

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 015781

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2011.12.30

(21) Номер заявки  
200801132

(22) Дата подачи заявки  
2006.10.19

(51) Int. Cl. A61K 45/08 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

---

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

---

(31) 1327/MUM/2005; 1081/MUM/2006

(32) 2005.10.21; 2006.07.10

(33) IN

(43) 2009.02.27

(86) PCT/IN2006/000427

(87) WO 2007/069272 2007.06.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ПАНАЦЕЯ БИОТЕК ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:  
Сингх Амарджит, Сингх Сарабджит,  
Гупта Аджай К., Кулкарни Мангеш  
М. (IN)

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

(56) US-A-5683715  
US-A-5766635  
US-A1-2004/0247660

(57) Настоящее изобретение направлено на новые и улучшенные композиции противораковых лекарственных средств, предпочтительно таксанов, таких как паклитаксел и доцетаксел, их производных и их аналогов, способы получения этих композиций и способы фракционирования частиц на диапазоны размеров частиц и способы лечения пациентов, больных раком, этими композициями, которые снижают побочные эффекты, вызванные химиотерапией, особенно снижают алопецию, вызванную химиотерапией. Представленная композиция практически не содержит свободных лекарственных средств.

015781

B1

015781

B1

Настоящее изобретение имеет отношение к новым улучшенным композициям противораковых лекарственных средств. Оно имеет отношение к новым и улучшенным композициям для лечения рака, имеющим значительно уменьшенные побочные эффекты, вызванные химиотерапией.

Настоящее изобретение имеет отношение к новым улучшенным композициям противораковых лекарственных средств, включающих, в частности, алкилирующие лекарственные средства, антиметаболиты, антибиотические противораковые лекарственные средства, растительные алкалоиды, антрацендионы, природные вещества, гормоны, антагонисты гормонов, смешанные лекарственные средства, радиосенсибилизаторы, координационные комплексы платины, адренокортикальные супрессоры, иммуносупрессивные лекарственные средства, функциональные терапевтические лекарственные средства, генетические терапевтические лекарственные средства, антисмысловые терапевтические лекарственные средства, ингибиторы тирозинкиназы, моноклональное антитело, иммунотоксин, радиоиммуноконъюгат, раковую вакцину, интерферон, интерлейкин, суррогат мочевины, таксаны и ингибиторы COX-2.

Настоящее изобретение имеет отношение к новым улучшенным композициям противораковых лекарственных средств, предпочтительно таксанам, таким как паклитаксел и доцетаксел, их производным или их аналогам, способам получения этих соединений и способам лечения раковых больных этими композициями.

Настоящее изобретение имеет отношение к новым улучшенным композициям противораковых лекарственных средств, предпочтительно таксанам, таким как паклитаксел и доцетаксел, их производным или их аналогам, способам получения этих композиций и способам фракционирования частиц до точного диапазона размеров и способам лечения раковых больных этими композициями, которые предусматривают уменьшение побочных эффектов, вызванных химиотерапией, особенно алопеции, вызванной химиотерапией. Существенно то, что в такой композиции, как эта, нет свободных лекарственных средств.

Новые улучшенные композиции противораковых лекарственных средств, предпочтительно таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, их производные или их аналоги, это коллоидные системы доставки для лечения рака с существенно уменьшенной алопецией, вызванной химиотерапией, изготовленные с определенным диапазоном размеров, с отсутствием свободных лекарственных средств в композиции.

#### **Предшествующий уровень техники изобретения**

Широкий ряд противоопухолевых средств был разработан до настоящего времени для лечения различных типов рака молочных желез и новые средства были разработаны как химиотерапевтические, причем исследования были направлены на обнаружение специфичных опухолей противораковых лекарственных средств, наряду с увеличением эффективности против лекарственно-устойчивых опухолей. Последующие новейшие клинические протоколы включают комбинированные противораковые лекарственные средства для увеличения терапевтической эффективности. Такие новые открытия непрерывны, но на настоящий момент химиотерапевтические средства, такие как 5-фторурацил (5FU), доксорубин и таксаны, являются основой для лечения больных с различными формами рака, включающими рак яичника, молочной железы, легкого, толстой кишки, простаты, головы и шеи, спинного и головного мозга и других.

Тем не менее использование этих и других лекарственных средств ограничено связанной с ними токсичностью, включающей боль, миелосупрессию, алопецию, рвоту и стоматиты и, кроме того, кардиотоксичность.

Среди всех этих упомянутых выше связанных токсичностей алопеция (или потеря волос) вследствие химиотерапии это один из наиболее мучительных и травматичных побочных эффектов для больных раком, она вызывает депрессию, потерю самоуверенности, унижение у мужчин и женщин всех возрастов. Некоторые пациенты отказываются переносить лечение, потому что испытывают физический и эмоциональный страх, возникающий из-за алопеции, связанной с лечением. Потеря волос оказывает существенное воздействие на психологическое состояние пациентов и это серьезная проблема, влияющая на качество жизни пациентов. Таким образом, актуальность вынуждает предусмотреть тип лечения рака с существенно уменьшенной алопецией, вызванной химиотерапией.

Таксаны - противораковые цитотоксические средства, которые стабилизируют клеточные микротубулы. Соединения таксанов, подходящие для применения в композиции, и способы, описанные здесь, включают паклитаксел и доцетаксел, равно как и их природные и синтетические аналоги, которые обладают противораковой или противоангиогенной активностью. Паклитаксел и доцетаксел имеют значительную активность и один или оба из этих средств широко распространены как компоненты терапии для запущенного рака молочной железы, легкого и яичника.

Доцетаксел - антинеопластическое средство, принадлежащее к семейству таксоидов. Его получают полусинтезом, начиная с предшественника, извлеченного из возобновляемой биомассы хвои тиса. Таксотер® - стерильный концентрат доцетаксела для инъекций, доступный в однодозовых ампулах, содержащих доцетаксел и полисорбат 80, применяемый внутривенно после разбавления с разбавителем, таким как этанол в воде для инъекций, используется для лечения больных с местно распространенным или метастатическим раком молочной железы после неудачной предварительной химиотерапии. Таксотер в комбинации с доксорубицином и циклофосфамидом направлен на вспомогательное лечение больных с

операбельной узловой формой рака молочной железы.

Паклитаксел принадлежит к классу таксан химиотерапевтических лекарственных средств, широко использовался в течение многих лет во внутривенных формах для лечения рака молочной железы и яичников или немелкоклеточной карциномы легкого ("NSCLC"). Наряду с огромным потенциалом, который паклитаксел показал как противоопухолевое лекарственное средство, клинические проблемы с растворимостью, токсичностью, плохой биодоступностью и развитием лекарственной резистентности, достаточно сильны так, что очевидна потребность в разработке производных или аналогов паклитаксела с лучшей терапевтической эффективностью и меньшей токсичностью.

Паклитаксел (таксол®) доступен в качестве раствора для внутривенных инфузий с носителем, содержащим кремофор® EL, который, как было показано, вызывает токсические эффекты, такие как опасная для жизни анафилаксия. Такая композиция паклитаксела, содержащая кремофор/этанол, оседает до разбавления с жидкостью для инфузий, и фибриновый осадок формируется в различных композициях за время хранения в течение длительного периода времени. Дополнительную информацию, касающуюся разработок кремофора, можно найти у Agharkar и др., патент США 5504102.

Недавно представленный абраксан® - это связанные с белком плазмы частицы паклитаксела для инъекционной суспензии. Это альбуминсвязанная форма паклитаксела, которая быстро распадается в печени с высвобождением немедикаментозных лекарственных средств, которые затем циркулируют в крови для произведения начальной терапевтической реакции, однако они также проявляют токсические побочные эффекты, такие как полная потеря волос, инфекции вследствие низкого количества WBC, усталость, слабость, воспаление и т.д. Полная потеря волос, или алопеция, почти всегда возникает с такой формой дозирования паклитаксела. Она обычно включает потерю бровей, ресниц и волос головы.

Номера патентов США, зарегистрированные по отношению к препарату аброксан®, включают патенты 5439686; 5498421; 5560933; 5665382; 6096331; 6506405; 6537579, 6749868 и 6753006.

В соответствии с изобретением вышеупомянутых патентов предусмотренные композиции и способы используются для доставки *in vivo* практически водонерастворимых фармакологически активных лекарственных средств (таких как противораковое лекарственное средство паклитаксел), при этом действующее вещество доставляется в форме взвешенных частиц, соединенных или покрытых протеином, который выступает в качестве стабилизирующего агента. В этих изобретениях сделана попытка использовать импровизированные протеиновые микросферы для доставки практически водонерастворимых активных лекарственных средств в водные суспензии для парентерального введения, которые не вызывают аллергические реакции, вызываемые существующими эмульгаторами и растворителями, такими как кремофор, используемый в таксоле.

В патенте США 5439686 авторы обнаружили, что практически водонерастворимые фармакологически активные средства могут быть доставлены в форме микрочастиц, что подходит для парентерального применения в водной суспензии. Композиции по изобретению включают практически водонерастворимые активные средства (твердые или жидкие), заключенные изнутри в полимерную оболочку, полимерная оболочка является биологически совместимым полимером, сшитым за счет дисульфидных связей.

Патент США 5560933 раскрывает способ получения вышеуказанной композиции, в патенте заявлен способ получения практически водонерастворимых фармакологически активных лекарственных средств для доставки *in vivo*, где способ включает получение смеси, содержащей: диспергирующее средство, включающее фармакологически активное средство диспергированное в нем, и водную среду, содержащую биологически совместимый полимер, выполненный с возможностью сшивания дисульфидными связями до разрушения ультразвуком состояния на некоторое время, достаточное для активирования сшивания указанного биологически совместимого полимера дисульфидными связями для получения полимерной оболочки, содержащей фармакологически активное средство.

Патент США 6506405 раскрывает композицию получения паклитаксела для лечения первичной опухоли у пациента, которая достигает высокую местную концентрацию указанного паклитаксела со стороны опухоли, где композиция практически не содержит кремофор. Согласно '405 композиция, которая содержит альбумин и не содержит кремофор, демонстрирует уменьшение церебральной или неврологической токсичности, по сравнению с коммерчески доступными композициями Таксола, которые содержат кремофор.

