



(51) МПК
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B01F 3/08 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/337 (2018.08); A61K 47/42 (2018.08); A61P 35/00 (2018.08); B82B 1/00 (2018.08); B82Y 40/00 (2018.08); B01F 3/08 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017136637, 17.10.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.10.2017Дата регистрации:
17.10.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.10.2017

(45) Опубликовано: 17.10.2018 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18,
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Казанский (Приволжский)
 федеральный университет" (ФГАОУ ВО КФУ),
 патентно-лицензионный отдел, И.А. Назмиеву

(72) Автор(ы):

Часов Виталий Васильевич (RU),
 Ризванов Альберт Анатольевич (RU),
 Черемин Андрей Михайлович (RU),
 Ахатова Фарида Сериковна (RU),
 Данилушкина Анна Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Казанский (Приволжский)
 федеральный университет" (ФГАОУ ВО
 КФУ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: DESAI N. et al. Increased antitumor
 activity, intratumor paclitaxel concentrations,
 and endothelial cell transport of cremophor-
 free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007,
 compared with cremophor-based paclitaxel. Clin
 Cancer Res. 2006 Feb 15; 12(4): 1317-24. RU
 2498997 C2, 20.11.2013. EA 23175 B1,
 31.05.2016.

(54) Фармацевтическая противоопухолевая композиция паклитаксела с гистонем Н1.3 в качестве носителя и способ получения композиции

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области медицины. Предложена фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью по отношению к опухолевым клеткам меланомы М14, рака простаты РС3 и колоректальной карциномы СаСо2, состоящая из паклитаксела и рекомбинантного человеческого гистона Н1.3

при массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25 : 1. Предложен способ получения вышеуказанной композиции методом самосборки. Предложенная группа изобретений обеспечивает создание безопасных композиций паклитаксела, свободных от побочных эффектов. 2 н.п. ф-лы, 5 пр., 2 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B01F 3/08 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/337 (2018.08); A61K 47/42 (2018.08); A61P 35/00 (2018.08); B82B 1/00 (2018.08); B82Y 40/00 (2018.08); B01F 3/08 (2018.08)

(21)(22) Application: **2017136637, 17.10.2017**(24) Effective date for property rights:
17.10.2017Registration date:
17.10.2018

Priority:

(22) Date of filing: **17.10.2017**(45) Date of publication: **17.10.2018 Bull. № 29**

Mail address:

420008, g.Kazan, ul. Kremlevskaya, 18, federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Kazanskij (Privolzhsnij) federalnyj universitet" (FGAOU VO KFU), patentno-litsenzionnyj otdel, I.A. Nazmievu

(72) Inventor(s):

**Chasov Vitalij Vasilevich (RU),
Rizvanov Albert Anatolevich (RU),
Cheremin Andrej Mikhajlovich (RU),
Akhatova Farida Serikovna (RU),
Danilushkina Anna Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Kazanskij (Privolzhsnij) federalnyj universitet" (FGAOU VO KFU) (RU)

(54) **PHARMACEUTICAL ANTITUMORAL COMPOSITION OF PACLITAXEL WITH HISTONE H1.3 AS A CARRIER AND A METHOD FOR PREPARING THE COMPOSITION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: proposed group of inventions relates to medicine. Pharmaceutical composition having anti-tumor activity against tumor cells of melanoma M14, prostate cancer PC3 and colorectal carcinoma CaCo2, consisting of paclitaxel and recombinant human histone

H1.3 at a mass ratio of histone H1.3 : paclitaxel = 25:
1. Method for preparing the above composition by a self-assembly method is proposed.

EFFECT: proposed group of inventions provides creation of safe paclitaxel compositions free from side effects.

2 cl, 5 ex, 2 dwg

Изобретение относится к медицине и касается создания новой фармацевтической противоопухолевой композиции, которая представляет собой комплекс, состоящий из известного гидрофобного фармацевтического препарата паклитаксела (слаборастворимого в воде фармацевтического вещества) и носителя - протеина (белка) гистона H1.3 (вещества, облегчающего доставку фармацевтического препарата к органам и тканям), а также способа получения новой фармацевтической композиции. Изобретение может быть использовано для производства в последующем лекарственной композиции, которая может найти применение в медицине, ветеринарии, биологии, при этом наиболее эффективно может быть использована в области лечения онкологических заболеваний.

На дату подачи заявки в мире существует задача повышения эффективности химической терапии злокачественных новообразований. Недостаточная эффективность терапии обусловлена преимущественно тем, что некоторые используемые в химиотерапии важнейшие фармацевтические препараты обладают низкой растворимостью в воде, и, соответственно, низкой биодоступностью, обусловленной неспособностью переноса нерастворимых в воде кристаллов вещества кровеносными сосудами. Одним из таких выявленных заявителем противоопухолевых фармацевтических препаратов является широко известный паклитаксел, впервые выделенный из коры тиса коротколистного (Taxaceae) (Mead Johnson Oncology Products. Taxol package insert (Листок-вкладыш для пациента), Princeton, N.J. 1993).

Заявителем проведен анализ существующего уровня техники. Из исследованного заявителем уровня техники выявлено, что одним из наиболее действенных способов для повышения эффективности химической терапии злокачественных образований является создание композиции, состоящей из противоопухолевого фармацевтического препарата и вещества - носителя, которое способствовало бы эффективной доставке фармацевтического препарата непосредственно в опухоль.

Паклитаксел, являясь хорошо известным по литературным источникам лекарственным средством и обладающий достаточно высокой клинической активностью в отношении таких опухолей, как рак молочной железы, яичников, шейки матки, легких и поджелудочной железы, в свободном состоянии имеет существенный недостаток, связанный с низкой биодоступностью, обусловленной неспособностью переноса нерастворимых в воде кристаллов паклитаксела кровеносными сосудами при внутривенном вливании (Flora, K. P., et al., NCI investigational drugs chemical information (Информация Национального Института Рака о химических свойствах лекарственных препаратов), Bethesda, Md.: National Cancer Institute, pp. 218, 1992).

Далее в представленном заявителем источнике (S. B. Horwitz, Taxol (paclitaxel): mechanisms of action (Таксол (паклитаксел): механизм действия), Annals Oncol., 5, 1994) описан механизм действия паклитаксела, как противоопухолевого средства. Паклитаксел действует, связываясь с микротрубочками из димеров тубулина в клетках, и препятствует процессу деления (митозу) во время G2/M фазы клеточного цикла.

