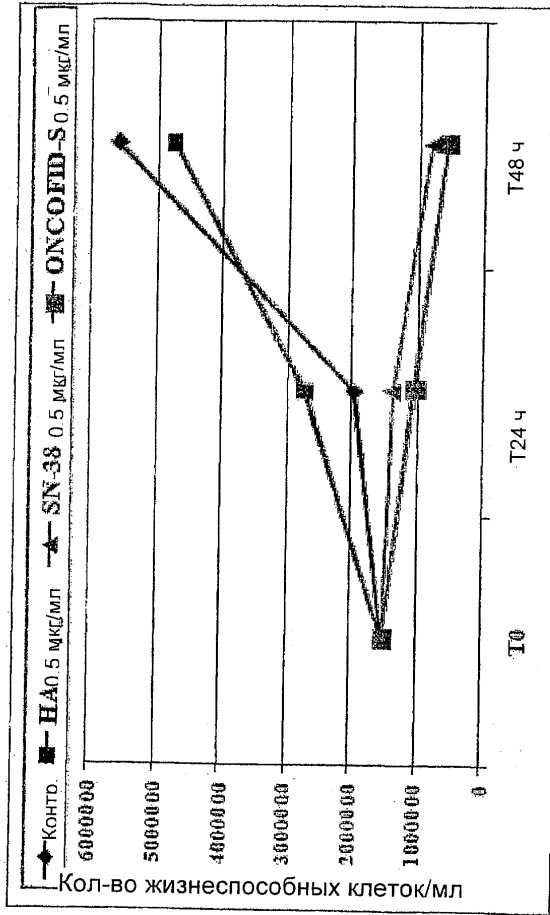


Фиг. 3

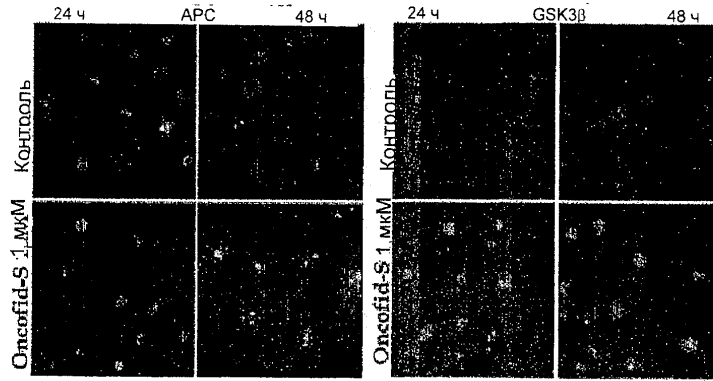


3
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

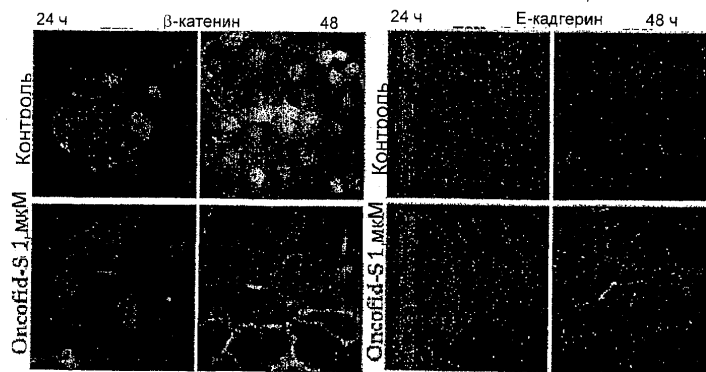
Фиг. 4
Клеточная жизнеспособность



4
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий



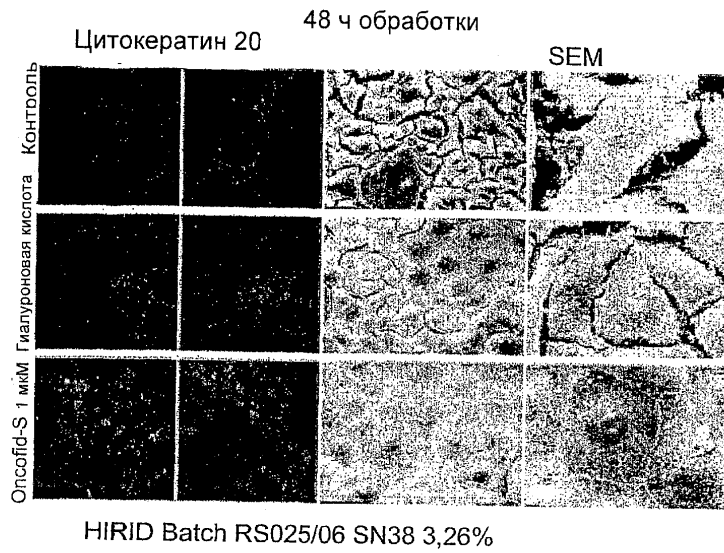
Фиг. 4a



Фиг. 4b

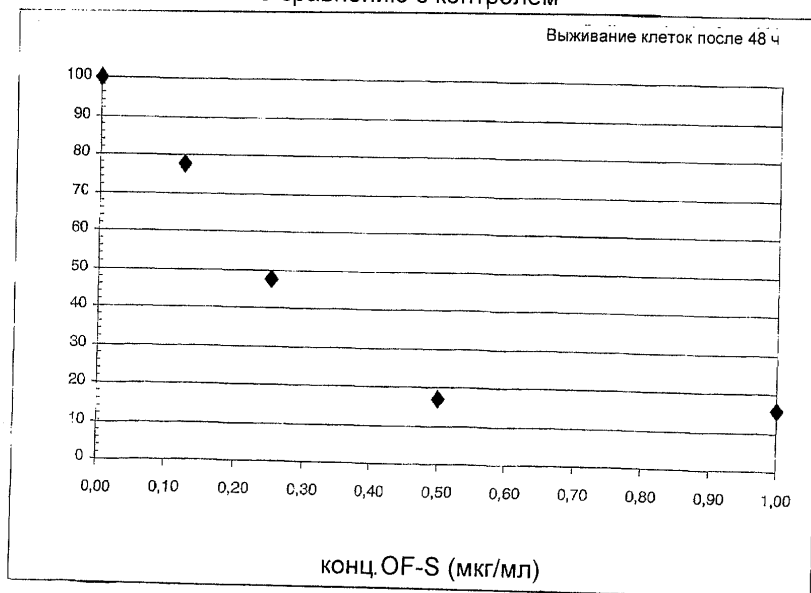
5
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

Фиг. 5



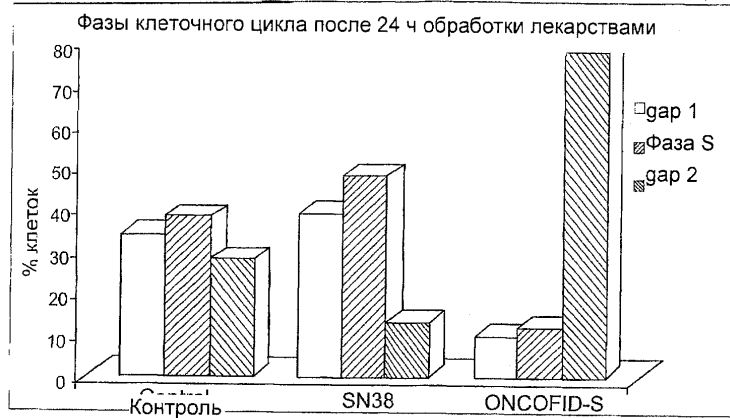
Фиг. 6