Патент США 6749868 предусматривает систему доставки лекарственного средства, в которой одна часть молекул фармакологически активного средства связаны с белком (например, белок человеческой плазмы) и, следовательно, сразу же биодоступна после применения для вскармливающих, а другая часть фармакологически активного средства содержит внутри наночастицы покрытые протеином. Наночастицы лекарственного средства, покрытые протеином, получают с помощью высокого сдвига в отсутствие обычных сурфактантов на выходящие частицы с диаметром меньше чем 1 мкм, которые затем стерильно фильтруют для подготовки стерильных твердых соединений, пригодных для внутривенных инъекций.

В вышеуказанных патентах, посвященных аброксану®, предусматриваются способы применения паклитаксела, покрытого белком (таким как альбумин), где указанная протеиновая оболочка также имеет свободный протеин, связанный изнутри, так что порция активного средства содержится внутри протеи-

новой оболочки, а порция активного средства связана со свободным протеином для немедленного доступа после приема. Средний диаметр указанных частиц, описанных в указанных предварительных прототипных исследованиях, не больше чем 1 мкм, причем композиции состоят из частиц размером между 10-200 нм, специфически полученные такие малые частицы могут быть стерильно профильтрованы через 0,22-микронный фильтр. В основном использованием альбуминсвязанных лекарственных частиц (альбумин является биосовместимым материалом) исследователи добились снижения токсичности, такой как миелосупрессия и/или нейротоксичность фармакологически активных агентов, таких как паклитаксел, по сравнению с уже доступным таксолом, который включает в себя кремофор и связан с аллергическими реакциями и другими токсическими реакциями.

Но ни в одном из вышеуказанных патентов не описаны упомянутые способы получения композиций паклитаксела, где композиции имеют точный ограниченный диапазон размеров и, главным образом, не имеют свободных лекарственных средств для проведения терапии рака со значительно уменьшенной алопецией, вызванной химиотерапией, которая является одной из наиболее травмирующих побочных эффектов для больных раком.

Вышеперечисленные патенты, которые посвящены коммерчески доступному абраксану®, предусматривают продукт, в котором не используются эмульгаторы, такие как кремофор, вызывающий аллергические реакции, а описывают устойчивую, стерильную систему доставки из микро- или наночастиц для практически водонерастворимых активных средств, таких как паклитаксел, но они не предусматривают композицию паклитаксела, не имеющую или имеющую сниженные побочные эффекты, такие как алопеция или потеря волос. В аннотации к абраксану® в информации для пациента отмечается потеря волос как один из важных побочных эффектов при обследовании пациентов, принимающих абраксан®.

Представлена исследовательская научная публикация, направленная на изучение температур- и pH чувствительного ядра и оболочки наночастиц паклитаксела для внутриклеточной доставки Yang и др., *Front Biosci.* 2005 Sep. 1; 10:3058-67, в которой описывают инкапсулирование с температур- и pH чувствительным амфифильным полимерным поли(N-изопропилакриламид-со-акрилат-со-холестерилакрилат) (P(NIPAAm-co-AA-co-CHA)) для формирования наночастиц. Эта научная публикация, однако, не предусматривает способа получения этих композиций частиц, фракционирования частиц на точный ограниченный диапазон размеров и, главным образом, не имеющих свободных лекарственных средств, чтобы было возможно обеспечить композицию с значительно сниженной алопецией, вызванной химиотерапией, у больных раком.

Патент США 5399363 относится к противораковым наночастицам с модифицированной поверхностью, где частицы состоят преимущественно из кристаллических противораковых агентов, имеющих значительно модифицированную поверхность, в которой неионный и анионный сурфактант абсорбирован на поверхность с поддержанием оптимального среднего размера частиц менее чем 1000 нм. Использование сурфактанта само по себе действует на токсичность композиции. Использование точного ограниченного диапазона размеров наночастиц паклитаксела в композиции, включающей биоразрушаемые полимеры, для достижения снижения специфических побочных эффектов вызванных химиотерапией, например снижения алопеции не продемонстрировано в изобретении '363. Особенность изобретения '363 - наличие модификаторов несшитой поверхности, абсорбированных на поверхность кристаллических противораковых медикаментов.

Патента США 6136846 описывает композицию для доставки паклитаксела *in vivo*, включающую паклитаксел, растворитель, такой как этанол или пропиленгликоль и водорастворимый растворитель, такой как эстерифицированный сукцинат д- $\alpha$ -токофероловой кислоты. До '846 исследования были направлены на составления водонерастворимых лекарственных средств, таких как паклитаксел, с использованием 50% кремофора и 50% дегидратированного спирта, и эти соединения выпадают в осадок после разведения жидкостью для инфузий, являются нестабильными при хранении и вызывают неблагоприятные побочные эффекты, следовательно изобретение из '846 направлено на получение улучшенных соединений паклитаксела с использованием водорастворимых растворителей, отличных от кремофора с улучшенной долговременной стабильностью и безопасностью.

PCT публикация WO 2004/084871 относится к поли(лакто-со-гликолевой кислоте) и поли(лактовой кислоте) (PLA) наночастицам с низкомолекулярным весом и водорастворимое лекарственное средство и доставке лекарственного средства к неподвижным целям, где частицы постепенно высвобождаются в течение пролонгированного периода. В основном исследование WO '487 направлено на конвертирование водорастворимого, небелкового, с низкомолекулярным весом лекарственного средства в гидрофобное лекарственное средство путем взаимодействия его с ионами металла и затем инкапсулирование гидрофобизированного лекарственного средства в PLGA или PLA наночастицы и абсорбированием сурфактанта на поверхность частиц. Данный патент не описывает и не указывает на противораковые лекарственные средства, такие как паклитаксел и другие, и не предусматривает композицию, которая имеет уменьшенные побочные эффекты, вызванные химиотерапией.

Публикация исследования, изданного Fonseca и др. в "*Journal of Controlled Release* 83 (2002), 273-286", направлена на разработку полимерной транспортной системы лекарственного средства для пакли-

таксела, такой как наночастицы поли(лакто-со-гликолевой кислоты), отягощенные паклитакселом для внутривенного применения, который способен улучшать терапевтический индекс лекарственного средства и лишен побочных эффектов, связанных с кремофором. Тут и во многих других предыдущих исследованиях размеры частиц составляют менее чем 200 нм. Авторы не указывают композицию, которая не имеет лишних лекарственных средств и имеет точный ограниченный диапазон размеров, который имеет необычные неожиданные преимущества, как показано исследователями в настоящем изобретении.

В заявке на патент США 20060041019 раскрывается средство для ингибирования потери волос, вызванной противоопухолевым агентом, где средство - это микстура циклической и/или прямолинейной цепей полилактовых кислот, имеющая степень конденсации от 3 до 20. Преимущественно микстура циклической и/или прямолинейной цепей полилактовых кислот по авторам заявки '019 - это микстура полилактовых кислот, которую получают полимеризованием лактида настоящего соединения, представленного формулой (3):  $\text{Me-N(R}_{\text{sup.1}}\text{)(R}_{\text{sup.2}}\text{)}$ , где Me представлен щелочным металлом и R<sub>sup.1</sub> и R<sub>sup.2</sub>, каждый независимо, представляют алифатическую группу или ароматическую группу.

Таким образом было показано, что ни одно из этих предыдущих изобретений не описывает композицию и способ получения композиций, содержащих противораковые лекарственные средства, такие как паклитаксел, доцетаксел и другие со значительно сниженными побочными эффектами, вызывающими алопецию.

Вследствие этого необходимы новые и улучшенные композиции, включающие противораковые лекарственные средства, способы лечения с использованием этих композиций для преодоления проблем стабильности и для уменьшения различных клинических побочных эффектов ранее известных в продаже композиций, более точно для уменьшения алопеции или потери волос, вызванных лечением, и способы их получения. Существует необходимость в таких лекарственных средствах, как, например, 5-фторурацил, доксорубин, доцетаксел, паклитаксел, их производные и/или их аналоги.

### Цель изобретения

Цели изобретения:

- 1) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, имеющие значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция;
- 2) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, включающие по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство и один полимер, где вследствие ограниченного промежутка размеров частиц композиция имеет значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция;
- 3) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше, где композиция, кроме того, не имеет свободных лекарственных средств, а лекарственные средства главным образом полностью связаны с полимером(ми);
- 4) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, включающие по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство и один полимер, где частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм; композиция, такая как эта, имеет сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция;
- 5) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 4), где частицы имеют  $D_{10} \geq 120$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 350$  нм;
- 6) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 5), где частицы имеют  $D_{10} \geq 140$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 260$  нм;
- 7) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше, где противораковое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из алкилирующих агентов, антиметаболитов, антибиотических лекарственных средств, растительных алкалоидов, антрацендионов, природных препаратов, гормонов, антагонистов гормонов, смешанных средств, радиосенсибилизаторов, координационных комплексов, адренокортикоидных супрессантов, иммуноподавляющих средств, функциональных терапевтических средств, генных терапевтических средств, антисмысловых терапевтических средств, ингибиторов тирозин киназы, моноклонального антитела, иммунотоксина, радиоиммунно-конъюгата, вакцины рака, интерферона, интерлейкина, суррата мочевины, таксанов и COX-2 ингибиторов;
- 8) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 7), где противораковое лекарственное средство преимущественно выбрано из производных таксана (таких как паклитаксел, доцетаксел), 5-фторурацил и доксорубин;
- 9) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше, где противораковое лекарственное средство, это паклитаксел, массовая доля которого в композиции составляет от 0,5 до 99,5% и содержащей от 2,0 до 99,0% массовой доли полимеров;
- 10) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше, где полимер - это биodeградируемые полимеры, такие как белок человеческой плазмы, поли(d,l-лакто-со-гликолевая кислота) и подобные, занимающие от 2,0 до 99,0% веса композиции;
- 11) получить вышеперечисленные новые и улучшенные композиции для лечения рака с вторичным

полимером, выбранным из группы, состоящей из температурно- и pH чувствительных полимеров, таких как поли(N-ацетилакриламид), поли(N-изопропилакриламид), поли(N-изопропилакриламид-со-акриламид), поливинилалкоголь, полиэтиленгликоль, полиакриламид, поли(метакриламид) и подобные, и их производных;

12) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 11), где вторичный полимер - это поли(N-изопропилакриламид), используемый в количестве, выбранном из группы, содержащей от 0,5 до 99% массовой доли, от 1,0 до 95,0% и от 2,0 до 90,0% массовой доли композиции;

13) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 11), где в присутствии вторичного полимера, частицы композиции, после применение на млекопитающих, увеличиваются в размерах в два раза от исходного размера, и в десять раз от исходного размера в месте опухоли, следовательно, обеспечиваются заданные и существенно уменьшенные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алоpecia;

14) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 1, где композиция включает паклитаксел с массовой долей от 0,5 до 99,5%, поли(d,l-лакто-когликолевая кислота) с массовой долей от 2,0 до 99,0%, и, необязательно, поли(N-изопропилакриламид) с массовой долей от 2,0 до 90,0%, и один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей или их комбинации с массовой долей от 0,01 до 99,9% к весу композиции;

15) получить новые и улучшенные композиции для лечения рака, как описано выше в 1, где композиция включает паклитаксел с массовой долей от 0,5 до 99,5%, альбумин с массовой долей от 2,0 до 99,0%, и, необязательно, поли(N-изопропилакриламид) с массовой долей от 2,0 до 90,0%, и один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей, или их комбинаций с массовой долей от 0,01 до 99,9% к весу композиции;

16) внедрить способ получения новых и улучшенных композиций, как описано выше, включающий следующие стадии: (i) смешивание по меньшей мере одного противоопухолевого лекарственного средства по меньшей мере с одним полимером в растворителе; (ii) необязательно осуществление стадии (i) с наличием одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ; (iii) получение наночастиц удалением растворителя и распределение наночастиц по размерам; (iv) удаление любых свободных средств из композиции; композиция, такая как эта, приводит к существенному уменьшению побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алоpecia;

17) получить способ лечения млекопитающих от рака, включающий стадию применения к млекопитающим терапевтически эффективных указанных новых и улучшенных композиций, включающих частицы по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства и по меньшей мере одного полимера, где частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм, композиция, такая как эта, не имеет свободных средств и приводит к существенному уменьшению побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алоpecia;

18) получить способ, уменьшающий побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алоpecia, при лечении рака у млекопитающих, подвергающихся лечению противораковыми лекарственными средствами, указанный способ включает применение терапевтически эффективных указанных новых и улучшенных композиций, включающих частицы, по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства и по меньшей мере одного полимера, где частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм, и композиция, такая как эта, не имеет свободных лекарственных средств.

#### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение направлено на новые улучшенные композиции для лечения рака, имеющие значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией.

Настоящее изобретение направлено на новые и улучшенные композиции противораковых лекарственных средств, предпочтительно плохо растворимые противораковые лекарственные средства, способ их получения и способы лечения раковых пациентов этими композициями, имеющими значительно сниженные побочные эффекты, такие как алоpecia.

Важный аспект изобретения направлен на коллоидные системы доставки, такие как композиции в форме наночастиц с противораковыми лекарственными средствами, такими как таксаны (паклитаксел или доцетаксел) и по меньшей мере с одним биоразлагаемым полимером, причем композиция, такая как эта, имеет определенный диапазон размеров частиц, где частицы имеют  $D_{10}$  более чем или равный 80 нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90}$  менее чем или равный 450 нм. Такой специфический определенный диапазон частиц обеспечивает композицию, которая при применении пациентами для лечения рака, вызывает значительное снижение побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алоpecia. Композиция, такая как эта, предпочтительна, так как она по существу не имеет свободных средств и лекарственное средство, главным образом, полностью связано с полимером.

Другой аспект изобретения направлен на обеспечение таких композиций в форме наночастиц, дополнительно содержащих вторичный полимер, который температурно- и pH-чувствителен, и, необязательно, другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, равно как и любые другие желаемые наполнители.

Такие композиции обеспечивают частицы, которые при введении млекопитающему, увеличиваются в размерах в два раза от исходного размера в плазме, и в десять раз от исходного размера в месте опухоли, следовательно, обеспечивают заданные и существенно уменьшенные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция. Это изобретение в дальнейшем описывает способ получения таких композиций в форме наночастиц, включающий стадии смешивания, по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства по меньшей мере с одним полимером при наличии растворителя, имеющего, необязательно, одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, равно как и любых других желаемых наполнителей для получения наночастиц, удаление растворителя и распределение частиц по размерам, для получения частиц с размерами  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм. Частицы, распределенные в диапазоне размеров, в дальнейшем подвергаются удалению любых свободных лекарственных средств. Такая композиция при применении на пациентах значительно снижает побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция.

Настоящее изобретение направлено на внедрение способа лечения, включающего введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции в форме наночастиц, согласно изобретению, что обеспечивает значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция. Изобретение обеспечивает способ для уменьшения побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алопеция, при лечении рака у млекопитающих, подвергающихся лечению противораковыми лекарственными средствами, за счет применения указанных терапевтически эффективных композиций в форме наночастиц по настоящему изобретению.

Предшествующие общее описание и последующее подробное описание являются иллюстративными и пояснительными и предполагают обеспечить понимание заявленного изобретения. Другие объекты, преимущества и новые признаки будут полностью очевидны специалисту в данной области техники из следующего подробного описания изобретения.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение обеспечивает новые и улучшенные композиции для лечения рака.

Многие новейшие противораковые лекарственные средства разработаны для лечения опухолей у млекопитающих, но основной недостаток противораковых или противоопухолевых лекарственных средств в том, что они не оказывают специфического и селективного влияния на клетки опухоли, а также действуют на нормальные клетки и, следовательно, вызывают побочные эффекты.

Предпринимается множество попыток в области доставки лекарственных средств к месту действия для улучшения эффективности и также предпринимаются попытки для внедрения сочетанной лекарственной терапии для увеличения эффективности противораковых лекарственных средств. Кроме того, возникновение побочных эффектов - главная проблема, которая до сих пор не рассмотрена полностью, один из таких главных побочных эффектов - это алопеция или потеря волос.

Потеря волос, или алопеция, это стрессовый побочный эффект для лиц, подвергающихся химиотерапии. У многих пациентов, подвергающихся химиотерапии, большой уровень алопеции. Отрастание волос после химиотерапии занимает от 3 до 6 месяцев, у некоторых пациентов отрастание не происходит полностью. Алопеция, вызванная химиотерапией, особенно подавляющая, потому что она является внешним признаком иного скрытого заболевания, что заставляет некоторых пациентов отказаться от системной химиотерапии.

В соответствии с наиболее предпочтительным аспектом настоящего изобретения предложены новые и улучшенные композиции для лечения рака со значительно сниженными побочными эффектами. Побочный эффект в основном это алопеция, вызванная химиотерапией. Композиция настоящего изобретения включает по меньшей мере одно противоопухолевое лекарственное средство и по меньшей мере один полимер.

Противораковое лекарственное средство, подходящее для настоящего изобретения, выбирается из группы, состоящей из алкилирующих веществ, антиметаболитов, антибиотических противораковых веществ, растительных алкалоидов, антрацендионов, природных продуктов, гормонов, антагонисты гормонов, смешанных лекарственных средств, радиосенсибилизаторов, координационных комплексов платины, аденокортикальных супрессоров, иммуносупрессивных лекарственных средств, функциональных терапевтических лекарственных средств, генетических терапевтических лекарственных средств, анти-смысловых терапевтических лекарственных средств, ингибиторов тирозинкиназы, моноклональных антител, иммунотоксичных, радиоиммуноконъюгатов, раковых вакцин, интерферона, интерлейкина, суррогата мочевины, таксанов и ингибиторов СОХ-2.

Группа, указанная выше, включает алкилирующие агенты, включающие алкилсульфонаты, такие как бусульфид, производные этиленмина, такие как тиотепа, азотистые иприты, такие как хлорамбутан, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мелфалан и урамустин, нитрозомочевина, такая как кармустин, ломустин и стрептоцин, триазаны, такие как дакарбазин, прокарбазин, темозоломид и компоненты платины, такие как цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, сатраплатина и (SP-4-3)-(цис)-аминодихлоро-[2-метилпиридин]платина(II); антиметаболиты, включающие антифолаты, такие как метотрексат, перметрексед, ралтитрексед и триметотрексат, пуриновые аналоги, такие как кладри-

бин, хлородеоксиаденозин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин, пентостатин и тиогуанин, аналоги пиримедина, такие как азациитидин, капцитабин, цитарабин, эдотрексат, флоксуридин, фторурацил, гемцитабин и троксацитабин; природные продукты, включающие противоопухолевые антибиотики, такие как блеомицин, дактиномицин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, порфирамицин и антрациклины, такие как даунорубицин (включая липосомальный даунорубицин), доксорубицин (включая липосомальный доксорубицин), эпирубицин, идарубицин и валрубицин, ферменты, такие как L-аспарагиназа и PEG-L-аспарагиназа, микротубулярные полимерные стабилизаторы, такие как Таксаны, паклитаксел и доцетаксел, ингибиторы митоза, такие как алкалоиды барвинка винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, ингибиторы топоизомеразы I, такие как камптотецины, иринотекан и топотекан, и ингибиторы топоизомеразы II, такие как амсакрин, этопосид и тенипосид; гормоны и антагонисты гормонов, включающие: андрогены, такие как флуоксиместерон и тестостерон, антиандрогены, такие как бикалутамид, ципротерон, флутамид и нилутамид, ингибиторы ароматазы, такие как аминоглутетимид, анастрозол, экземестан, форместан и летрозол, кортикостероиды, такие как дексаметазон и преднизолон, эстрогены, такие как диэтилстилбестрол, антиэстрогены, такие как фулвестрант, ралоксифен, тамоксифен и торемифин, LHRH агонисты и антагонисты, такие как бусерелин, гoserелин, леупролид, трипторелин, прогестины, такие как медроксипрогестерон ацетат и мегестрол ацетат, тиреоидные гормоны, такие как левотироксин и лиотиронин; и смешанных лекарственных средств, включающих алтретамин, триоксид мышьяка, нитрат галлия, гидроксимочевина, левомизол, митотан, октреотид, прокарбазин, сурамин, талидомид, фотодинамические соединения, такие как метоксален, порфирин натрия, ингибиторы протеасомы, такие как бортезомиб. Молекулярные целевые терапевтические лекарственные средства включают функциональные терапевтические лекарственные средства, включающие генетические терапевтические лекарственные средства, антисмысловые терапевтические лекарственные средства, ингибиторы тирозинкиназы, такие как эрлотиниб гидрохлорид, gefitinib, иматиниб мисилат и семаксониб, и модуляторы экспрессии генов, такие как ретиноиды и ретиноиды и т.д., адапален, бексаротен, трансретиноевая кислота, 9-цис-ретиноевая кислота и N-(4-гидроксифенил)ретинамид; фенотипнаправленные терапевтические лекарственные средства, включающие моноклональные антитела, такие как алемтузумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, ибритумомаб, тиуксетан и трастузумаб, иммунотоксины, такие как гемтузумаб, озогамизин, радиоиммуноконъюгаты, такие как <sup>131</sup>I-тоситумомаб и раковые вакцины. Биологические терапевтические лекарственные средства, включающие интерфероны, такие как интерферон- $\alpha_{2a}$  и интерферон- $\alpha_{2b}$ , и интерлейкины, такие как алдеслейкин, денилейкин, дифитокс и опрелвекин. В дополнение к этим веществам, направленным на действие против клеток рака, терапия рака включает использование защитных или добавочных лекарственных средств, включающих цитопротективные вещества, такие как амифостин, дексразоксан и месна, фосфонаты, такие как памидронат и золедроновая кислота, и стимулирующие факторы, такие как эпоэтин, дарбепоэтин, филграстим, PEG-филграстим и сарграмостим. Предпочтительно противораковые лекарственные средства - это плохо растворимые противораковые лекарственные средства.