Заявителем выявлен источник, свидетельствующий, что паклитаксел нерастворим в воде, что затрудняет его применение в клинической практике в качестве противоопухолевого препарата без специальных носителей (Flora, K. P., et al., NCI investigational drugs chemical information (Информация Национального Института Рака о химических свойствах лекарственных препаратов), Bethesda, Md.: National Cancer Institute, pp. 218, 1992).

Более того, паклитаксел не имеет функциональных групп, которые можно было бы ионизировать в физиологических условиях. Соответственно, изменение pH и солевого

состава водного раствора не способны оказывать влияние на его растворимость в воде (Straubinger, R.M. Biopharmaceutics of paclitaxel (taxol): formulation, activity, and pharmacokinetics (Биофармацевтика паклитаксела (таксола): состав, активность и фармакокинетика). In: Suffness, M. (Ed.), Taxol®: Science and Applications. CRC press, NY, pp. 237-254, 1995).

Чтобы сделать паклитаксел подходящим для противоопухолевой терапии, его смешивают с поверхностно-активным агентом - полиэтиоксилированным касторовым маслом, известным под зарегистрированным названием Кремофор (Cremophor EL), находящимся в равной доле с безводным этанолом, в качестве носителей (Mead Johnson Oncology Products. Taxol package insert (Листок-вкладыш для пациента), Princeton, N.J., 1993). Эта смесь (композиция) является зарегистрированным торговым наименованием Paclitaxel (Паклитаксел) (ранее Taxol (таксол)) фирмой Bristol-Myers Squibb.

Непосредственно перед внутривенным вливанием данная композиция смешивается с водным раствором (нормальным физиологическим раствором), который в присутствии поверхностно-активного вещества Кремофора образует с паклитакселем стабильную микроэмульсию, размеры частиц которой и другие физические характеристики обеспечивают паклитакселу беспрепятственное прохождение по кровеносным сосудам к опухолевым тканям.

Недостатком известного технического решения является то, что введение Кремофора связано с побочными эффектами, которые могут быть тяжелыми, включая анафилактические и другие реакции гиперчувствительности (аллергии) и которые требуют предварительного лечения кортикостероидами, противогистаминными препаратами и H₂-блокаторами (Gelderblom et al., Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation (Кремофор EL: недостатки и преимущества выбора в качестве носителя для лекарственного средства). Eur. J. of Cancer, 37, 1590-1598, 2001).

Также выявлено, что Кремофор вызывает оксидативный стресс (A.Pinskaya et al. Induction of oxidative stress by Taxol® vehicle Cremophor-EL triggers production of interleukin-8 by peripheral blood mononuclear cells through the mechanism not requiring de novo synthesis of mRNA (Оксидативный стресс, вызванный носителем для таксола Кремофором-EL, запускает производство интерлейкина-8 периферическими мононуклеарными клетками крови с помощью механизма, не требующего синтеза мРНК de novo), Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 11, 1925-1938, 2015).

Указанные недостатки ограничивают более широкое применение паклитаксела в виде композиции с Кремофором и этанолом в клинической практике.

Учитывая вышеизложенное, возможно сделать вывод, что имеется необходимость разработки новых носителей для производства композиций паклитаксела, свободных от побочных эффектов.

На дату подачи заявки заявителем выявлены технические решения, направленные на поиск альтернативных носителей для паклитаксела, включая белки, улучшающие терапевтические свойства паклитаксела.

Наиболее близким по сущности к заявленному техническому решению, выбранным заявителем в качестве прототипа по отношению к композиции, является лекарственный препарат Абраксан (Abraxane®), содержащий человеческий альбумин (Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel (Повышенная противоопухолевая активность, внутриопухолевая концентрация паклитаксела и эндотелиальный перенос

с помощью не содержащего Кремофор паклитаксела, связанного с альбумином, ABI-007, по сравнению с паклитакселом на основе кремофора). Clin Cancer Res. 12(4), 1317-24, 2006), одобренный в 2005 году агентством по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве лекарственного средства для терапии рака молочной железы, а в 2013 году для лечения рака поджелудочной железы. Сущностью препарата Абраксан является композиция (наночастицы), содержащая человеческий альбумин в качестве носителя и паклитаксел. Альбумин является белком-носителем, т.е. служит в качестве носителя для действующего вещества - паклитаксела, делая его более подходящим для противоопухолевой терапии, так как позволяет избежать присутствия в составе смеси токсичного растворителя (сурфактанта), коим является полиэтиоксилированное касторовое масло (Cremophor EL), применяемое в описанном выше известном техническом решении (Mead Johnson Oncology Products. Taxol package insert (листок-вкладыш для пациента), Princeton, N.J. 1993).

Человеческий альбумин в качестве носителя, в отличие от Кремофора, является нетоксичным и не имеет значительных побочных эффектов в терапевтических концентрациях (Mendez SM, McClain C J, Marsano LS: Albumin Therapy in Clinical Practice (Терапия альбумином в клинической практике). Nutrition in Clinical Practice, 20, 314-320, 2005).

При анализе существующего уровня техники выявлен источник, указывающий на важность размера комплексов (композиций) фармацевтического препарата с носителем, используемых в противоопухолевой терапии. Согласно теории об эффекте усиления проницаемости и удерживания (от англ. enhanced permeability and retention effect (EPR-эффект)) лекарственные средства определенных размеров за счет особого строения кровеносной и лимфатической систем опухолевых тканей по сравнению со здоровой имеют тенденцию накапливаться в опухолевых клетках (см. обзор: Mark E. Davis et al. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer (Терапия наночастицами: новый метод лечения рака). Nature Reviews Drug Discovery, 7, 771-782, 2008).

Заявителем выявлен источник, свидетельствующий о том, что EPR-эффект действует тогда, когда размер частиц фармацевтической композиции находится в интервале 100-400 нм (Bobe I, Harada M, Nakatomi I. A Revolution in Nanomedicines (переворот в наномедицине). In: Bagchi D (Ed.) Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Science, Wiley-Blackwell press, pp. 107-124, 2013).

Заявителем также выявлено изобретение по патенту US 7820788 Compositions and methods of delivery of pharmacological agents» («Составы и методы доставки фармакологических агентов»), в котором приводится размер частиц и соотношение паклитаксел/альбумин по массе фармацевтической композиции паклитаксела с человеческим альбумином. В целом сущностью известного изобретения является фармацевтическая композиция для инъекций, содержащая паклитаксел и фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтически приемлемый носитель содержит альбумин, где альбумин и паклитаксел в композиции составлены в виде частиц, причем частицы имеют размер частиц менее примерно 200 нм, и где массовое соотношение альбумина и паклитаксела в композиции составляет от примерно 1:1 до примерно 9:1.

