

**Сведения о ходе выполнения проекта по Соглашению № 14.604.21.0072  
от 27.06.2014**

(Руководитель проекта, доктор химических наук, член-корреспондент РАН С.Е. Северин)

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии № 14.604.21.0072 (Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0072) от 27 июня 2014 года Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по теме «Разработка технологии получения полимерных форм препаратов для лечения онкологических заболеваний» на этапе № 1 в период с 27.06.2014 по 31.12.2014 выполнялись следующие работы:

1. Подготовлен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках ПНИ;
2. Обоснован выбор направления исследований;
3. Проведены патентные исследования по ГОСТ 15.011-96;
4. Разработаны модельные клеточные тест-системы для исследования противоопухолевой активности субстанций этопозида и никлозамида *in vitro*;
5. Определены диапазоны переносимых и летальных доз субстанций этопозида и никлозамида при разных способах однократного введения *in vivo* на мышах;
6. Выполнен подбор оптимального состава и технологических параметров для получения полимерной формы этопозида;
7. Разработаны методы анализа качества полимерной формы этопозида;
8. Подготовлен аналитический обзор по научным и прикладным аспектам использования микрофлюидной технологии при создании полимерных форм препаратов (индустриальный партнер);
9. Проведена разработка критериев отбора оптимального состава и параметров качества полимерных форм препаратов;
10. Проведена разработка модельных клеточных тест-систем для оценки токсического воздействия субстанций этопозида и никлозамида на нормальные клетки *in vitro*.

При этом были получены следующие результаты:

1. Выполненный анализ современной научно-технической литературы позволил сделать заключение о том, что полимерные системы доставки противоопухолевых препаратов можно рассматривать в качестве перспективного технологического подхода для повышения эффективности химиотерапии злокачественных новообразований. При выборе лекарственных веществ для разработки полимерных форм препаратов учитывалось то, что одним из наиболее эффективных направлений в химиотерапии является элиминация опухолевых стволовых клеток. Полученные недавно экспериментальные данные об усилении противоопухолевого эффекта никлозамида ингибиторами топоизомераз и тирозинкиназ позволяет предположить, что комбинированная терапия с использованием полимерной формы никлозамида и полимерной формы ингибитора топоизомеразы II этопозида будет особенно эффективна. На основании выполненного анализа современной научно-технической литературы проведено обоснование выбора направления исследований - определены технологические подходы, а также основные подходы при проведении испытаний препаратов *in vitro* и *in vivo*. Аналитический обзор по научным и прикладным аспектам использования микрофлюидной технологии позволил сделать заключение о перспективности данного направления при создании полимерных форм препаратов.

В результате анализа наиболее близкой отечественной и зарубежной патентной документации показано, что проводимые работы соответствуют мировому уровню развития данного направления техники. Патентов Российской Федерации, препятствующих проведению работ на дату окончания поиска, не обнаружено.

Разработаны модельные клеточные тест-системы для исследования противоопухолевой активности субстанций этопозида и никлозамида *in vitro*. Показано, что субстанция этопозида проявляла цитотоксический эффект в отношении опухолевых линий (аденокарцинома прямой кишки SW837, аденокарцинома ободочной кишки Сасо-2, карцинома сигмовидной кишки COLO 320 HSR, мелкоклеточная карцинома легкого H69, аденокарцинома молочной железы MCF-7 и MCF-7<sup>AdrR</sup>) в диапазоне значений 9,5 – 46,8 мкМ для