Противораковые лекарственные средства, используемые в настоящем изобретении, это таксаны и их производные (например, паклитаксел, доцетаксел, их производные и подобные), но не исключает другие противораковые лекарственные средства, такие как, например, доксорубицин, метотрексат, цисплатина, даунорубицин, адриамицин, циклофосфамид, актиномицин, блеомицин, эпирубицин, митомицин, метотрексат, 5-фторурацил, карбоплатина, кармустин (BCNU), метил-CCNU, цисплатина, этопосид, интерфероны, камптотецин, фенестерин, тамоксифен, пипосульфат, их производные и подобные. Предпочтительные противораковые лекарственные средства - это лекарственные средства, выбранные из таксанов, 5-фторурацил и доксорубицин, наиболее предпочтительны таксаны.

Термин "таксан", используемый в данном описании, включает химиотерапевтические лекарственные средства таксол (непатентованное название: паклитаксел; химическое название: 5.бета.20-эпокси-1,2,4,7.бета,10.бета,13a-h-эксагидрокситакс-11-эн-9-один,4,10-диацето 2-бензоат 13-эфир с (2R,3S)-N-бензоил-3-фенилизосерин) и таксотер (непатентованное название: доцетаксел), второе поколение таксанов, такие как ортатаксел и другие полусинтетические производные таксанов. Таксол, противораковое лекарственное средство, подробно указанное в уровне техники, имеет непатентованное название "паклитаксел", зарегистрированное торговое название "Таксол.RTM" (Bristol-Myers Squibb Company), это комплекс полиоксигенированных дитерпенов, изначально выделенный из тиса тихого (*Taxus brevifolia*). Он был одобрен FDA для лечения рака груди, яичников и легких, также как СПИД-ассоциированная саркома Капоши. Таксотер-R (доцетаксел), вещество аналогичное паклитакселу, также происходящее из хвои тисового дерева, одобрено FDA для лечения запущенного рака груди и немелкоклеточного рака легких, которые не реагируют на другие противораковые лекарственные средства. Паклитаксел и доцетаксел применяют внутривенно. Но оба имеют побочные эффекты, которые могут быть тяжелыми. Паклитаксел не растворим в воде, создан из таксола с использованием кремофора Е (полиэтоксилированное касторовое масло) и этанола как наполнители, которые вызывают серьезные побочные эффекты. Высокая частота возникновения анафилактических реакций и других гиперчувствительных реакций были отображены у таксола. Недавно новая наночастичная инъекционная суспензия паклитаксела, связанная с протеином,



была представлена под названием аброксан®, в которой не использован кремофор и растворители, и связанных с ними побочных эффектов. Но даже эта композиция вызывает другие побочные эффекты, вызванные химиотерапией, один из которых наиболее травматичный, это алопеция, или потеря волос. Так, несмотря на хорошую клиническую эффективность паклитаксела и признанию его как одного из наиболее прогрессивного в онкологии, существует потребность во внедрении композиции со значительно лучшим, безопасным фармакокинетическим профилем у пациентов, подвергающихся наиболее травматичным побочным эффектам, таким как алопеция.

Наиболее предпочтительным таксаном, выбранным для настоящего исследования, является паклитаксел, но должно быть понятно, что такое исследование может быть расширено другими противораковыми лекарственными средствами с таким же успехом, детали которого тут пояснены. Паклитаксел, представленный в настоящей композиции по настоящему изобретению, в количестве от 0,5 до 99,5% к весу, предпочтительно от 2,0 до 95,0% и наиболее предпочтительно от 5,0 до 90,0% к весу композиции.

Противораковые лекарственные средства могут быть использованы в настоящем изобретении одни или в комбинации с одним или более другими средствами. Они могут быть некристаллическими, кристаллическими или смешанными, предпочтительно лекарственное средство почти некристаллическое.

В настоящем изобретении приняты следующие термины.

"Фармакологически приемлемый" в данном случае относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках озвучивания медицинской экспертизы доступны для контакта с тканями людей и животных, без лишней токсичности, раздражения, аллергических реакций или других проблем или осложнений, сопоставимых с резонным соотношением преимуществ/риск.

"Терапевтически эффективная дозировка" относится к тем дозировкам, которые эффективны для достижения желаемого терапевтического эффекта.

Термин "полимер" в данном случае относится к молекуле, содержащей множество ковалентно прикрепленных мономерных единиц, включающих разветвленные, дендримерные и звездообразные полимеры наряду с линейными полимерами. Термин также включает гомополимеры и сополимеры, например смешанные сополимеры, блок-сополимеры и графт-сополимеры, наряду с распрямленными сцепленными полимерами, и слегка умеренно практически скрещенные полимеры.

Термин "биоразлагаемые полимеры" означает то, что полимер должен разложиться под воздействием физических процессов до соединений, абсолютно лишних для тела, не должен аккумулироваться в теле и термин "биологически совместимый" описывает вещество, не вызывающее изменения или нарушений по любому вредному пути на биологические системы, на которые он направлен.

"Плохо растворимый" в данном случае означает то, что активное вещество имеет растворимость в воде менее чем приблизительно 10 мг/мл, предпочтительно менее чем 1 мг/мл при комнатной температуре.

Как указывается в данном случае, "размер частиц" означает размер частиц композиции в диаметре, измеренный стандартным анализатором размеров частиц, известным специалистам в данной области техники, при такой технологии, как оседание участка дробной фракционной перегонки, фотокорреляционная спектроскопия, лазерное рассеивание света или динамическое рассеивание света и с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (ТЕМ) или сканирующего электронного микроскопа. Удобное автоматическое рассеивание света осуществляется с помощью анализатора размеров частиц лазерного рассеивания света Horiba LA или схожим устройством. Такие анализы обычно представляют объемную долю, нормированную по частоте, отдельных размеров частиц, включающих исходные частицы, агрегаты и агломераты. В настоящем описании характеристики размеров частиц часто относятся к обозначению D<sub>n</sub> типа, который пронумерован от 1 до 99; это описание представляет распределение кумулятивных вероятностей размеров частиц, так что n% (по объему) частицы меньше или равны обозначенному размеру. Типично размер частиц отображается в виде D<sub>10</sub>, D<sub>40</sub> (среднее) и D<sub>90</sub> величин в нм размере. Соотношение D<sub>90</sub>/D<sub>10</sub> - удобная характеристика для идентификации кривой распределения интервала размеров частиц. В различных аспектах настоящего изобретения распределение размеров частиц тщательно, предпочтительно имеющее соотношение D<sub>90</sub>/D<sub>10</sub> менее чем 4, более предпочтительно менее чем 3 и даже более предпочтительно чем 2,0.

Как использовано в данном случае, термин "нм" означает нанометр, размер менее чем 1 мкм, где мкм - это единица измерения, равная одной тысячной миллиметра.

Как использовано в данном случае, термин "приблизительно" будет понятен средним специалистам и будет меняться на некотором протяжении контекста, в котором он будет использоваться. Если, в данном случае, будет использоваться термин, который не понятен средним специалистам, приводится контекст, в котором он используется, "приблизительно" будет означать плюс или минус 10% размеров частиц. Это понятие применимо к использованию термина "приблизительно" в контексте данной заявки, когда оно объясняет % или количество противораковых лекарственных средств, носителей, вспомогательных веществ и других исключений в случае описания размеров частиц настоящего изобретения, где слово "приблизительно" означает размер частиц плюс минус 25%. Это обозначает то, что D<sub>50</sub> приблизительно 200 означает диапазон размера частиц от 150 до 250 нм.

Термин "побочные эффекты, вызванные химиотерапией", используемые здесь описывают неблагоприятные симптомы, возникающие у млекопитающих во время приема противораковых лекарственных средств. Примеры их включают потерю волос, миелосупрессию, рвоту, расстройства пищеварительного тракта, гепатотоксичность, нефротоксичность, церебротоксичность, кардиотоксичность, пульмотоксичность, стоматиты, дерматопатии и нейротоксичность. Новая и улучшенная композиция согласно изобретению предназначена для ингибирования или замедления облысения (или алопеции) с наименьшим количеством вышеупомянутых побочных эффектов.

"Алопеция", или облысение, согласно данному описанию, предпочтительно связана с лекарствами, индуцирующими алопецию, которые повреждают волосные фолликулы. Необходимо понять, что волосные фолликулы кожи головы имеют самую высокую скорость роста, и период их роста длительный, что обусловлено наивысшей биологической активностью волосного органа кожи головы по сравнению с волосными органами других областей туловища. Волосной орган кожи головы чувствителен к противораковым лекарственным средствам, что влечет за собой повреждение клеток матрикса волоса в волосных фолликулах. Следовательно, страдает функция роста клеток матрикса волоса, или волосной орган быстро переходит в интерфазу, и атрофичные волосы выпадают.