Заявителем также выявлено изобретение по патенту US 6749868 «Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof» («Белки, стабилизирующие фармакологически активные агенты, способы их получения и способы их применения»), сущностью которого является система доставки лекарственного средства, содержащая частицы твердого или жидкого, по существу

нерастворимого в воде фармакологически активного агента, покрытого белковой оболочкой, где указанное белковое покрытие имеет связанные с ним молекулы свободного белка таким образом, что часть указанного фармакологически активного агента содержится внутри указанного белкового покрытия, и часть указанного фармакологически активного агента связано с указанным свободным белком, причем средний диаметр указанных частиц не превышает примерно 1 мкм (1 000 нм), система доставки лекарственного средства, в которой средний диаметр указанных частиц составляет менее 200 нм, биозащищенные частицы по существу нерастворимого в воде фармакологически активного агента, покрытого белком, причем указанные частицы окружены связанным с ними свободным белком, причем часть указанного фармакологически активного агента содержится в указанном белковом покрытии, а часть указанного фармакологически активного агента связана с указанным свободным белком, окружающим указанное белковое покрытие, и где средний диаметр указанных частиц не превышает примерно 1 мкм (1000 нм), биозащищенные частицы, в которых средний диаметр указанных частиц составляет менее 200 нм.

Более кратко, с учетом примеров осуществления изобретения, сущность известного изобретения определяется тем, что нерастворимые в воде фармакологически активные агенты могут быть доставлены в ткани в виде микрочастиц или наночастиц в водной суспензии, пригодной для внутривенного введения. Этот способ доставки снимает необходимость использования паклитаксела в виде эмульсии, содержащей этанол и полиэтоксигированное касторовое масло (Кремофор) в физиологическом растворе. В известном техническом решении предлагаются способы получения наночастиц фармакологически активных агентов, таких как паклитаксел, с помощью технологии испарения растворителя из эмульсии «масло-в-воде», полученной в условиях высоких сил (усилий) сдвига (например, ультразвуковая обработка, гомогенизация высокого давления, или тому подобное). В качестве стабилизирующего агента используют белки (например, человеческий сывороточный альбумин).

При этом описываются способы подготовки компонентов при формировании композиции человеческого альбумина с паклитакселом, при которых используется органический растворитель дихлорметан, и способы получения композиции с использованием высоких сил (усилий) сдвига, таких как гомогенизация под высоким давлением, когда смесь белка и паклитаксела подвергается эмульсификации (перемешиванию для получения эмульсии) под высоким давлением на специальном дорогостоящем оборудовании, чтобы частицы эмульсии достигли наноразмеров.

Под силой (усилием) сдвига подразумевается физическая величина, характеризующая силу, которая прикладывается касательно поверхности частицы, когда одна ее боковая грань смещается относительно другой (противоположной) грани при деформации сдвига. Сила (усилие) сдвига - одна из основных величин в технических характеристиках смесителей (гомогенизаторов), используемых в фармацевтической промышленности.

Из исследованного уровня техники заявителем выявлен источник, в котором описывается токсичность дихлорметана, который воздействует на печень, почки и селезенку, способен проникать через кожу, гематоэнцефалитический и плацентарный барьеры (Bale AS, Barone Jr S, Scott CS, Cooper GS. A review of potential neurotoxic mechanisms among three chlorinated organic solvents (Обзор потенциальных нейротоксических механизмов среди трех хлорированных органических растворителей), *Toxicol Appl Pharmacol.*, 255(1), 113-26, 2011).

В целом, исходя из изложенного выше, заявителем выявлено, что базовым недостатком применения альбумина в качестве носителя для паклитаксела является

то, что при формировании композиции альбумина с паклитакселом используется высокотоксичный органический растворитель дихлорметан.

Кроме вышеуказанного, из опубликованных материалов известно, что альбумин, используемый в качестве носителя, является инертным и не обладает собственной
5 противоопухолевой активностью (Mendez CM, McClain CJ, Marsano LS: Albumin Therapy in Clinical Practice (терапия альбумином в клинической практике). Nutrition in Clinical Practice, 20, 314-320, 2005).

Недостатком способа получения альбумина в качестве носителя для паклитаксела является использование метода гомогенизации под высоким давлением при получении
10 композиции альбумина с паклитакселом, для осуществления которого необходимо специальное оборудование.

Таким образом, основываясь на исследованном уровне техники, представляется возможным сделать логический вывод о том, что в мире существует необходимость в разработках новых композиций паклитаксела с новыми носителями, итогом которых
15 было бы сохранение всех полезных качеств, как у аналога-альбумина, который используется для производства Абраксана, с одновременным устранением токсичных компонентов при производстве и упрощением процедуры производства.

Наиболее подходящим кандидатом для разработки новых композиций паклитаксела с новым носителем, по мнению заявителя, является гистон H1.3 человека, который
20 обладает рядом преимуществ по сравнению с альбумином, который используется в качестве носителя в препарате Абраксан.

Преимуществом гистона H1.3, по сравнению с прототипом, которое (преимущество) будет подробно описано ниже, является наличие собственной противоопухолевой активности.

Преимуществом способа получения фармацевтической противоопухолевой композиции с использованием гистона H1.3, по сравнению с прототипом, является возможность гистона H1.3 самособираться в комплексы с паклитакселом благодаря
25 особенности структурной организации гистона H1.3, что позволяет избежать использования дополнительных токсичных компонентов и дополнительного оборудования.

Под определением гистонный белок (гистон) заявителем подразумеваются гистоны различных типов:

- Гистоны H2A, H2B, H3, H4 называются коровыми гистонами (от англ. core - сердцевина), и формируют нуклеосому, представляющую собой белковую глобулу,
35 вокруг которой накручена нить ДНК.

- Гистон H1.1/H1.5, называемый линкерным гистоном (от англ. link - связь), связывается с внешней стороной нуклеосомы, фиксируя на ней нить ДНК.

- Гистон H1.3 представляет собой белок с молекулярной массой 22.5 КДа. Он очень богат остатками лизина (61 а.к. о.), которые придают ему ярко выраженный
40 положительный заряд.

Из исследованного заявителем уровня техники выявлено, что гистон H1.3 обладает собственной противоопухолевой активностью.

