

**Сведения о ходе выполнения проекта  
по Соглашению с Минобрнауки России о предоставлении субсидии  
от «26» сентября 2017 г. № 14.607.21.0198  
на этапе № 2**

Руководитель проекта, д.б.н., Г.А. Посыпанова

По Соглашению с Минобрнауки России о предоставлении субсидии № 14.607.21.0198 от «26» сентября 2017 г. «Разработка технологий получения субмикронных и наноразмерных форм высокоэффективных лекарственных препаратов на основе полимерных комплексов для молекулярно-прицельной терапии», (уникальный идентификатор — RFMEFI60717X0198) в рамках федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" были проведены работы по этапу № 2 в период с 01.01.2018 по 31.12.18.

**1. Работы, выполненные в отчетный период**

**1.1. Работы, выполненные за счет средств субсидии:**

- 1) Проведено сравнительное исследование противоопухолевой активности образцов полимерных комплексов для молекулярно-прицельной терапии (ПКМПТ) *in vitro*.
- 2) Выбран перспективный экспериментальный образец ПКМПТ и разработана лабораторная технология его получения.
- 3) Разработана методика анализа качества ПКМПТ.
- 4) Разработан лабораторный регламент получения ПКМПТ.
- 5) Нарботаны экспериментальные образцы ПКМПТ.
- 6) Проанализировано качество экспериментальных образцов ПКМПТ.
- 7) Исследована цитотоксическая активность экспериментальных образцов ПКМПТ на опухолевых клетках *in vitro*.
- 8) Исследована цитотоксическая активность экспериментальных образцов ПКМПТ на нормальных клетках *in vitro*.

9) Заложены на хранение экспериментальные образцы ПКМПТ для исследования стабильности.

10) Исследована эффективность проникновения ПКМПТ в клетки.

11) Исследованы механизмы противоопухолевого действия ПКМПТ *in vitro*.

12) Исследована безопасность ПКМПТ на лабораторных животных.

13) Изучена эффективность ПКМПТ на лабораторных животных.

14) Изучена стабильность экспериментальных образцов ПКМПТ в процессе хранения.

15) Проведены дополнительные патентные исследования.

**1.2. Работы (мероприятия) Получателя субсидии, выполненные за счет внебюджетных средств:**

1) Выбраны условия и произведен подбор режима стерилизации экспериментальных образцов ПКМПТ.

2) Разработан план исследования стабильности экспериментальных образцов ПКМПТ.

3) Исследованы экспериментальные образцы ПКМПТ с применением РСА и источника синхротронного излучения.

4) Разработаны технические условия (ТУ) для изготовления макета микрофлюидного чипа.

5) Изготовлен макет микрофлюидного чипа (МФЧ).

6) Испытан макет МФЧ.

7) Разработана лабораторная технология получения ПКМПТ с использованием микрофлюидной технологии.

8) Изучены экспериментальные образцы ПКМПТ методами электронной микроскопии.

9) Подготовлен план доклинических исследований лекарственного средства на основе ПКМПТ.

**2. Основные результаты, полученные в отчетный период:**

- Проведено сравнительное исследование противоопухолевой активности экспериментальных образцов полимерных комплексов для молекулярно-

прицельной терапии (ПКМПТ) *in vitro*, которое показало, что все тестированные образцы ПКМПТ в экспериментах на линии опухолевых клеток HeLa стабильно проявляли высокую цитотоксическую активность, превышающую активность препарата сравнения доцетаксела (субстанции) в 1,5–2 раза. По уровню противоопухолевой активности и физико-химическим показателям был осуществлён выбор перспективного экспериментального образца ПКМПТ.

- Разработаны методики анализа качества ПКМПТ. В качестве показателей контроля качества экспериментальных образцов ПКМПТ-Д, содержащих доцетаксел, были выбраны: Описание; Подлинность; Размер частиц и их распределение; Седиментационная устойчивость; Проходимость через иглу; pH суспензии; Вода; Остаточные органические растворители; Посторонние примеси; Количественное определение доцетаксела; Бактериальные эндотоксины; Стерильность. В качестве показателей контроля качества экспериментальных образцов ПКМПТ-К, содержащих кетопрофен, были выбраны: Описание; Подлинность; Размер частиц и их распределение; Количественное определение.