Ранние попытки замедлить выпадение волос, обусловленное химиотерапией, включали в себя прием противораковых лекарственных средств с антагонистом, блокирующим ток крови к коже головы, внутриартериальное введение и др., но ни одна попытка до настоящего времени не имела какого-либо значимого эффекта. В данном изобретении была предпринята попытка выполнить это задание с помощью безопасной, эффективной, простой новой технологии.

Систематическое и подробное исследование различных композиций, включающих в себя противораковое лекарственное средство и по меньшей мере один полимер в дисперсной форме, выявило удивительную и очень полезную находку, заключающуюся в том, что физико-химические факторы, такие как геометрия частиц, играют очень важную роль в создании композиций для лечения рака с меньшим количеством побочных эффектов, таких как алопеция. Они включают в себя размер частиц, форму, текстуру, поверхностные характеристики, такие как поверхностный заряд, поверхностная гидрофобность, масса, молекулярная масса, объем, дробность, какую-либо морфологию, и, такие как диаметр частиц (один из самых важных факторов) были подробно изучены в настоящем изобретении. Когда композиция, включающая в себя частицы, размер которых находится в определенных пределах, применяется как способ лечения рака, она подвергается селективному биораспределению, что обеспечивает большую ее целенаправленность по отношению к месту действия и существенное уменьшение числа побочных эффектов, таких как алопеция.

Известно, что частицы, размер которых измеряется в нанометрах, после приема внутрь попадают в кровоток и задерживаются в эпителиальных клетках опухоли, проникая туда через проницаемую сосудистую сеть, охватывающую опухолевые клетки. Также из литературы известно, что частицы размером более 200 нм предпочтительно распознаются клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) и, таким образом, попадают в органы, такие как печень, легкие, селезенка, лимфатическая система и удаляются из системного кровотока. Большая часть наносистемы (90%), введенной внутривенно, большей частью теряется в ретикулоэндотелиальной системе, в основном захватывается макрофагами в печени и селезенке после опсонизации белками, присутствующими в кровотоке. Таким образом, опсонизация, или удаление наночастиц лекарственного средства из кровотока, происходит через систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ), известную также, как ретикулоэндотелиальная система (РЭС). Это считается главной помехой целенаправленному действию лекарственного средства. В одной статье (Current Nanoscience, 2005, 1, 47-64) упомянуто, что частицы размером менее 100 нм с гидрофильной поверхностью подвергаются сравнительно низкой опсонизации и выведению путем захвата ретикулоэндотелиальной системой. Таким образом, большинство предыдущих попыток сделать противораковые композиции лучше и эффективнее было направлено на получение композиций с размером частиц менее 1 мкм, предпочтительно до 200 нм или 100 нм, чтобы задержать частицы в кровотоке и избежать их захвата РЭС и целенаправленного действия на опухоль. Но в большинстве композиций этого уровня техники размер частиц удерживался в пределах до 1 мкм, предпочтительно до 200 нм в диаметре, включая частицы до 70 нм в диаметре. Ни в одной из этих попыток не было установлено, что частицы размером до 70 нм проникают из капилляров в кожу и корень волоса, и, таким образом, композиции, используемые для лечения рака, содержащие такие частицы, могут стать причиной побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алопеция. Микроциркуляторное русло опухолей неоднородно и высокопроницаемо, и в среднем диаметр пор эндотелия сосудов опухолей составляет  $108 \pm 32$  нм. Таким образом, они более неоднородны и значительно больше пор нормальных капилляров, диаметр которых составляет  $58 \pm 9$  нм. Таким образом, частицы размером более 70 нм не могут проникнуть через нормальные капиллярные сосуды и тем самым значительно уменьшают потерю волос.

В настоящем изобретении была предпринята успешная попытка создать обновленную и улучшенную композицию для лечения рака, включающую в себя частицы по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства и по меньшей мере одного полимера, где размер частиц менее 1 мкм в диа-

метре. Предпочтительно частицы имеют размеры  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм,  $D_{90} \leq 450$  нм, т.е. частицы такого диапазона размеров, что 90% частиц имеют размер менее 450 нм и только 10% - менее 80 нм, а 50% - приблизительно 200 нм. Более предпочитаемый размер частиц  $D_{10} \geq 120$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм,  $D_{90} \leq 350$  нм. Наиболее предпочитаемый размер частиц  $D_{10} \geq 140$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм,  $D_{90} \leq 260$  нм.

Был отмечен удивительный факт, что частицы приблизительно 220 нм не захватываются РЭС и остаются в кровотоке, позволяя целенаправленно воздействовать на опухоль, и частицы, размер которых не менее 70 нм предотвращают их попадание в волосяной фолликул, что позволяет значительно уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии, таких как алопеция.

Было обнаружено, что частицы по настоящему изобретению аккумулируются в тканях, не содержащих РЭС, таких как простата, поджелудочная железа, яички, молочная железа, семенные каналы, кости и т.д. в значительно больших количествах и предупреждают возникновение алопеции, что отражает их пониженное накопление в таких местах, как кожа и волосяные фолликулы.

Необходимо понять, что каждый волосяной фолликул непрерывно проходит через три стадии: анаген (рост), катаген (инволюция), телоген (выпадение). Анаген следует за катагеном и, в конечном счете, волосяной фолликул переходит в стадию телогена, когда волосяной стержень деформируется и в конечном счете выпадает из волосяного фолликула. Большую часть времени большинство волосяных фолликулов находятся в фазе анагена, небольшой их процент в телогенной фазе и наименьшее количество в катагенной фазе. Противораковые лекарственные средства нарушают пролиферацию клеток матрикса луковицы в анагенной фазе. В результате рост волос приостанавливается, и ствол волоса набухает с последующим изломом и потерей волос. В настоящем изобретении противораковая лекарственная композиция создана таким образом, что предупреждено проникновение лекарственного средства в волосяной фолликул, что предотвращает выпадение волос.

Основным аспектом изобретения является то, что композиция, содержащая противораковое лекарственное средство и полимер, это коллоидная система доставки, включающая в себя липосомы, микроэмульсии, мицеллы, полимерно-лекарственные конъюгаты, нанокapsулы, наносферы, микрочастицы, наночастицы, твердые липидные наночастицы. Эти системы доставки имеют преимущество в избирательности действия, модуляции распределения и гибкой технологии изготовления, а также имеют полимерную структуру, что позволяет разработать и изготовить лекарственное средство в заданной лекарственной форме. Композиция может доставляться к месту действия различными путями приема: пероральным, внутривенным, подкожным, внутривнутрибрюшинным, интратекально, внутримышечным, внутричерепным, ингаляционным, локальным, трансдермальным, ректальным, вагинальным, внутрислизистым и т.п., и лекарственное вещество может высвободиться немедленно или спустя определенный период времени путем модуляции, поддержки, пульсации, задержки или контролируемого высвобождения из системы доставки путем применения множества известных способов, возможных в рамках настоящего изобретения. Коллоидная система доставки может быть монолитной, когда полимер находится в дисперсной форме вместе с лекарственным средством, или покрывающей, когда полимер покрывает лекарственное средство или инкапсулирует его. Предпочитаемая система - наносистема, включающая в себя наночастицы, а также более новые разработанные наносистемы, включающие в себя нанокapsулы, наногели, нановолокна, наноболочки, наностержни, наноконтэйнеры и т.д.

Предпочитаемая система доставки - система наночастиц противоракового лекарственного средства, которая имеет множество преимуществ, в числе которых пригодность для парентерального приема, возможность изготовления высушенной формы, которая может быстро редиспергироваться, обеспечивая высокую редисперсность частиц активного агента, присутствующих в композиции, улучшенную избирательность по отношению к месту действия, повышенную биодоступность, сниженную дозировку, улучшенный фармакокинетический профиль и уменьшение побочных эффектов. Предпочтительные наночастицы - полимерные коллоидные частицы субмикронного размера с инкапсулированным внутри полимерной матрицы или адсорбированным или конъюгированным на ее поверхности противораковым лекарственным средством. Это также позволяет контролировать высвобождение лекарственного средства и поддерживать концентрацию лекарственного средства длительное время с помощью выбора соответствующих полимеров.

Согласно изобретению имеется улучшенная композиция противораковых лекарственных средств, где композиция - это композиция наночастиц противоракового лекарственного средства и полимера в качестве коллоидной системы доставки, частицы которой имеют определенный диапазон размеров, как описано выше. Эта композиция эффективна при лечении первичных и метастазирующих опухолей, включая рак простаты, яичек, молочной железы, легких, почек, поджелудочной железы, костей, селезенки, печени, мозга и т.п. со значительно сниженным количеством побочных эффектов, особенно химиотерапевтически индуцированной алопецией. Предпочтительно композиция включает в себя по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство, массовая доля которого составляет от 2 до 99,5%, и по меньшей мере один полимер, массовая доля которого составляет от 2 до 99%. В предпочтительном варианте исполнения противораковое лекарственное средство - это паклитаксел, представленный в виде

наноконпозиции, включающей в себя полимер, количество которого находится в пределах от 2 до 90% по массе.

В настоящем изобретении использованы биоразлагаемые полимеры, включающие в себя природные, синтетические и полусинтетические материалы.

Примеры природных полимеров включают в себя белки, пептиды, полипептиды, олигопептиды, полинуклеиновые кислоты, полисахариды (крахмал, целлюлоза, декстраны, альгинаты, хитозан, пектин, гиалуроновая кислота и т.п.), жирные кислоты, эфиры жирных кислот, глицериды, жиры, липиды, фосфолипиды, протеогликаны, липопротеины и т.д. Белки включают в себя альбумины, иммуноглобулины, казенны, инсулины, гемоглобины, лисозим, альфа-2-макроглобулин, фибронектин, витронектин, фибриноген, липазы и т.п.; протеины, пептиды, энзимы, антитела и их комбинации также могут быть использованы в настоящем изобретении в качестве стабилизаторов, если необходимо улучшить стабильность. Предпочитаемый белок - это протеин, предпочтительно используемый в количестве от 2 до 99% по массе, более предпочтительно в количестве от 5 до 95% и наиболее предпочтительно в количестве от 10 до 90% по массе.