Так, заявителем выявлен источник, указывающий на наличие собственной противоопухолевой активности гистона H1.3 (Medrzycki M, Zhang Y, Zhang W et al.
45 Histone h1.3 suppresses h19 noncoding RNA expression and cell growth of ovarian cancer cells (Гистон H1.3 подавляет экспрессию некодирующей РНК h19 и рост клеток рака яичника). Cancer Res, 74, 6463-6473, 2014). Сущностью известной статьи является то, что повышенная экспрессия гистона H1.3 с гена, введенного с помощью плазмиды методом

трансфекции в эпителиальные клетки рака яичника OVCAR-3, ингибировала скорость роста и формирование колоний OVCAR-3. Эти данные указывают на роль гистона H1.3, как внутриклеточного эпигенетического регулятора, подавляющего развитие опухоли в эпителиальных клетках рака яичника.

5 Заявителем выявлен источник по международной заявке на предполагаемое изобретение WO 2008122434 A1, по которой получены ряд патентов-аналогов, например - EP 2142563, в которых указывается на возможность использования гистона H1.3 в качестве противоопухолевого препарата (Gross P, Jornvall H, Thiry M et al (2008) Bis-Met Histone (Bis-Met гистон). Patent WO 2008122434 A1).

10 Сущностью известного технического решения является молекула нуклеиновой кислоты, которая (a) кодирует полипептид, состоящий из (aa) двух остатков метионина в качестве первого и второго N-концевых аминокислотных остатков, соединенных через пептидную связь со (ab) зрелым эукариотическим гистоном; (b) кодирует полипептид, состоящий из (ba) двух остатков метионина в качестве первого и второго
15 N-концевых аминокислотных остатков, соединенных через пептидную связь со (bb) зрелым эукариотическим полипептидом, последовательность которого, по крайней мере, на 80% идентична последовательности зрелого эукариотического гистона (a) и существенным образом сохраняет свою биологическую активность; или (c) гибридизуется в жестких условиях с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой
20 кислоты, кодирующей полипептид (a) или (b), причем указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, который имеет, по крайней мере, два N-концевых остатка метионина и существенным образом сохраняет биологическую активность полипептида (a) или (b), способ лечения и/или профилактики заболевания, выбираемого из рака, тромбоцитопении, инфекций, таких как бактериальные, вирусные или грибковые
25 инфекции, аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (SLE) или ревматоидный артрит, язвенного колита или заболеваний, характеризующихся амилоидоподобными фибриллами, таких как болезнь Альцгеймера (AD) и болезнь Паркинсона (PD), лейшманиоза, миопатии или сердечно-сосудистых нарушений, связанных с тромбозами, включающий введение композиции по п. 12 нуждающемуся
30 в этом субъекту, применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, или вектора по п. 5, или хозяина по п. 6 или 7, или полипептида по п. 9 для приготовления композиции для терапевтических и/или диагностических целей, применение по п. 15, где терапевтической целью является лечение рака, тромбоцитопении, инфекций, таких как бактериальные, вирусные или грибковые инфекции, аутоиммунных заболеваний, таких
35 как системная красная волчанка (SLE) или ревматоидный артрит, язвенного колита или заболеваний, характеризующихся амилоидоподобными фибриллами, таких как болезнь Альцгеймера (AD) и болезнь Паркинсона (PD), лейшманиоза, миопатии или сердечно-сосудистых нарушений, связанных с тромбозами.

40 Более кратко, с учетом приведенных в патенте примеров, сущность известного изобретения состоит в том, что сконструированная молекула ДНК кодирует белок -производное гистона H1.3 (N,N-бисметионилгистон), который имеет на N-конце дополнительный остаток аминокислоты метионина, облегчающий его выделение. Этот белок был использован для создания препарата ONCONIST, который предварительно показал свою эффективность в противоопухолевой терапии миелолейкоза.

45 Из исследованного уровня техники выявлено, что механизм действия гистона H1.3 на опухолевые клетки основан на его способности образовывать агрегаты с фосфолипидами, которые в опухолевых клетках смещены на внешнюю сторону мембраны, что приводит к серьезным перестройкам в клеточной мембране, образованию

пор, и в конечном итоге к программируемой гибели клетки (апоптозу) (Zhao H., Tuominen EK, Kinnunen PK. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes (Образование амилоидных волокон, вызванных фосфатидилсеринсодержащими мембранами). *Biochemistry*, 43 (32), 10302-10307, 2004).

5 Таким образом, из исследованного уровня техники можно сделать вывод, что гистон H1.3 человека обладает собственной противоопухолевой активностью в отличие от прототипа альбумина, что делает его (гистон H1.3) наиболее подходящим кандидатом для использования в качестве нового носителя в композиции с паклитакселом.

10 Как было указано выше, одним из недостатков применения альбумина в качестве носителя для паклитаксела является использование метода гомогенизации под высоким давлением при получении композиции альбумина с паклитакселом, для осуществления которого необходимо специальное оборудование, при этом используют дополнительные токсичные компоненты.

15 По мнению заявителя, приемлемым методом для устранения указанных недостатков мог бы стать метод самосборки комплексов паклитаксела с белком-носителем как альтернатива использованию известного метода эмульсификации.

Самосборка в данном случае является общеупотребительным термином. Под самосборкой (англ. self-assembly) понимается процесс образования упорядоченной надмолекулярной структуры или среды, в котором в практически неизменном виде 20 принимают участие компоненты (элементы) исходной структуры, аддитивно составляющие или собирающие, как части целого, результирующую более сложную структуру. Самосборка основана на технологии получения материала «снизу-вверх», когда сборка осуществляется непосредственно из элементов низшего порядка (атомов, молекул, структурных фрагментов биологических клеток и т.п.), располагаемых в 25 требуемом порядке. При осуществлении самосборки не требуется привлечение дополнительных растворителей или компонентов, кроме исходных.

По свидетельству литературных источников, самосборка основана на межмолекулярном взаимодействии участвующих в процессе компонентов, которое специфически зависит от размера, заряда, формы молекул и определяет 30 термодинамическую выгодность взаимодействия, чтобы минимизировать свободную энергию. Для осуществления взаимодействия во многих случаях необходим приток внешней энергии в виде тепловой, электрической, магнитной и т.п. (Alexander Boker, Jinbo He, Todd Emrick and Thomas P. Russell. Self-assembly of nanoparticles at interfaces (самосборка наночастиц на границах раздела). *Soft Matter*, 3, 1231-1248, 2007).

35 Разнообразие молекул, способных самособираться в надмолекулярные структуры, используя различные молекулярные механизмы, включая водородные связи, силы Ван-Дер-Ваальса, гидрофобное/гидрофильное взаимодействие и др., не позволяет сформулировать единую универсальную методику самосборки, применимую ко всем случаям. Каждый конкретный случай самосборки требует отдельного теоретического 40 обоснования и экспериментального подбора условий. С этой точки зрения процесс самосборки молекул паклитаксела и гистона H1.3 также является уникальным и возможность его осуществления предварительно была теоретически обоснована заявителем благодаря анализу большого количества литературных источников в процессе работы над изобретением и практически осуществлена в условиях 45 эксперимента.