- Разработана лабораторная технология для производства экспериментальных образцов ПКМПТ. В состав ПКМПТ-Д входят доцетаксел, сополимер молочной и гликолевой кислот (полимер PLGA 50/50) с молярным соотношением звеньев 50 на 50, производное фолиевой кислоты, поливиниловый спирт (ПВС) и натрия хлорид. Был разработан рациональный способ растворения векторного компонента (производного фолиевой кислоты) с последующим введением его в состав ПКМПТ. Разработан универсальный технологический процесс получения ПКМПТ, который можно проводить на широком спектре доступного оборудования. В соответствии с ОСТ 64-02-003-2002 был оформлен «Лабораторный регламент на производство полимерного комплекса для молекулярно-прицельной терапии (ПКМПТ-Д)». Разработанная лабораторная технология обеспечивает стабильную воспроизводимость показателей качества получаемых экспериментальных образцов ПКМПТ. Была разработана «Временная технологическая инструкция получения полимерного комплекса для молекулярно-прицельной терапии, содержащего кетопрофен (ПКМПТ-К)».

В состав ПКМПТ-К входят кетопрофен, полимер PLGA 50/50, производное фолиевой кислоты, ПВС и натрия хлорид.

- Была проведена наработка экспериментальных образцов: ПКМПТ-Д, Партия 01 (12,8 г), Партия 02 (10,2 г) и ПКМПТ-К – Партия 01 (9,6 г). Экспериментальные образцы были проанализированы, результаты отражены в соответствующих протоколах анализа качества.

- Было показано, что экспериментальный образец ПКМПТ- Д выдержал испытание на стабильность после долгосрочного хранения при температуре  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .

- Проведён выбор условий и подбор режима стерилизации экспериментальных образцов ПКМПТ. Проведено исследование экспериментальных образцов ПКМПТ с применением рентгеноструктурного анализа (РСА) и источника синхротронного излучения. Методом просвечивающей криоэлектронной микроскопии проведено изучение экспериментальных образцов ПКМПТ.

- Были разработаны технические условия (ТУ) изготовления макета микрофлюидного чипа (МФЧ), в которых были изложены требования и показатели качества готовой продукции. Выполнено изготовление макета МФЧ. Технологический процесс изготовления макета МФЧ позволяет получать изделия, которые соответствуют требованиям разработанного ТУ «Микрофлюидный чип (макет)». Испытания макета МФЧ подтвердили соответствие характеристик полученного чипа требованиям Технического задания. Была проведена разработка технологии получения ПКМПТ с использованием микрофлюидной технологии.

- Показана высокая противоопухолевая активность ПКМПТ-Д *in vitro*, которая превышала активность препарата сравнения доцетаксела (субстанции) в клетках с высоким и средним уровнем экспрессии фолатного рецептора. Для подтверждения избирательности действия ПКМПТ-Д была изучена цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам – эмбриональным лёгочным фибробластам человека (ЛЭЧ-4). Показано, что активность ПКМПТ-Д, оцениваемая по величине  $IC_{50}$ , была в 5 раз ниже активности субстанции

доцетаксела и в 9 раз ниже активности ПКМПТ-Д для опухолевых клеток линии HeLa, при одинаковой чувствительности этих двух линий клеток к доцетакселу. Специфичность противоопухолевого действия ПКМПТ-Д, оцениваемая по соотношению  $IC_{50} \text{ ПКМПТ-Д} / IC_{50} \text{ Доцетаксел}$ , повышается в 12,7 раза (для клеток HeLa это соотношение составляет 0,4; для клеток ЛЭЧ-4 – 5,1). Полученные результаты свидетельствуют об избирательности действия ПКМПТ-Д в отношении опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих фолатные рецепторы.

- Проведённые исследования острой токсичности показали, что значения среднесместельной дозы ЛД<sub>50</sub> и дозы ЛД<sub>10</sub> при внутривенном введении мышам ПКМПТ-Д составили 140 мг/кг и 58,2 мг/кг; в случае доцетаксела (субстанции) – 112,3 мг/кг и 22 мг/кг. Острая токсичность ПКМПТ-Д при внутривенном введении оказалась ниже токсичности субстанции примерно на 24.7±6.5 % и 64.6 % по показателям ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>10</sub> соответственно. Выраженность картины интоксикации однократного введения ПКМПТ-Д была меньше, чем при введении доцетаксела-субстанции.