% Выживших клеток по сравнению с контролем



6 Терапевтическое применение новых фармацевтических препаратов, содержащих противоопухолевые лекарственные средства, связанные с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

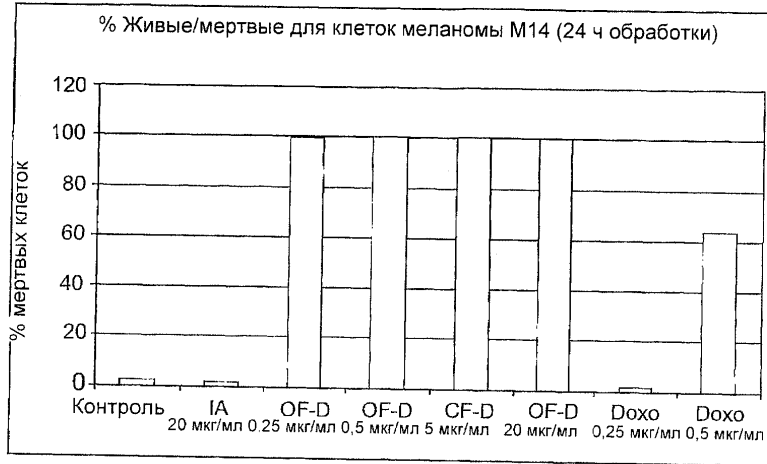
Фиг. 7



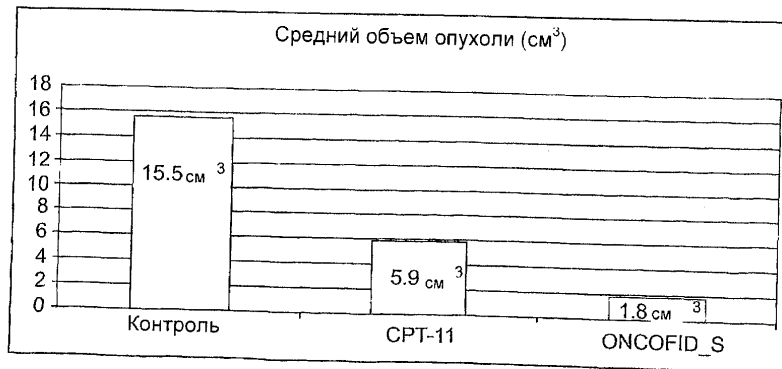
Фиг. 8

7
Терапевтическое применение новых
фармацевтических препаратов, содержащих
противоопухолевые лекарственные средства, связанные
с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