Метод самосборки можно считать обратным по отношению к методу миниатюризации «сверху-вниз», когда размеры частиц уменьшаются путем механической или ионной обработки, вплоть до получения объектов с ультрамикроскопическими,

нанометровыми параметрами. На указанной технологии «сверху-вниз» и базируется способ получения наночастиц композиции паклитаксела и человеческого альбумина, который является прототипом и используется при производстве препарата Абраксан вышеописанным методом эмульсификации под высоким давлением, указанном в изобретении по патенту США 6749868.

При этом в прототипе применяется дополнительный компонент - токсичный органический растворитель дихлорметан и дополнительное оборудование для измельчения частиц (патент США 6749868).

Заявителем выявлен источник, описывающий структуру белка - гистона H1.3 (Dootz R, Adriana C. Toma AC, Pfohl T. Structural and dynamic properties of linker histone H1 binding to DNA (структурные и динамические свойства связывания с ДНК линкерного гистона H1). *Biomicrofluidics*, 5, 024104-12, 2011). Сущностью известной статьи является описание особенности гистонового белка H1.3, связанной со структурой. Белок имеет в составе гидрофобный домен, образующий глобулу в водном растворе, и гидрофильные N- и C- концевые участки, остающиеся неструктурированными благодаря наличию большого количества аминокислот лизина и аргинина. Кроме того, глобулярный домен содержит два сайта связывания с ДНК, которые расположены на противоположных концах домена (Goytisolo FA, Gerchman SE, Yu X, Rees C, Graziano V, Ramakrishnan V, Thomas JO. Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5 (идентификация двух сайтов связывания с ДНК на глобулярном домене H5). *The EMBO Journal*, 15, 3421-3429, 1996).

При этом в понятие гидрофобность (от греч. *hydro*-вода и *phobos*-боязнь, страх) входит физическое свойство молекулы, или отдельного ее участка, который стремится избежать контакта с водой. Сама молекула в этом случае называется гидрофобной.

Гидрофобные молекулы не поляризованы и не способны образовывать водородные связи, поэтому вода отталкивает такие молекулы, предпочитая образовывать связи внутри себя, т.е. с гидрофильными молекулами.

Согласно теории гидрофобного взаимодействия, между гидрофобными (т.е. не поляризованными молекулами или частицами вещества) возникает сильное притяжение в воде, которое обусловлено термодинамической невыгодностью контакта воды с этими веществами.

Вышеописанная структура гистона H.1.3 подразумевает пространственную доступность гидрофобного домена этого белка для взаимодействия с гидрофобными молекулами, такими как паклитаксел, в то время как гидрофобный участок человеческого альбумина, рассматриваемого здесь как прототип, и используемого в качестве носителя для паклитаксела при создании композиции паклитаксела с альбумином, закрыт семнадцатью дисульфидными связями (He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin (Атомная структура и химия человеческого сывороточного альбумина). *Nature*, 358, 209-215, 1992) и не может участвовать во взаимодействии без предварительной подготовки (Dawei Ding, Xiaolei Tang, Xiaoli Cao, Jinhui Wu, Ahu Yuan, Qian Qiao, Jing Pan, and Yiqiao Hu. Novel Self-assembly Endows Human Serum Albumin Nanoparticles with an Enhanced Antitumor Efficacy (Инновационная самосборка наделяет наночастицы человеческого сывороточного альбумина повышенной противоопухолевой эффективностью). *AAPS Pharm SciTech*, 15, 213-222, 2014).

Из анализа приведенного выше уровня техники заявителем сделан вывод о том, что протеин - гистон H1.3 имеет особенность структурной организации, а именно -пространственную доступность гидрофобного домена для взаимодействия с

гидрофобными молекулами, которая позволит ему самособираться в комплексы с гидрофобным паклитакселом без предварительной активации компонентов, и соответственно, без использования токсичных растворителей и дополнительного оборудования. В случае прототипа - альбумина метод самосборки возможен только при предварительной активации гидрофобного участка, закрытого семнадцатью дисульфидными связями.

В данном случае, в соответствии с вышеуказанным определением «самосборка», заявителем сделано логическое умозаключение, в последующем подтвержденное экспериментально, что исходные компоненты: фармацевтический препарат - паклитаксел и носитель - человеческий гистон Н1.3 по технологии «снизу-вверх» будут собираться в более сложную структуру - композицию, представляющую собой комплекс молекул паклитаксела и гистона.

При этом следует отметить, что технических решений, обладающих заявленной совокупностью отличительных признаков и обеспечивающих достижение заявленных технических результатов, а именно - направленных на получение композиции гистона Н1.3 и паклитаксела с размером частиц в интервале 100-400 нм методом самосборки без дополнительной активации компонентов, а также без использования токсичных компонентов и без применения дополнительного сложного дорогостоящего оборудования, заявителем из уровня техники на дату представления заявочных материалов не выявлено, что, по мнению заявителя, подтверждает новизну заявленного способа для получения заявленной композиции.

При этом заявленный способ, по мнению заявителя, имеет изобретательский уровень, так как его использование для получения заявленной композиции не является очевидным из выявленного заявителем уровня техники, так как каждый конкретный случай самосборки требует отдельного теоретического обоснования и экспериментального подбора условий, то есть не следует явным образом из исследованного уровня техники.

Кроме того, заявленное техническое решение позволяет одновременно разрешить казалось бы неразрешимые на дату подачи заявки противоречия, а именно:

- обеспечить получение фармацевтической композиции с новым носителем с высокой эффективностью в отношении опухолевых клеток;
- получить фармацевтическую композицию без дополнительной активации компонентов при ее формировании;
- исключить использование токсичных компонентов на всех этапах формирования фармацевтической композиции;
- исключить использование дополнительного сложного дорогостоящего оборудования.

Задачей заявленного технического решения является устранение недостатков прототипа, а именно, формирование противоопухолевой композиции паклитаксела с носителем - гистоном Н1.3 с размером частиц в интервале 100-400 нм и способ ее (композиции) получения методом самосборки без дополнительной активации компонентов, а также без использования токсичных компонентов и дополнительного оборудования в процессе формирования.