всех линий, кроме резистентной линии аденокарциномы молочной железы MCF-7<sup>AdrR</sup>, для которой значений IC<sub>50</sub> оказалось гораздо выше - 243,8 мкМ, а субстанция никлозамида проявляла цитотоксический эффект в отношении опухолевых линий в диапазоне значений IC<sub>50</sub> 1 – 6,7 мкМ для всех линий, включая резистентные клетки аденокарциномы молочной железы. При оценке токсического воздействия субстанций этопозида и никлозамида на нормальные клетки (легочные эмбриональные фибробласты линии ЛЭЧ, эмбриональные клетки почки человека линии НЕК 293) было показано, что субстанции менее токсичны в отношении нормальных клеток (для этопозида диапазон значений IC<sub>50</sub> от 142 до 200 мкМ; для никлозамида диапазон значений IC<sub>50</sub> 9,3 – 20 мкМ) по сравнению с опухолевыми, поэтому создание образцов полимерных форм и их скрининг по цитотоксической активности *in vitro* в отношении разработанных модельных клеточных тест-систем позволит выбрать перспективный образец полимерной формы этопозида для дальнейших испытаний на животных.

Для субстанции этопозида установлены значения среднесмертельной дозы при в/б введении и при в/в введении мышам. Диапазон переносимых доз при в/в введении на мышах линии BALB/c - 10 мг/кг < МПД < 15 мг/кг; при в/б введении - 50 мг/кг < МПД < 60 мг/кг. Для субстанции никлозамида установленные значения среднесмертельной дозы составили при в/б введении и при в/ж введении. Диапазон переносимых доз субстанции никлозамида при в/б введении на мышах линии BALB/c - 30.0 мг/кг < МПД < 35.0 мг/кг. Диапазон переносимых доз субстанции никлозамида при в/ж введении находился за пределами максимальной из испытанных доз: на мышах BALB/c - МПД > 1600 мг/кг.

Проведена разработка метода получения полимерной формы этопозида в лабораторных условиях - подобран оптимальный состав полимерной композиции и технологические параметры ее получения. На основании экспериментальных данных показано: наиболее оптимальным для получения композиций с этопозидом является полимер PLGA 50/50; оптимальное массовое соотношение полимер PLGA 50/50/этопозид равно 7:1; лучшим из исследованных ПАВ является 0.5 % водный раствор ПВС; оптимальный режим эмульгирования с помощью погружного гомогенизатора: 24 тыс. об./мин; 3 раза по 0.5 мин с интервалами по 0.5 мин. Для дальнейшей разработки лабораторного

регламента производства полимерной композиции этопозида за основу технологического процесса может быть взята методика опыта ЕТО-4. Выполнение работы по разработке критериев отбора оптимального состава и параметров качества полимерных форм позволило разработать критерии и методики для скрининга полученных образцов полимерной формы и выбора перспективного образца для дальнейших исследований, а также создать основу для дальнейшей разработки стандартов качества при производстве полимерных форм препаратов.

Создана следующая научно-техническая продукция: нормативный документ «Методики анализа качества полимерной формы этопозида», включающий описание методов и показателей анализа качества полимерной формы этопозида по следующим параметрам: описание; растворимость; подлинность; количественное определение этопозида; размер частиц; содержание примесей; остаточные органические растворители; показатель рН; содержание воды и суспендируемость.

Полученные в ходе первого этапа ПНИ результаты в виде проведенных патентных исследований позволят на следующих этапах выполнения ПНИ выявить направление и форму охраны созданных результатов научно-технической деятельности; проведенная разработка модельных клеточных тест-систем позволит провести на следующих этапах выполнения ПНИ исследование противоопухолевой активности полимерных форм этопозида и никлозамида *in vitro*; проведенные подбор оптимального состава и технологических параметров для получения полимерной формы этопозида, разработанные методы анализа качества полимерной формы этопозида позволят провести разработку лабораторного регламента получения полимерной формы этопозида и наработку образцов полимерной формы этопозида для проведения исследований противоопухолевой активности о общетоксических свойств на втором этапе ПНИ.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.

2. На этапе №1 получение результатов интеллектуальной деятельности не планировалось.

3. На этапе № 1 роль индустриального партнёра заключалась в софинансировании проекта в необходимом объёме – проведение работы № 1.8 плана-графика исполнения обязательств «Подготовка аналитического обзора по научным и прикладным аспектам технологии при создании полимерных форм препаратов».