

**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)

1. В ходе выполнения этапа № 2 проекта по Соглашению о предоставлении субсидии № 14.604.21.0072 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» в период с 01.01.2015 по 30.06.2015 выполнялись следующие работы:

1) Проведен скрининг по противоопухолевой активности образцов полимерной формы этопозида *in vitro* для выбора перспективного образца полимерной формы этопозида;

2) Проведена разработка лабораторного регламента получения полимерной формы этопозида; - проведена наработка образцов полимерной формы этопозида в количествах, достаточных для выполнения работ, анализ качества образцов и закладка на хранение;

3) Проведено исследование общетоксических свойств полимерной формы этопозида при разных способах введения *in vivo* на мышах;

4) Проведено исследование противоопухолевой активности полимерной формы этопозида *in vitro*;

5) Проведено исследование противоопухолевой активности полимерной формы этопозида *in vivo*;

6) Выполнены дополнительные патентные исследования;

7) Проведена валидация метода количественного определения этопозида;

8) Проведено исследование токсического воздействия полимерных частиц (без действующего вещества) на нормальные клетки *in vitro*;

9) Исследование токсического воздействия полимерной формы этопозида на нормальные клетки *in vitro*.

При этом были получены следующие результаты:

1) Проведен скрининг по противоопухолевой активности образцов полимерной формы этопозида *in vitro* (на линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и линии миелолейкоза человека K562), в ходе выполнения которого обнаружена высокая противоопухолевая активность семи исследованных образцов полимерной формы этопозида (ЕТ-1, ЕТ-2, ЕТ-3, ЕТ-4, ЕТ-5, ЕТ-6, ЕТ-7), которая либо не отличалась от активности свободного этопозида, либо превышала ее. В качестве наиболее перспективного образца по совокупности полученных данных выбран образец полимерной формы этопозида ЕТ-1, в основе получения которого лежит методика ЕТО-4.

2) Разработан лабораторный регламент получения полимерной формы этопозида (Этопозид-ПФ) в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002. В основу разработки лабораторного регламента производства полимерной формы этопозида (Этопозид-ПФ) была положена методика опыта № ЕТО-4. В соответствии с регламентом продукт является лекарственным средством и представляет собой лиофилизат для приготовления суспензии. Состав и количество компонентов полимерной формы этопозида (Этопозид-ПФ) следующие: этопозид – от 5.0 до 8.0 % масс., полимер PLGA 50/50 – от 55.0 до 60.0 % масс., поливиниловый спирт – от 14.5 до 16.5 % масс., D-маннитол - от 16.5 до 18.5 % масс. Для проведения запланированных исследований было наработано три партии образцов Этопозид-ПФ: 0.53 г образца полимерной формы этопозид (партия № 04-01); 0.55 г образца полимерной формы этопозид (партия № 04-02); 12.1 г образца полимерной формы этопозид (партия № 04-03). Проведён анализ качества образцов. Результаты наработки и анализа образцов полимерной формы этопозид оформлены в виде Актов и Протоколов. По результатам анализа в Актах были сделаны выводы о том, что образцы Этопозид-ПФ пригодны для проведения исследований. Для исследования стабильности полимерной формы этопозид были заложены на хранение два образца партии № 04-03.

3) Проведено исследование общетоксических свойств полимерной формы этопозид при разных способах введения *in vivo* на мышах линии BALB/c, в ходе которого установлено, что значения среднесмертельной дозы составили: при в/в введении - LD50 = 129.6 мг/кг, при в/б введении - LD50 = 172.7 мг/кг; диапазоны максимально переносимых доз (МПД) составили: при в/в введении - 100 мг/кг <