В заявленном техническом решении гистон, являясь белком-носителем, служит альтернативой известным носителям Кремофору и альбумину, который при этом позволяет избежать использования токсичных компонентов при формировании композиции паклитаксела.

Заявленное техническое решение представляет собой достаточно простой и, как следствие этого, доступный способ получения противоопухолевой композиции

паклитаксела без дополнительной активации компонентов, а также без использования токсичных компонентов и дополнительного оборудования по сравнению с прототипом.

Техническим результатом заявленного технического решения является фармацевтическая противоопухолевая композиция паклитаксела с белком-носителем гистон Н1.3, с размером частиц в интервале 100-400 нм, не содержащая токсичных компонентов на всех этапах ее формирования, а также способ ее получения методом самосборки без дополнительной активации компонентов и без использования дополнительного сложного дорогостоящего оборудования.

Сущностью заявленного технического решения является фармацевтическая противоопухолевая композиция, состоящая из паклитаксела и белка-носителя с размером частиц в интервале 100-400 нм, характеризующаяся тем, что в качестве белка-носителя использован рекомбинантный человеческий гистон Н1.3 при массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25:1, обладающая противоопухолевой активностью по отношению к опухолевым клеткам меланомы М14, рака простаты РС3, колоректальной карциномы СаСо2, способ получения композиции по п. 1, заключающийся в том, что паклитаксел и гистон Н1.3 подвергают самосборке в следующей последовательности - берут водный раствор гистона Н1.3 с концентрацией 1 мг/мл, добавляют в него раствор паклитаксела в безводном этиловом спирте с концентрацией 10 мг/мл в массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25:1, перемешивают и инкубируют в термошейкере в течение 10-60 минут при 23-28°C и скорости вращения не менее 700 об/мин.

Поставленная задача и заявленный технический результат достигаются путем формирования композиции паклитаксела с гистон Н1.3 в качестве белка-носителя методом самосборки.

Заявленное техническое решение иллюстрируется Фиг. 1, Фиг. 2.

На Фиг. 1 приведена Таблица 1, в которой представлены данные о размере и заряде (дзета-потенциале) частиц композиции паклитаксела с гистон, полученные методом динамического светорассеивания и методом измерения электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера, соответственно.

На Фиг. 2 приведена Таблица 2, в которой представлены данные о цитотоксичности комплексов паклитаксела с гистон (IC₅₀), полученные с использованием МТТ-теста.

Заявленную композицию с применением белка гистона Н1.3 в качестве носителя для паклитаксела получают в следующей последовательности, приведенной ниже сначала в целом а затем более детально в описании конкретного осуществления:

- Первая стадия - приготовление исходных растворов гистона Н1.3 и паклитаксела, соответственно.

- Вторая стадия - формирование самособирающихся комплексов гистона Н1.3 с паклитакселом.

У полученных на второй стадии комплексов (частиц) паклитаксел/гистон Н1.3 определяют размер и заряд в сравнении с размером и зарядом растворов паклитаксела и гистона для подтверждения формирования композиции.

Полученные на второй стадии комплексы (частицы) изучают на цитотоксичность, используя линии опухолевых клеток.

Ниже приведено описание конкретного осуществления заявленного технического решения.

Первая стадия:

Пример 1. Приготовление раствора гистона Н1.3.

Берут навеску 1 мг сухого очищенного препарата гистона Н1.3 (ONCOHIST, фирма-

производитель - ИБХ РАН, Россия) и растворяют в 1 мл дистиллированной воды при комнатной температуре в микропробирке типа эппендорф.

В результате выполнения указанных операций получают водный раствор гистона Н1.3 с концентрацией 1 мг/мл.

5 Пример 2. Приготовление раствора паклитаксела.

Берут навеску 1 мг сухого чистого препарата паклитаксела (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) и растворяют в 100 мкл безводного этилового спирта при комнатной температуре в микропробирке типа эппендорф.

10 В результате выполнения указанных операций получают спиртовой раствор паклитаксела с концентрацией 10 мг/мл.

Вторая стадия:

Пример 3. Формирование самособирающихся комплексов (частиц) гистона Н1.3 с паклитакселом.

15 Берут 1 мл раствора гистона Н1.3, приготовленного по Примеру 1, добавляют в него 4 мкл раствора паклитаксела, приготовленного по Примеру 2, таким образом, что массовое соотношение гистон Н1.3 : паклитаксел становится равным 25:1, быстро и интенсивно перемешивают и инкубируют в термошейкере (Biosan) в течение 10-60 минут при температуре плюс 23-28°C и скорости вращения не менее 700 об/мин.

20 В результате выполнения указанных операций получают целевой продукт - заявленную фармацевтическую композицию, состоящую из рекомбинантного человеческого гистона Н1.3 и паклитаксела при массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25:1.

В отношении приведенного в Примере 3 режима получения заявленной композиции следует пояснить, что:

25 - время 10-60 минут является оптимальным, поскольку заявителем экспериментально установлено, что времени менее 10 минут недостаточно для формирования композиции, а более 60 минут процесс вести нецелесообразно, так как композиция полностью формируется в течение указанного времени;

30 - температура 23-28°C является оптимальной, так как заявителем экспериментально установлено, что ниже 23°C процесс замедляется, а выше 28°C могут начаться деструктивные процессы;

- заявителем экспериментально установлено, что скорость вращения платформы термошейкера должна быть не менее 700 об/мин, поскольку меньшая скорость недостаточна для формирования композиции.

35 Пример 4. Определение размера и заряда (дзета-потенциала) комплексов паклитаксел/гистон Н1.3 с целью доказательства формирования целевого продукта - заявленной композиции с заявленными потребительскими качествами.

40 Размер и заряд частиц композиции паклитаксела и гистона Н1.3 позволяет зафиксировать формирование частиц из исходных компонентов: паклитаксела и гистона по изменению их размера и заряда.

Размер частиц комплексов определяют методом динамического рассеивания света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C.

45 Заряд (дзета-потенциал) комплексов определяют, измеряя электростатический потенциал на границе раздела фаз между частицами и жидкостью методом определения электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C.

Автоматическую обработку полученных данных проводят с использованием программного обеспечения Malvern Zetasizer, v. 2.2 (Malvern Instruments, Великобритания).

Каждое измерение выполняют трижды, и вычисляют среднее значение.