Синтетические полимеры включают в себя полиаминокислоты, такие как желатин, поливинилалкоголь, полиакриловая кислота, поливинилацетат, полиэстеры, полиакрилаты, поливинилпирролидон, полиэтоксизолин, полиакриламид, поливинил пирролидинон, полиакриленгликоли, полилактиды, полигликолиды, поликапролактоны или их сополимеры и т.п., подходящие комбинации из двух и более вышеуказанных веществ, особенно альфагидроксикарбоновой кислоты, полигидроксиэтилметакрилата, поли(эпсилон-капролактон), поли(бета-гидроксибутират), поли(гидроксиалерат) и (бета-гидроксибутират-гидроксиалерат)сополимеры, полиинозиновая кислота, поли(молочная кислота), поли(гликолевая кислота, поли(D,L-лакто-со-гликолевая кислота), амфифильные блок-полимеры полимолочной кислоты-полиэтиленоксида, полиалкиленгликоль, полиэтиленоксида, блок-сополимеры полиэтилена локсида-полипропиленоксида, полиангидриды, полиортоэфиры, полифосфазан, пуллулан.

Предпочтительные системы доставки по изобретению используют биоразлагаемые/биосовместимые полимеры в качестве капсулы для противоракового лекарственного средства. Эти биоразлагаемые первичные полимеры могут быть такими, которые высвобождают сразу при введении или такими, которые задерживают высвобождение противоракового активного средства и задерживают наноконпозицию в месте действия в течение длительного периода времени, что повышает терапевтическую эффективность.

Предпочитаемый первичный полимер - это поли(D,L-лакто-со-гликолевая кислота) или ПЛГК, которая является биоразлагаемым полимером, разрешенным в форме с измененным высвобождением галеновых лекарственных средств. ПЛГК - это гидрофобный сополимер, разложение которого обеспечивается реакцией гидролиза, приводящей к образованию двух нормальных биологических субстратов: молочной и гликолевой кислот, которые метаболизируются путем аэробного гликолиза до углекислого газа и воды. Степень биodeградации ПЛГК зависит от соотношения молочной и гликолевой кислот. Предпочтительное соотношение - 50:50. ПЛГК абсолютно биосовместима и является причиной задержки реакции на чужеродные тела. ПЛГК используется в настоящем изобретении в предпочтительном количестве от 2 до 99%. Более предпочтительно от 5 до 95% и наиболее предпочтительно от 10 до 90% по массе.

Согласно другому аспекту этого изобретения оно включает в себя нацеливание противоракового лекарственного средства на место действия с помощью различных технологий, которые включают конъюгацию нацеленных лигандов с лекарственным средством или лекарственным средством, содержащим композицию с наночастицами, направление их к месту действия или покрытие композиции температурно- или pH-чувствительными полимерами.

Согласно этому вышеуказанному аспекту для достижения целенаправленного действия лекарственного средства на опухоль температурно-чувствительные или другие оболочки получают путем нанесения реагирующего на температуру интерполимерного комплекса заданной чувствительности в водном растворе, например поли(N-ацетакриламид), поли(N-изопропилакриламид), поли(N-изопропилакриламид-со-акриламид), поливинилалкоголь, полиэтиленгликоль, полиакриламид, поли(метакриламид) на противораковое лекарственное средство, находящееся в форме наночастиц, например паклитаксел. Такие наночастицы с гидрофильной поверхностью могут циркулировать в крови в течение длительного времени, и вследствие температурной чувствительности частиц, т.е. высшей критической температуры раствора (ВКТР) или низшей критической температуры раствора (НКТР), размер частиц увеличивается при введении *in vivo* при температуре 37°C. Размер частиц дополнительно увеличивается в несколько раз, когда частицы накапливаются в опухоли, что вызвано разницей в физиологических условиях микросреды опухоли и инкапсулированного активного лекарственного средства, высвободившегося в месте действия. pH чувствительные полимеры, которые могут быть использованы, это полиакрилаты, целлюлозы ацетаты, фталаты и т.д.

Инкапсулированные наночастицы лекарственного средства в настоящем изобретении спроектированы таким образом, что в условиях *in vitro*, при комнатной температуре, частицы имеют размер  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм,  $D_{90} \leq 450$  нм. Предпочтительные размеры -  $D_{10} \geq 120$  нм,

D50 приблизительно 200 нм, D90≤350 нм и наиболее предпочтительные размеры - D10≥140 нм, D50 приблизительно 200 нм, D90≤260 нм. В зависимости от температурной чувствительности частиц, когда они введены *in vivo*, их размер увеличивается до двух раз по сравнению с их первоначальным размером в плазме. Таким образом, даже, если в процессе получения некоторые частицы композиции, включающей в себя полимер и лекарственное средство, могут не соответствовать определенному диапазону размеров, *in vivo* размеры частиц всегда будут в необходимых пределах, что предотвращает их проникновение через нормальные капилляры в кожу и волосяные луковицы, а также способствует их удержанию в кровотоке для попадания в итоге к месту действия. Когда эти частицы достигают опухоли, они увеличиваются в размерах до 10 раз по сравнению с их первоначальным размером, а также проникают через опухолевые микрососуды с повышенной проницаемостью и задерживаются в ткани опухоли (т.е. эффект повышенной проницаемости и задержки в тканях), где лекарственное средство высвобождается. Прием подобных композиций для лечения различных типов рака приводит к снижению облысения.

В этих композициях практически нет свободного лекарственного средства, что дает преимущество в снижении побочных эффектов, вызывающих алопецию. Предпочтительные полимеры, используемые в композиции, это температурно- и pH-чувствительные полимеры, такие как поли(N-изопропилакриламид), используемый в количестве от 1 до 95% и наиболее предпочтительно от 2 до 90% по массе вышеуказанной композиции.

Таким образом, в соответствии с предпочтительным вариантом настоящего изобретения предлагаются способы получения температурно-чувствительных наночастиц, инкапсулирующих противораковое лекарственное средство, такое как паклитаксел, с возможностью немедленного или контролируемого и направленного действия на опухоль, что обеспечивает максимальный терапевтический эффект с минимумом побочных эффектов путем снижения дозировки активного вещества.

Фармацевтическая композиция противоракового лекарственного средства, такого как паклитаксел, согласно настоящему изобретению включает композицию наночастиц, указанную выше, в состав которой входит лекарственное средство и фармацевтически приемлемые носители. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам, имеющим опыт в данной области. Они включают в себя нетоксичные физиологически приемлемые носители, наполнители и вспомогательные вещества для парентерального введения, для перорального приема в твердой и жидкой форме, для ректального, назального, внутримышечного, подкожного приема и т.п. Предпочтительно композиция предназначена для внутривенного капельного, подкожного или внутримышечного введения.

Композиции, предназначенные для парентерального введения, могут представлять физиологически приемлемые стерильные водные или неводные взвеси, суспензии или эмульсии и стерильные порошки, пригодные для разбавления и парентерального введения. В качестве подходящих водных и неводных носителей, наполнителей, растворителей, сольвентов могут использоваться вода, алифатические или ароматические спирты, такие как этанол, октанол, алкил или ариловые галиды, такие как дихлорметан, кетоны, такие как ацетон, алифатик, циклоалифатик или ароматические гидрокарбоны, такие как гексан, циклогексан, толуол, бензол и полуолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерол и т.п.), сукцинимиды, карбодиимиды и подходящие их смеси, растительные масла (соевое масло, минеральное масло, кукурузное масло, рапсовое масло, кокосовое масло, оливковое масло, сафлоровое масло, хлопковое масло и т.п.) и пригодные для введения органические эфиры, такие как этилолеат, алкил, арил и циклические эфиры, такие как диэтиловый эфир, тетрагидрофуран, ацетонитрил и водные буферные растворы, хлороформ и т.п. необходимая текучесть может быть достигнута, например, путем использования покрытий, таких как лецитин, с помощью использования частиц необходимого размера в форме взвесей и суспензий и путем использования сурфактантов.

Фармацевтическая нанокomпозиция в дополнение к активному веществу и растворителю может также содержать наполнители и вспомогательные вещества, такие как консерванты, увлажнители, эмульсификаторы, поверхностно-активные вещества и дозирующие агенты, известные в данной области и приемлемые в рамках настоящего изобретения. Профилактика роста микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких как парааминобензойная кислота, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. также, желательно включить изотонические агенты, такие как сахара, натрия хлорид и т.п., а также буферные агенты, такие как фосфаты, фталаты, ацетаты, цитраты, бораты и т.п.

Нанокomпозиция может быть отфильтрована в стерильных условиях или произведена в стерильных условиях на каждой стадии получения. Это позволяет избежать стерилизации высокой температурой, что может повредить или привести к распаду активного агента в результате кристаллизации и агрегации частиц активного агента. Композиция, как коллоидная транспортная система, может быть в конечном счете представлена в качестве лиофилизированного порошка или суспензии, приготовленной в биологически совместимой жидкой среде. В качестве биологически совместимой жидкой среды может быть использована вода, буферная водная среда, солевой раствор и буферный солевой раствор, буферные растворы аминокислот, белков, сахаров, углеводов, витаминов, синтетических полимеров, масляных эмульсий и т.д.

Важным аспектом изобретения является то, что способы получения наночастиц инкапсулированно-

го противоракового лекарственного средства, такого как паклитаксел, его аналоги и производные направлены на достижение максимального процента инкапсуляции для того, чтобы в нанокompозиции не было свободного лекарственного средства. Таким образом, цель этого изобретения обеспечить способ фракционирования инкапсулированного паклитаксела, его производных или аналогов на частицы определенного диапазона размеров, а также обеспечить удаление свободного лекарственного средства из композиции с тем, чтобы большая его часть была связана с полимером, получив таким образом композицию, предназначенную для лечения рака у млекопитающих с наименьшим числом побочных эффектов, таких как алоpecia или облысение.

Композиции согласно настоящему изобретению, включающие в себя микрочастицы, липосомы, нанокапсулы, наносферы и наночастицы, как описано выше, производятся общепринятыми для данной области способами, но с дополнительной стадией фракционирования частиц до желательного определенного диапазона размеров и удаления свободного, не инкапсулированного и не связанного с полимером лекарственного средства, что было подробно описано выше. Процесс изготовления фармацевтических нанокompозиций охватывает все технологии изготовления микро/нанокompозиций. Основным аспектом изобретения является процесс, включающий в себя стадии растворения и/или диспергирования лекарственного средства и полимера в водном растворе и/или в растворителях или в их смеси; смешивания двух растворов для получения эмульсии или их осаждения, дополнительное смешивание в присутствии фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей, гомогенизация смеси под низким или высоким давлением для того, чтобы получить наночастицы желаемого размера; удаление растворителя с помощью любого способа, одним из которых может быть понижение давления, если необходимо, придание наночастицам определенного размера для получения частиц в определенном диапазоне, ультрафильтрация наносuspензии через 30-килодальтон мембрану для того, чтобы удалить все свободное лекарственное средство и, наконец, лиофилизация в ампулах и хранение до дальнейшего изучения.