- На модели перевиваемой меланомы мыши В16 у мышей линии С57В1/6 при внутривенном введении ПКМПТ-Д в схеме четырёхкратного введения через день выявлен противоопухолевый эффект изучаемого препарата в виде замедления скорости роста опухоли. Наибольшее торможение роста опухоли (ТРО) наблюдалось при внутривенном введении ПКМПТ-Д в дозе 20 мг/кг на 14–21 сутки эксперимента (5–12-е сутки после окончания лечения) и составляло по показателю ТРО 95–99 %, а на 28-е сутки эксперимента (19-е сутки после окончания лечения) ингибирующий эффект для данной дозы препарата достигал 50 %. Таким образом, введение ПКМПТ-Д в режиме четырёхкратного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг оказывало длительный терапевтический эффект выше минимального критерия противоопухолевой активности (ТРО ≥ 50 %). Сравнивая данные противоопухолевой активности по оценке показателя ТРО для ПКМПТ-Д и субстанции доцетаксел следует отметить, что эффективность ПКМПТ-Д по показателю ТРО была более чем в два раза выше по сравнению с субстанцией доцетаксел на момент окончания эксперимента (19-е

сутки после окончания лечения). При сравнении данных противоопухолевой активности ПКМПТ-Д и субстанции доцетаксела по оценке продолжительности жизни мышей линии С57В1/6 с перевиваемой меланомой мыши В16 показано, что при введении дозы 20 мг/кг, наиболее эффективной по критерию ТРО, было выявлено в два раза большее увеличение средней продолжительности жизни животных в случае использования ПКМПТ-Д по сравнению с применением субстанции доцетаксела.

- На модели перитонвисцеральной боли у мышей (тест корчей) было показано, что при введении ПКМПТ-К, содержащего кетопрофен, наблюдается дозозависимый анальгетический эффект. Самой эффективной оказалась доза 20 мг/кг, при введении которой болевая реакция у мышей снижалась на 94,8 %. При этом, анальгетическая активность ПКМПТ-К превышала активность препарата сравнения Кетонал, который в дозе 20 мг/кг снижал болевую реакцию у животных на 55,8 %. На модели адьювантного артрита крыс было показано, что введение ПКМПТ-К приводило к значительному снижению отёка поражённой конечности по показателю степени угнетения отёка. При введении ПКМПТ-К показатель степени угнетения отёка был в 2–3 раза выше по сравнению с группой животных, получавших препарат сравнения Кетонал в аналогичной дозе, что свидетельствует о большем противоотёчном эффекте ПКМПТ-К.

- Была проведена подготовка плана доклинических исследований лекарственного средства на основе ПКМПТ. Определены объём и сроки исследования; проведено обоснование выбора экспериментальных моделей для изучения острой, хронической токсичности, специфической активности, фармакокинетики, мутагенности, аллергенности, иммунотоксичности, репродуктивной токсичности.

- Проведены дополнительные патентные исследования для определения патентоспособности разработок, которые показали, что объекты разработки являются патентоспособными и рекомендуются к правовой охране. Поданы две заявки на патент.

На этапе № 2 роль Индустриального партнёра (АО «ЭкоФармПлюс») заключалась в софинансировании проекта (за счет собственных средств) в необходимом объёме в соответствии с Планом-графиком исполнения обязательств, а именно в проведении следующих работ: «Валидация критичных технологических процессов» (п. 2.25 Плана-графика), «Валидация аналитической методики количественного определения действующего вещества в ПКМПТ» (п. 2.26 Плана-графика), «Межлабораторное подтверждение методик физико-химического анализа качества ПКМПТ» (п. 2.27 Плана-графика), «Разработка комплекта документации по аттестации технологических помещений» (п. 2.28 Плана-графика), «Разработка комплекта документации по аттестации основного технологического оборудования» (п. 2.29 Плана-графика), «Разработка рекомендаций по реализации результатов ПНИЭР в реальных секторах экономики» (п. 2.31 Плана-графика), «Разработка проекта технического задания на проведение НИОКР» (п. 2.31 Плана-графика). Результаты выполненных работ оформлены в виде актов, методик, отчетов и протоколов.

Все задачи этапа работ №2 выполнены в полном объеме и в соответствии с Планом-графиком исполнения обязательств и Техническим заданием Соглашения № 14.607.21.0198 о предоставлении субсидии от 26 сентября 2017 г. и Дополнительных соглашений №1-3.