Результаты измерения размера частиц и дзета-потенциала приведены на Фиг. 1 в Таблице 1. Таблица состоит из трех столбцов:

- 5 - в первом столбце приведены исследованные препараты - раствор гистона Н1.3, приготовленный по Примеру 1, раствор паклитаксела, приготовленный по Примеру 2, и комплекс композиции паклитаксела с гистоном, приготовленный по Примеру 3.
 - во втором столбце приведены размеры частиц (диаметр, d) исследуемых препаратов в нм;
 - в третьем столбце приведен заряд (дзета-потенциал) исследуемых препаратов в мВ.
- 10 Из представленных в Таблице 1 (Фиг. 1) экспериментальных данных видно, что значения размера частиц носителя - гистона Н1.3 и фармацевтического препарата паклитаксела изменяются в процессе формирования их комплекса: от 3,5 и 7,1 нм соответственно до 223 нм.

Данные свидетельствуют также, что значения заряда (дзета-потенциала) частиц носителя - гистона Н1.3 и фармацевтического препарата паклитаксела также изменяются в процессе формирования их комплекса: от 11,9 и 0,29 мВ соответственно до 19,2 мВ.

Таким образом, на основе анализа полученных данных, приведенных в Таблице 1, можно сделать вывод, что комплексы композиции паклитаксела и гистона Н1.3, полученные по Примеру 3, действительно формируются при указанных условиях.

20 При этом размер частиц полученной композиции составляет 223 ± 29 нм, что является приемлемым при использовании в противоопухолевой терапии согласно описанной ранее теории об эффекте усиления проницаемости и удерживания, гласящей, что размер частиц должен находиться в интервале 100-400 нм. Размер полученных частиц сопоставим по этому показателю с прототипом и соответствует заявленному

25 техническому результату.

Пример 5. Исследование цитотоксичности комплексов паклитаксела с гистоном Н1.3 (IC_{50}) с помощью МТТ-теста.

30 Как было описано ранее, из уровня техники заявителем выявлено, что рекомбинантный гистон Н1.3, использованный в данном техническом решении в качестве носителя, показал свою безопасность в клинических исследованиях и эффективность при лечении острого миелолейкоза.

Механизм действия гистона Н1.3 на опухолевые клетки основан на его способности образовывать агрегаты с фосфолипидами, которые в опухолевых клетках смещены на внешнюю сторону мембраны, что приводит к серьезным перестройкам в клеточной

35 мембране, образованию пор, и в конечном итоге к программируемой гибели клетки (апоптозу).

В заявленном техническом решении комплексы (частицы) паклитаксела и гистона Н1.3 исследованы на цитотоксичность с помощью МТТ-теста. Тест на цитотоксичность - один из методов, используемых в лабораторной практике доклинических испытаний

40 фармацевтических субстанций по стандартам GLP (англ. Good Laboratory Practice - Надлежащая лабораторная практика). Национальным аналогом GLP в РФ является стандарт ГОСТ 33044-2014.

Цитотоксичность заявленного комплекса исследована заявителем на трех линиях клеток злокачественных новообразований:

- 45 - М14 (меланома),
- РС3 (рак простаты)
- СаСо2 (колоректальная карцинома)

Для сравнения заявителем исследована цитотоксичность промышленного

паклитаксела с носителями в виде смеси этилового спирта и Кремофора (Bristol-Myers Squibb).

Реактив МТТ представляет собой тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид. Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только метаболически активных клеток восстанавливают МТТ в пурпурно-окрашенные кристаллы формазана. Эксперименты проводят, используя культуры клеток М14 (меланома), РС3 (рак простаты), СаСо2 (колоректальная карцинома), полученные из American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). Культивируют клетки, используя среду α -МЕМ (Панэко, Россия) с добавлением 10% FBS (Gibco, USA), 2мМ L-глутамин, 10 е.б.а./мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина (Панэко). Культивирование клеток производят во влажной атмосфере (5% CO₂, 37°C).

Для определения цитотоксической активности исследуемых препаратов клетки пассируют (100 мкл/лунку) в 96-ти луночные планшеты с плотностью 2000 клеток/лунку. В лунки помещают по 15 мкл растворов исследуемых препаратов, последовательно увеличивая их концентрацию. Лунки, не содержащие исследуемых препаратов, служат негативным контролем. Инкубацию проводят 72 часа. Для проведения МТТ-теста к культивируемым клеткам добавляют раствор МТТ (Панэко) в концентрации 500 мкг/мл. Затем клетки культивируют еще 3 часа при 37°C. Полученные кристаллы формазана растворяют в 0,1 мл DMSO (ДМСО, диметилсульфоксида) при встряхивании в течение 10 мин. Далее измеряют оптическую плотность полученных окрашенных растворов на мультискане Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Trading AG, Switzerland) при длине волны 555 нм. Все эксперименты проводят трижды, и средняя величина относительного ингибирования роста клеток высчитывается по формуле:

$D = (1 - (A - B) / (C - B)) \times 100$, где:

- A - интенсивность поглощения тестируемых субстанций в заданной концентрации;
- B - интенсивность поглощения в лунках, не содержащих клеток;
- C - оптическая плотность клеток в отсутствие тестируемых препаратов;
- D - относительное ингибирование, %.

Используя зависимость доза/эффект, определяют концентрацию полумаксимального ингибирования, IC₅₀ (нМ), которая указывает на концентрацию фармацевтического препарата, при которой выживает 50% клеток.

Таким образом, чем меньше концентрация фармацевтического препарата, при которой выживает 50% клеток (IC₅₀), и, соответственно, 50% клеток гибнет, тем сильнее его токсичное действие, т.е. выше цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам.

Результаты приведены в Таблице 2 на Фиг. 2:

- в первом столбце приведен перечень исследованных препаратов - комплексы (частицы) паклитаксела и гистона H1.3, приготовленные по Примеру 3, и промышленный паклитаксел с носителями в виде смеси этилового спирта и кремофора (Bristol-Myers Squibb), взятый для сравнения.
- во втором столбце приведены данные о цитотоксичности препаратов (IC₅₀) в отношении опухолевых клеток М14 (меланома);
- в третьем столбце приведены данные о цитотоксичности препаратов (IC₅₀) в отношении опухолевых клеток РС3 (рак простаты);
- в четвертом столбце приведены данные о цитотоксичности препаратов (IC₅₀) в отношении опухолевых клеток СаСо2 (колоректальная карцинома)

Из представленных в Таблице 2 (Фиг. 2) экспериментальных данных следует, что

значения IC_{50} (концентрации, при которой выживает 50% клеток) частиц композиции паклитаксела с гистоном сопоставимы со значениями промышленного паклитаксела (Bristol-Myers Squibb) в отношении опухолевых клеток М14 и РС3, и значительно различаются в отношении опухолевых клеток СаСо2 (колоректальная карцинома) - 3,22 и 18,12 нМ, соответственно.