Способ лечения млекопитающих, согласно изобретению, включает в себя стадию приема необходимого для лечения количества вышеуказанной новой и улучшенной композиции вышеуказанных противораковых лекарственных средств и полимеров, которая обеспечивает значительное уменьшение алопеции, вызванной химиотерапией.

Таким образом, основным аспектом настоящего изобретения является обеспечение способа снижения рака у млекопитающих, обеспечивающий снижение побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алоpecia. Данный способ включает в себя введение терапевтически эффективного количества указанной выше новой и улучшенной композиции, включающей в себя частицы по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства и один полимер, как описано выше. Композиция изготовлена таким образом, что частицы имеют определенный диапазон размеров, как описано выше, и композиция по существу не содержит свободное лекарственное средство.

### Примеры

Пример 1. Синтез PLGA наночастиц, инкапсулирующих паклитаксел.

Наночастицы поли(D,L-лакто-со-гликолевой кислоты)(PLGA) были синтезированы с использованием технологии двойной эмульсификации типа вода-масло-вода двойной эмульсии. В типичном эксперименте 100 мг PLGA растворяли в 2 мл дихлорметана и 10 мг паклитаксела было растворено в 1 мл абсолютного этанола. Оба раствора медленно перемешивали в смесителе. Первичную водно-масляную (w/o) эмульсию приготовили путем эмульсификации 500 мкл фосфатно-солевого буфера в вышеуказанном растворе. Первичная водно-масляная эмульсия была затем дополнительно эмульсифицирована в растворе поли(N-ацетакриламида) с формированием эмульсии "вода-масло-вода". Таким образом, полученную вода-масло-вода эмульсию гомогенизировали с получением наночастиц паклитаксела путем распыления растворов. Затем раствор отцентрифугировали и наночастицы желаемого размера были выборочно отделены. Затем наночастицы диспергировали в стерильной воде и немедленно лиофилизировали для последующего использования.

Пример 2. PLGA попарно ковалентно соединили с мицеллярными нанометровыми агрегатами пуллулана.

PLGA попарно ковалентно соединили с пуллуланом путем активации PLGA с помощью N-гидроксисукцинимидом. Комплекс пуллулан-PLGA очистили с помощью гелевой фильтрации и классифицировали с помощью FTIR, Н-ЯМР и масс-спектроскопии. Гидрофобизированный раствор пуллулана лиофилизировали и поместили на глубокую заморозку до последующего использования.

100 мг гидрофобизированного пуллулана растворили в 10 мл воды и перемешали на вортексе для формирования мицелл. Спиртовой раствор паклитаксела медленно добавили к мицеллярному раствору и перемешивали до тех пор, пока в растворе не произошла инкапсуляция лекарственного средства в мицеллярной форме. Частицы лекарственного средства необходимого размера были отделены и раствор лиофилизировали.

Процент инкапсуляции или степень загрузки, а также динамика высвобождения были определены с помощью стандартных технологий с использованием HPLC, и размер частиц определили с помощью стандартного анализатора размера частиц.

Покрывание наночастиц термочувствительными полимерами.

Наночастицы лекарственного средства суспензировали в водном буфере (pH 4-5). К данному раствору добавили раствор карбодиимида и полученный раствор встряхивали и затем непрерывно перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем наночастицы разделили путем центрифугирования (или фильтрации или диализа). Водный раствор полимера поли(N-ацетакриламида) по капле добавляли к суспензии наночастиц и смесь встряхивали. Затем раствор перемешивали и частицы очищали и лиофилизировали для последующего применения.

Разделение (фракционирование) наночастиц до необходимого диапазона размеров.

10 мг лиофилизированного порошка наночастиц паклитаксела суспензировали в водном буфере с помощью ультразвука.

Раствор профильтровали через 0,2 мкм ультратонкий фильтр и фильтрат подвергли ассиметричному потоковому фракционированию, используя стандартный протокол фракционирования для данной технологии. Различные фракции собирали и подвергали анализу размеров с использованием стандартной технологии.

Пример 3. Получение наночастиц, содержащих паклитаксел и человеческий сывороточный альбумин.

1800 мг человеческого сывороточного альбумина растворяли в стерильной воде для инъекций. 200 мг паклитаксела отдельно растворяли в этаноле. Спиртовой раствор медленно добавляли во время быстрого перемешивания к спиртовому раствору человеческого сывороточного альбумина. Изготовленную эмульсию пропускали через гомогенизатор высокого давления в течение времени, необходимого для получения наночастиц желаемого размера. Этанол удаляли из наночастиц при пониженном давлении после того, как они подверглись оценке размеров путем пропускания сначала через 0,2-микронный, а затем 0,1-микронный фильтр. Фракционированные наночастицы стерильно фильтровали через 0,2-микронный фильтр, ультрафильтровали и лиофилизировали во флаконах. Частицы тестировали по разным параметрам.

Таблица 1

	Тест	Результат
1	Содержание паклитаксела	1мг/10мг лиофилизированного порошка
2	pH суспензии	6,8
3	Содержание свободного лекарственного средства	0
4	Суммарный объем распределения наночастиц	D10-70,8 мм D50-97,9 мм D90-99,8мм

Пример 4. Изготовление наночастиц, содержащих паклитаксел и человеческий сывороточный альбумин.

675 мг человеческого сывороточного альбумина растворяли в стерильной воде для инъекций. 75 мг паклитаксела отдельно растворяли в этаноле. Спиртовой раствор добавляли во время перемешивания к водному раствору человеческого сывороточного альбумина. Полученная эмульсия пропусклась через гомогенизатор при низком давлении в течение времени, необходимого для получения частиц желаемого размера. Этанол удаляли из наночастиц при пониженном давлении, после чего частицы ультрафильтровали через 30-килоДальтон-мембрану для удаления свободного лекарственного средства и затем лиофилизировали во флаконах. Полученные частицы тестировали по различным параметрам.

Таблица 2

	Тест	Результат
1	Содержание паклитаксела	1мг/10мг лиофилизированного порошка
2	pH суспензии	6,8
3	Содержание свободного лекарственного средства	0
4	Суммарный объем распределения наночастиц	D10-143,4 мм D50-178,5 мм D90-285,9 мм

Пример 5. Изготовление наночастиц, человеческий сывороточный альбумин и LCST полимер.

1800 мг человеческого сывороточного альбумина и 200 мг поли(N-изопропилакриламида) (LCST полимера) растворяли в стерильной воде для инъекций. 200 мг паклитаксела отдельно растворяли в этаноле. Дальнейшие стадии аналогичны таковым в примере 3.

Частицы, полученные в экспериментах с LCST-полимером, фракционировали с получением частиц желаемого размера. В одном из таких экспериментов была изучена зависимость размеров полученных частиц от различных температурных условий, результаты которой приведены в табл. 3 ниже, что отражает повышение размера частиц с повышением температуры.

Таблица 3

Температура	25°C	30°C	35°C	37°C	38°C
Средний размер частиц	90,0 нм	92,8 нм	98 нм	130 нм	<1000нм

Результаты показывают, что, когда частицы, содержащие паклитаксел и альбумин в присутствии вторичного полимера, такого как LCST-полимер, подвергаются различным температурным условиям, при температуре 37°C увеличиваются в размерах в 2 раза, а при температуре 38°C - приблизительно 10 раз.

Пример 6. Изготовление наночастиц PLGA-паклитаксел-LCST полимер.

Паклитаксел и поли(d,l-лакто-со-гликолевая кислота) (PLGA) растворяют в ацетоне, поли(N-изопропилакриламид) растворяли в воде для инъекций, после добавления поливинилалкоголя к этой жидкостной фазе. Раствор паклитаксел-PLGA медленно добавляли к водной фазе при помешивании. Ацетон удаляли из эмульсии при пониженном давлении. Полученные наночастицы подвергали стандартизации размеров, процессу удаления свободного лекарства и лиофилизации.

Пример 7. Изготовление наночастиц паклитаксел-PLGA-человеческий сывороточный альбумин.

900 мг человеческого сывороточного альбумина растворяли в стерильной воде для инъекций. По 100 мг паклитаксела и PLGA разделяно растворяли в хлороформе.

Раствор паклитаксел-PLGA в процессе перемешивания на высокой скорости добавляли к водному раствору человеческого сывороточного альбумина для того, чтобы получить эмульсию масло-вода. Полученную эмульсию пропускали через гомогенизатор при низком давлении в течение времени, необходимого для получения частиц желаемого размера. Этанол удаляли из наночастиц при пониженном давлении, после чего частицы ультрафильтровали через 30-килоДальтон-мембрану для удаления свободного лекарственного средства, и затем лиофилизировали во флаконах. Полученные частицы тестировали по различным параметрам:

Таблица 3.1

	Тест	Результат
1	Содержание паклитаксела	1мг/10мг лиофилизата
2	pH суспензии	6,9
3	Содержание свободного лекарственного средства	0
4	Суммарный объем распределения наночастиц	D10-176,6 мм D50-233,8 мм D90-318,4мм

Пример 8. Эффект химиотерапии на рост волос у мышей.

Семидельные мыши мужского пола, использованные для исследования, были помещены в клетки со свободным доступом к пище и воде. Эти условия являются стандартными (25°C комнатная температура, 12 ч света и 12 ч темноты). Образцы, введенные для исследования: исходный - находящаяся в продаже суспензия паклитаксела и альбумина для инъекций; тестируемый - образец, полученный, как указано в примере 3; контрольный - солевой раствор.

Мышиная модель была использована для изучения алопеции, вызванной химиотерапией. Под анестезией телогенные мыши, прошедшие через несколько постнатальных циклов роста волос, были приведены к анагенной стадии путем депиляции всех телогенных волос. Это было осуществлено с помощью электрической машинки для стрижки волос и использования находящегося в продаже крема для депиляции. Путем использования этой технологии все депилированные телогенные волосные фолликулы немедленно начали трансформироваться (стадии от I до IV) (ссылка на Paus et al., American Journal of Pathology, 144, 719-734 (1994)) в анагенные фолликулы. Вышеуказанные стадии были предприняты, чтобы запустить наиболее синхронизированную анагенную фазу развития вместо спонтанной анагенной фазы развития. В анагенной VI фазе (9-й день после депиляции) исходный, тестовый и эквивалентное количество контрольного образца были введены внутривенно трем группам мышей по 4 мыши в каждой.