МПД < 110 мг/кг, при в/б введении – 140 мг/кг < МПД < 150 мг/кг. Результаты исследования переносимости курсового в/в и в/б введения Этопозид-ПФ показали, что курсовое введение не сопровождалось летальным действием (на протяжении всего курса введений и на протяжении 30 дней последующего наблюдений), при этом животные перенесли курсовое введение полимерной формы этопозид по оценке общего состояния и поведения животных удовлетворительно. Токсические эффекты имевшие место в период курсового введения (угнетение поведенческой активности, снижение динамики роста массы тела, развитие лейкопении) носили обратимый характер и исчезали вскоре после отмены инъекций. Результаты сравнительного анализа показателей острой токсичности при однократном введении, а также данных о переносимости однократного и курсового введения, проведенные на мышах линии BALB/c, свидетельствуют о том, что полимерная форма этопозид менее токсична и лучше переносится по сравнению со свободной субстанцией этопозид и препаратом сравнения Этопозид.

В исследовании противоопухолевой активности Этопозид-ПФ *in vitro* на различных линиях опухолевых клеток (лимфолейкоз мыши линии P388, чувствительная и резистентная сублинии клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7ADR, чувствительная и резистентная сублинии клеток миелолейкоза человека линии K562 и K562ADR, аденокарцинома ободочной кишки линии Caco-2, аденокарцинома прямой кишки линии SW837 и карцинома ободочной кишки линии COLO 320 HSR) обнаружено, что Этопозид-ПФ обладает высокой ЦТА в отношении широкого спектра опухолевых клеток разных типов, включая резистентные к химиопрепаратам опухолевые клетки. ЦТА Этопозид-ПФ, оцениваемая по показателю IC50, была, в зависимости от типа клеток либо близка к субстанции этопозид, либо превышала ЦТА субстанции этопозид.

В ходе испытаний полимерной формы этопозид на модели перевиваемого лимфолейкоза мышей P388 было обнаружено, что Этопозид-ПФ проявлял высокую противоопухолевую активность (при подкожном, внутрибрюшинном и внутривенном путях введения), сравнимую с активностью препарата сравнения – Этопозидом, но при этом существенно лучше переносился животными. При этом торможение роста опухолей превышало 80%, увеличение продолжительности

жизни достигало 40% (солидная модель) и 100% (асцитная модель). Оптимальная курсовая доза - 75-90 мг/кг, оптимальное количество инъекций – 3, временной интервал между инъекциями – 1-4 суток.

В результате исследования токсического воздействия полимерных частиц (без действующего вещества этопозид) на нормальные клетки (эмбриональные легочные фибробласты человека линии LECN-4) *in vitro* было показано, что все исследуемые образцы В1-ЕТ-1, В1-ЕТ-2, В1-ЕТ-3 не обладают выраженным токсическим действием в исследуемых диапазонах концентрации в отношении нормальных клеток. При исследовании токсического воздействия Этопозид-ПФ на нормальные клетки *in vitro* показано, что препарат обладает практически одинаковой цитотоксической активностью с субстанцией этопозид во всем диапазоне исследуемых концентраций.

4) За счёт внебюджетных средств индустриальным партнером проведена валидация метода количественного определения этопозид в полимерной форме при помощи обращённо-фазной хроматографии с использованием валидационных тестов по проверке сходимости (прецизионности), специфичности, линейности, точности метода, предела обнаружения и предела количественного определения. Показано, что результаты всех валидационных тестов соответствуют критериям приемлемости, заложенным в протоколе.

5) Создана следующая научно-техническая продукция: лабораторный регламент получения полимерной формы этопозид.

Проведённая на втором этапе ПНИ разработка лабораторного регламента получения полимерной формы этопозид позволит проводить наработку образцов полимерной формы этопозид для продолжения исследований на последующих этапах; проведенные исследования противоопухолевой активности и общетоксических свойств полимерной формы этопозид позволят в дальнейшем сделать заключение об эффективности и безопасности полимерной формы этопозид; проведенные дополнительные патентные исследования позволят подготовить патентную заявку на охраноспособную разработку.

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

3. На этапе № 2 роль индустриального партнёра заключалась в софинансировании проекта в необходимом объёме – проведение работы № 2.8 плана-графика исполнения обязательств «Валидация метода количественного определения этопозида».