Фиг. 9

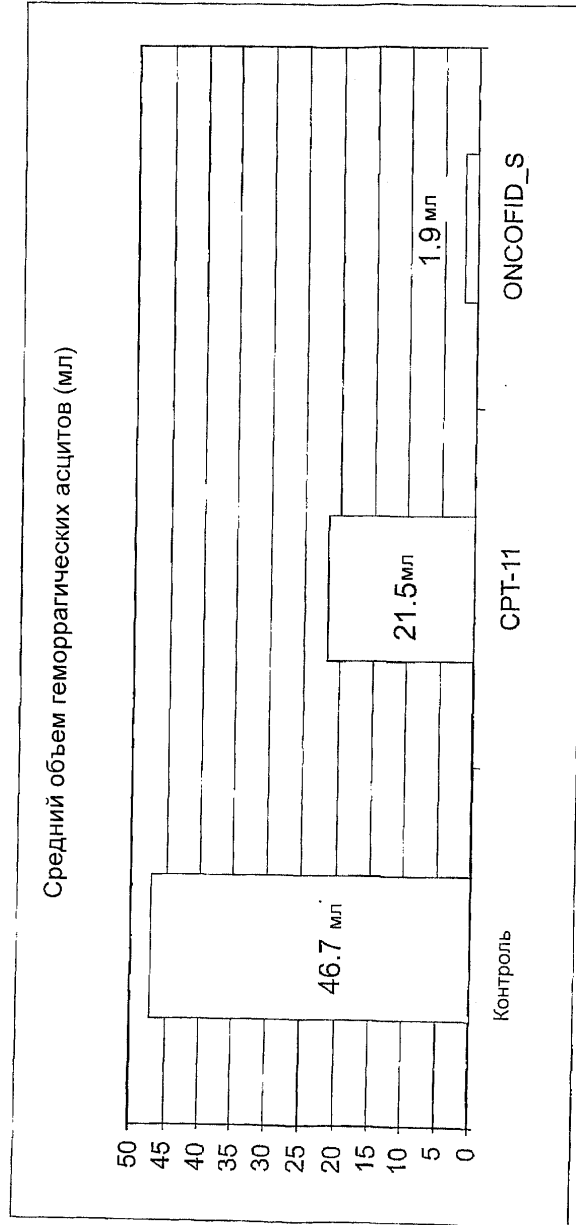


Фиг. 10

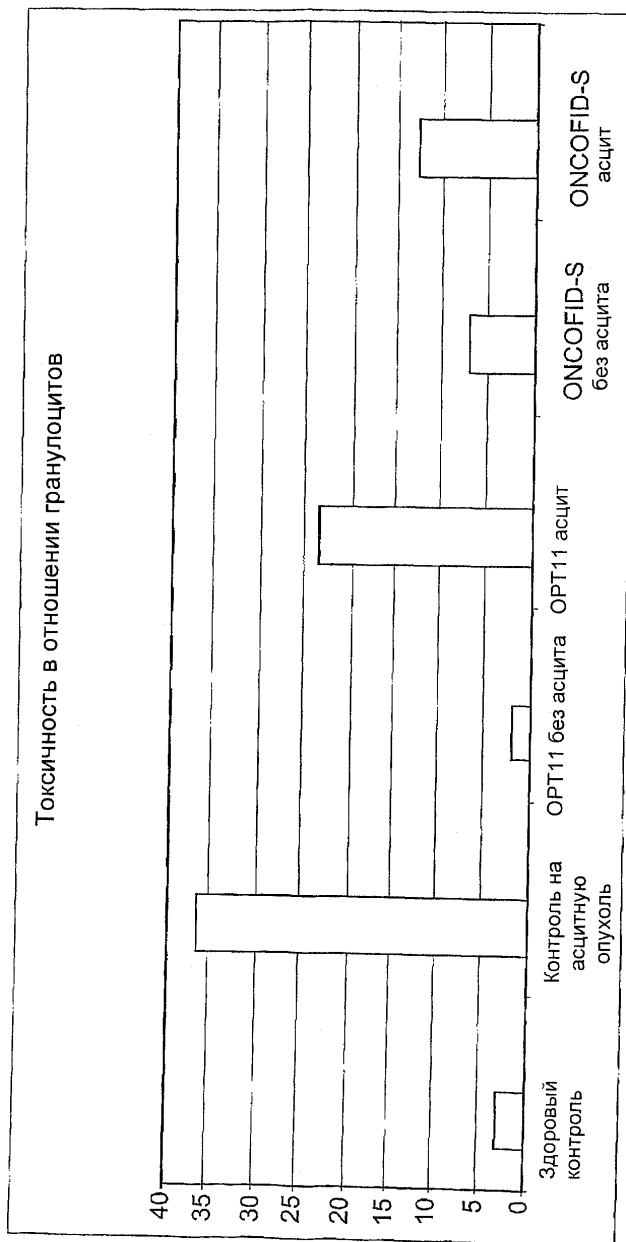


8
 Терапевтическое применение новых
 фармацевтических препаратов, содержащих
 противоопухолевые лекарственные средства, связанные
 с гиалуроновой кислотой, в лечении неоплазий

Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