После лечения все мыши были визуально осмотрены на предмет роста волос и степени алопеции и сфотографированы для записи. Учет роста волос на протяжении различных интервалов времени после химиотерапии производился на основе индекса роста волос, указанного ниже.

Баллы индекса роста волос:

0=нет роста волос;

1=умеренный рост волос с некоторой алопецией;

2=замедленный рост волос с очаговой алопецией;

3=хороший равный рост волос без признаков алопеции.

Индекс роста волос для каждого образца приведен в табл. 4.

Таблица 4

Группы	Индекс роста волос	
	День 1	День 10
Контроль: (солевой р-р в/в)	0,00	3,00±0,00
Тест: 20 мг/кг в/в	0,00	2,66±0,33
Исходный: 20 мг/кг в/в	0,00	2,0±0,57

Наивысший индекс роста волос отражает наилучший рост волос.

Вышеуказанные данные отражают, что мыши, которым был введен тестовый образец, показали наилучший рост волос по сравнению с исходным образцом и близкий к контрольному образцу.

Пример 9. Эффект химиотерапии на рост волос у мышей.

То же самое исследование было проведено с тестовым образцом, изготовленным, как указано в примере 4. Образцы, введенные для исследования: исходный - находящаяся в продаже суспензия паклитаксела и альбумина для инъекций; тестируемый - образец, полученный, как указано в примере 4; контрольный - солевой раствор.

Индекс роста волос для каждого образца приведен в таблице 5 ниже.

Таблица 5

Группы	Индекс роста волос	
	День 1	День 10
Контроль: (солевой р-р в/в)	0,00	2,25±0,00
Тест: 20 мг/кг в/в	0,00	2,00±0,00
Исходный: 20 мг/кг в/в	0,00	1,50±0,28

Вышеуказанные данные отражают, что мыши, которым был введен тестовый образец, показали гораздо лучший рост волос по сравнению с исходным и более близкий к контрольному образцу, и мыши, которым ввели исходный образец, показали наименьший индекс роста волос. Это статистически значимая разница между индексами роста волос контрольного и исходного образцов ( $p<0,05$ ;  $t=1,964$ ,  $Df=6$ ,  $N=4$ ). Эти данные показывают, что тестовый образец имеет сниженное количество побочных эффектов, таких как алопеция.

Пример 10. Исследования на мышах с опухолями.

Образцы, введенные для исследования: исходный - находящаяся в продаже суспензия паклитаксела и альбумина для инъекций; тестируемый I - образец, полученный, как указано в примере 4; тестируемый II - образец, полученный, как указано в примере 5.

Целью этого эксперимента было изучить задерживающую способность опухоли и поведение наночастиц настоящего изобретения (тестовый образец) по сравнению с исходным образцом. Были отобраны мыши, больные опухолями и поделены на 3 группы по признаку размера опухоли и дозировки ( $0,06 \text{ мг}/100\text{мм}^3$ ) тестовым и исходным образцами. После фиксированного интервала времени 8 ч мышей вскрывали, опухоль и плазма были отобраны и взяты анализы на паклитаксел.

Концентрация паклитаксела в плазме опухоли в тестовых и исходных образцах была подсчитана, в результате чего получилось 71,64 в примере 4 и 355,7 в примере 5 и 19,96 в исходном образце. Эти данные отражают, что накопление лекарственного средства из примера 4 в 3,58 раза больше, а из примера 5 - в 17,80 раз больше по сравнению с исходным. Это отражает меньшую текучесть данных образцов по сравнению с исходным и снижение количества побочных эффектов, особенно алопеции, как видно из тестового образца примера 4. Тестовый образец с дополнительными термочувствительными полимерами, как указано в примере 5, обеспечивает гораздо лучшее накопление вследствие приведения частиц к определенному размеру и имеет наименьшее количество побочных эффектов, особенно алопеции, вызванной химиотерапией.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения рака, имеющая значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция, включающие частицы а) по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства, выбранного из производных таксана, 5-фторурацила, доксорубина, даунорубина, цисплатина, карбоплатина, оксиплатина, и б) по меньшей мере одного полимера, способствующего инкапсулированию, адсорбированию или конъюгированию лекарственного средства, выбранного из альбумина, поли-d,l-лакто-со-гликолевой кислоты (ПЛГК), поли(ε-капролактона), поли(β-гидроксibuтирата), поли(гидроксивалерата), (β-гидроксibuтират-гидроксивалерат)сополимера, амфифильных блок-полимеров полимолочной кислоты-полиэтиленоксида, полиангидрида, полиортоэфира, полиаминокислоты, блок-сополимеры полиэтилена оксида-полипропилена оксида, полиакрилата, где частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм.

2. Композиция по п.1, где частицы имеют  $D_{10} \geq 120$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 350$  нм.

3. Композиция по п.1, где частицы имеют  $D_{10} \geq 140$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 260$  нм.

4. Композиция по п.1, где указанная композиция практически не содержит свободных лекарственных средств и где указанное лекарственное средство практически полностью связано с полимером(ми).

5. Композиция по п.1, где указанные частицы имеют распределение диапазона размеров частиц  $D_{90}/D_{10}$  менее чем 4,0.

6. Композиция по п.1, где указанные частицы имеют распределение диапазона размеров частиц  $D_{90}/D_{10}$  менее чем 3,0.

7. Композиция по п.1, где указанные частицы имеют распределение диапазона размеров частиц  $D_{90}/D_{10}$  менее чем 2,0.

8. Композиция по п.1, где противораковое лекарственное средство представляет собой производные таксана.

9. Композиция по п.8, где таксан выбран из паклитаксела и доцетаксела.

10. Композиция по п.1, где белок представляет собой альбумин.

11. Композиция по п.1, где в указанной композиции массовая доля противоракового лекарственного средства составляет от 0,5 до 99,5% и где массовая доля полимера(ов) составляет от 2,0 до 99,0%.

12. Композиция по п.1, где противораковое лекарственное средство представляет собой паклитаксел и полимер представляет собой поли(d,l-лактовая-со-гликолевая кислота).

13. Композиция по п.1, где противораковое лекарственное средство представляет собой паклитаксел и полимер представляет собой альбумин.

14. Композиция по п.1, дополнительно включающая вторичный полимер.

15. Композиция по п.14, где вторичный полимер выбран из группы, состоящей из температурно- и pH-чувствительных полимеров.

16. Композиция по п.15, где температурно- и pH-чувствительные полимеры выбраны из группы, состоящей из поли(N-ацетилакриламида), поли(N-изопропилакриламида), поли(N-изопропилакриламид-со-акриламида), поливинилалкоголя, полиэтиленгликоля, полиакриламида, поли(метакриламид) и их производных.

17. Композиция по п.16, где температурно- и pH-чувствительный полимер представляет собой поли(N-изопропилакриламид).

18. Композиция по п.11, дополнительно содержащая вторичный полимер в количестве от 0,5 до 99, от 1,0 до 95,0 и от 2,0 до 90,0% массовой доли композиции.

19. Композиция по п.1, где указанная композиция является коллоидной системой доставки.

20. Композиция по п.19, где коллоидная система доставки лиофилизирована.

21. Композиция по п.19, где коллоидная система доставки такова, что частицы суспензированы в биологически совместимой водной жидкости.

22. Композиция по п.1, где композиция включает паклитаксел с массовой долей от 0,5 до 99,5%, поли-d,l-лакто-со-гликолевую кислоту с массовой долей от 2,0 до 99,0% и, необязательно, поли(N-изопропилакриламид) с массовой долей от 2,0 до 90,0%.

23. Композиция по п.1, где композиция включает паклитаксел с массовой долей от 0,5 до 99,5%, альбумин с массовой долей от 2,0 до 99,0% и, необязательно, поли(N-изопропилакриламид) с массовой долей от 2,0 до 90,0%.

24. Композиции для лечения рака, имеющие значительно сниженные побочные эффекты, вызванные химиотерапией, такие как алопеция, включающие частицы а) по меньшей мере одного противоракового лекарственного средства, выбранного из винкристина, винбластина, капецитабина, дактиномицина, блеомицина, гемцитабина, эпирубина, октреотида, лейпролида, гозерелина, и б) по меньшей мере одного полимера, способствующего инкапсулированию, адсорбированию или конъюгированию лекарственного средства, выбранного из альбумина, поли-d,l-лакто-со-гликолевую кислоты (ПЛГК), поли(ε-капролактона), поли(β-гидроксibuтирата), поли(гидроксивалерата), (β-гидроксibuтират-гидроксивалерат)сополимера, амфифильных блок-полимеров полимолочной кислоты-полиэтиленоксида,

полиангдрида, полиортоэфира, полиаминокислоты, блок-сополимеров полиэтилена оксида-полипропилена оксида, полиакрилата, где частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм.

25. Способ получения композиции для лечения рака по п.1 или 24, включающий стадии (i) смешивания по меньшей мере одного противоопухолевого лекарственного средства по меньшей мере с одним полимером в растворителе, (ii) необязательно осуществление стадии (i) с наличием одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, (iii) получение наночастиц удалением растворителя и (iii) распределение наночастиц по размерам, так что частицы имеют  $D_{10} \geq 80$  нм,  $D_{50}$  приблизительно 200 нм и  $D_{90} \leq 450$  нм, и практически не имеет свободного лекарственного средства.

26. Способ лечения млекопитающих от рака, включающий стадию введения млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции по п.1 или 24, где указанная композиция не имеет свободного лекарственного средства и указанное лекарственное средство главным образом полностью связано с полимером(ми).

27. Способ уменьшения побочных эффектов, вызванных химиотерапией, таких как алоpecia, при лечении рака у млекопитающих, подвергающихся лечению противораковыми лекарственными средствами, где указанный способ включает применение терапевтически эффективного количества композиции по п.1 или 24, где указанная композиция не имеет свободного лекарственного средства и указанное лекарственное средство главным образом полностью связано с полимером(ми).