Эти данные означают сопоставимость цитотоксичности частиц композиции паклитаксела с гистоном со значениями промышленного паклитаксела (Bristol-Myers Squibb) в отношении опухолевых клеток М14 и РС3 и усиление цитотоксичности частиц композиции паклитаксела с гистоном в отношении опухолевых клеток СаСо2 в 5,6 раза (18,12/3,22=5,6), что является доказательством высокой эффективности использования заявленной композиции по назначению.

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что в результате проведенных экспериментов заявителем сформирована композиция паклитаксела с гистоном Н1.3 в качестве носителя, полученная методом самосборки паклитаксела с гистоном Н1.3 без предварительной активации компонентов, с размером частиц 223 ± 29 нм, что является приемлемым при использовании в противоопухолевой терапии согласно известной теории об эффекте усиления проницаемости и удерживания, гласящей, что размер частиц должен находиться в интервале 100-400 нм.

Формирование комплексов подтверждено методом динамического рассеивания света и измерением электростатического потенциала частиц композиции.

Метод оценки цитотоксичности (МТТ-тест) выявил сопоставимость цитотоксичности комплексов паклитаксела с гистоном в сравнении с промышленным паклитакселом (Bristol-Myers Squibb) в отношении опухолевых клеток меланомы М14 и рака простаты РС3 и значительное усиление цитотоксичности в отношении клеток колоректальной карциномы СаСо2 - в 5,6 раза. Полученные данные указывают на возможность применения заявленного изобретения в медицине.

Заявленное техническое решение также может быть использовано для разработки лекарственных препаратов посредством стандартных технических устройств и оборудования.

Таким образом, заявителем решена поставленная задача и достигнут заявленный технический результат, а именно - сформирована композиция паклитаксела с белком-носителем гистоном Н1.3 с размером частиц 223 ± 29 нм (то есть в интервале 100-400 нм), не содержащая токсичных компонентов на всех этапах ее формирования, которая получена методом самосборки без дополнительной активации компонентов и без использования дополнительного сложного дорогостоящего оборудования.

В результате реализации заявленного технического решения представляется возможным сделать общий вывод, что заявителем одновременно решены ряд задач:

- получена новая фармацевтическая композиция паклитаксела с новым носителем;
- показано усиление токсического воздействия заявленной фармацевтической

композиции в отношении опухолевых клеток колоректальной карциномы СаСо2 в 5,6 раза по сравнению с промышленным паклитакселом (Bristol-Myers Squibb) при сопоставимом токсическом воздействии в отношении опухолевых клеток меланомы М14 и рака простаты РС3. Это указывает на возможность потенциального применения заявленной композиции для разработки и производства лекарственной композиции, наиболее эффективной против колоректальной карциномы и с сопоставимой с промышленным паклитакселом (Bristol-Myers Squibb) эффективностью против меланомы и рака простаты;

- разработан способ получения фармацевтической композиции без дополнительной

активации компонентов;

- исключено использование токсичных компонентов на всех этапах формирования фармацевтической композиции;

5 - исключено использование дополнительного сложного дорогостоящего оборудования.

Заявленное техническое решение соответствует критерию «новизна», предъявляемому к изобретениям, так как из исследованного уровня техники не выявлены технические решения, обладающие заявленной совокупностью отличительных признаков, обеспечивающих достижение заявленных результатов.

10 Заявленное техническое решение соответствует критерию «изобретательский уровень», предъявляемому к изобретениям, так как заявителем получена принципиально новая композиция с неизвестным до даты представления заявки составом, один из компонентов которого - гистон Н1.3 - является новым носителем для гидрофобного фармацевтического препарата - паклитаксела, позволяющим самособираться с ним в
15 композицию, что обеспечило значительное превосходство по сравнению с возможностями прототипа. При этом частицы полученной композиции обладают приемлемым для применения в противоопухолевой терапии размером, сопоставимым по этому показателю с прототипом. Кроме этого, носитель гистон Н1.3 обладает самостоятельным противоопухолевым действием, что в комплексе с паклитакселом
20 приводит к превышающему техническому результату в отношении противоопухолевой активности заявленной композиции по сравнению с прототипом.

Заявленное техническое решение соответствует критерию «промышленная применимость», предъявляемому к изобретениям, так как может быть реализовано на любом специализированном предприятии с использованием стандартного оборудования,
25 известных отечественных материалов и технологий.

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая противоопухолевая композиция, состоящая из паклитаксела и белка-носителя с размером частиц в интервале 100-400 нм, отличающаяся тем, что в
30 качестве белка-носителя использован рекомбинантный человеческий гистон Н1.3 при массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25 : 1, обладающая противоопухолевой активностью по отношению к опухолевым клеткам меланомы М14, рака простаты РС3, колоректальной карциномы СаСо2.

2. Способ получения композиции по п. 1, заключающийся в том, что паклитаксел и
35 гистон Н1.3 подвергают самосборке в следующей последовательности - берут водный раствор гистона Н1.3 с концентрацией 1 мг/мл, добавляют в него раствор паклитаксела в безводном этиловом спирте с концентрацией 10 мг/мл в массовом соотношении гистон Н1.3 : паклитаксел = 25 : 1, перемешивают и инкубируют в термошейкере в течение 10-60 минут при 23-28°C и скорости вращения не менее 700 об/мин.

40

45

Фармацевтическая противоопухолевая
композиция паклитаксела с гистоном Н1.3
в качестве носителя и способ получения
композиции

Таблица 1

Данные о размере и заряде (дзета-потенциале)
частиц композиции паклитаксела с гистоном

Препарат	Размер частиц (d), нм	Дзета-потенциал, мВ
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Гистон Н1.3 (водный раствор)	3,5±0,3	11,9±1,2
Паклитаксел (раствор в этаноле)	7,1±0,8	0,29±0,11
Комплексы композиции гистон/паклитаксел	223±29	19,2±1,8

Фиг. 1

Фармацевтическая противоопухолевая
композиция паклитаксела с гистоном Н1.3
в качестве носителя и способ получения
композиции

Таблица 2

Цитотоксичность комплексов паклитаксела с гистоном (IC₅₀)

Препарат	IC ₅₀ , нМ		
	М14 (меланома)	РС3 (рак простаты)	СаСо2 (колоректальная карцинома)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Комплексы композиции гистон/паклитаксел	1,29±0,12	1,42±0,15	3,22±0,24
Паклитаксел в растворе этанол/кремофор 1:1	1,14±0,12	1,49±0,17	18,12±0,97

Фиг. 2