

**Сведения о ходе выполнения проекта
по Соглашению с Минобрнауки России о предоставлении субсидии
от «27» июня 2014 г. № 14.604.21.0072
На этапе № 4**

Руководитель проекта, к. х.н., Е.А. Воронцов

Завершены работы по этапу № 4 по Соглашению с Минобрнауки России о предоставлении субсидии № 14.604.21.0072 от «27» июня 2014 г. «Разработка технологии получения полимерных форм препаратов для лечения онкологических заболеваний», (уникальный идентификатор — RFMEFI60414X0072) в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы». На этапе № 4 в период с 01.01.2016 по 30.06.2016 года были выполнены следующие работы:

1. Работы, выполненные в отчетный период:

1.1. Работы, выполненные за счет средств субсидии:

1) Проведена наработка образцов полимерной формы никлозамида в количествах, достаточных для выполнения работ, анализ качества образцов, закладка на хранение.

2) Выполнено исследование общетоксических свойств полимерной формы никлозамида при разных способах введения *in vivo* на мышах.

3) Выполнено исследование противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида *in vitro*.

4) Проведено исследование механизмов действия полимерной формы никлозамида.

5) Выполнено исследование противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида *in vivo*.

6) Проведены дополнительные патентные исследования.

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

1) Проведена разработка технологической схемы получения полимерных форм препаратов с использованием микрофлюидной технологии.

2) Проведено исследование токсического воздействия полимерной формы никлозамида на нормальные клетки *in vitro*.

3) Выполнено исследование противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида при комбинированном применении *in vitro*.

4) Выполнено исследование противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида при комбинированном применении *in vivo*

2. Основные результаты, полученные в отчётный период:

- Были наработаны две партии образцов Никлозамида-ПФ. Проведён анализ качества образцов по следующим показателям качества: описание; растворимость; подлинность; суспендируемость; размер частиц; содержание воды; показатель pH; остаточные органические растворители; количественное определение; примеси.

- Проведено исследование общетоксических свойств полимерной формы никлозамида при разных способах введения *in vivo* на мышах линии C57BL/6, в ходе которого установлено, что значения среднесмертельной дозы составили: при в/б введении - LD50 = 92.8 мг/кг, при в/ж введении - LD50 > 1700 мг/кг. Сравнение со значениями среднесмертельных доз для препарата сравнения субстанции никлозамид (при в/б введении - LD50 = 44.8 мг/кг, при в/ж введении LD50 > 1500 мг/кг) показало, что Никлозамид-ПФ является менее токсичным средством, чем препарат сравнения. Исследование переносимости курсового введения полимерной формы никлозамида на мышх линии C57BL/6 показывают, 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 никлозамида по оценке общего состояния и поведения животных удовлетворительно.

- В исследовании противоопухолевой активности Никлозамида-ПФ *in vitro*

на различных линиях опухолевых клеток (карцинома сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR, аденокарцинома молочной железы человека линии MCF-7, меланома мыши линии B16, аденокарцинома молочной железы мыши линии Ca755) обнаружено, что Никлозамид-ПФ обладает более высокой цитотоксической активностью, чем свободный никлозамид в отношении опухолевых клеток.

- Проведено изучение молекулярных механизмов противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида (ПФН) в сравнении со свободным никлозамидом. Показана высокая противоопухолевая активность никлозамида и ПФН в отношении клеток карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR, характеризующихся присутствием ABC-транспортеров ABCB1 во всех клетках и в минорной популяции присутствием транспортера ABCG2 и ABCB5. Обнаружено, что никлозамид и ПФН ингибируют накопление родамина-123 в опухолевых клетках, что свидетельствует о повреждающем действии этих препаратов на митохондрии клеток. При этом препарат ПФН приводил к более длительному и глубокому повреждению митохондрий, оцениваемому по снижению накопления родамина-123. Никлозамид и ПФН стимулировали образование активных метаболитов кислорода в клетках, в особенности, митохондриального супероксидного аниона. При этом препарат ПФН был более активен в индукции образования активных метаболитов кислорода. При действии никлозамида и ПФН были обнаружены двунитевые разрывы ДНК. Обнаруженный через 24 часа инкубации с никлозамидом и ПФН блок клеточного цикла в фазе G0/G1 свидетельствует об отсутствии репарации повреждений ДНК, вызванных этими препаратами. Таким образом, основными молекулярными механизмами его действия никлозамид в свободной и полимерной форме является повреждение митохондрий опухолевых клеток, накопление активных метаболитов кислорода и повреждение ДНК клеток.

- В ходе испытаний противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида на экспериментальных моделях перевиваемых опухолей меланомы мыши B16 и аденокарциномы молочной железы мыши Ca755 при

внутрибрюшинном способе введения Никлозамид-ПФ было обнаружено, что препарат проявлял выраженную противоопухолевую активность: торможение роста опухолей составляло 60-100%. При этом оптимальная разовая доза при внутрибрюшном пути введения препарата составила 20 мг/кг, а оптимальная курсовая терапевтическая доза находилась в диапазоне 160-220 мг/кг по никлозамиду.

- За счёт внебюджетных средств проводилось исследование токсического воздействия полимерной формы никлозамида на нормальные клетки линии LECN-4 и линии НЕК 293 *in vitro*, которое показано, что полимерная форма никлозамида обладает практически одинаковой цитотоксической активностью с субстанцией никлозамида во всем диапазоне исследуемых концентраций (различия в пределах стандартного отклонения). При исследовании противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида при комбинированном применении с алкилирующим агентом из группы соединений платины цисплатином *in vitro* показано, что данная комбинация эффективна в отношении исследованных линий опухолевых клеток (линия меланомы мыши В16 и аденокарциномы молочной железы мыши Са755). При этом комбинация ПФН с цисплатином оказалась более эффективна по сравнению как с комбинацией никлозамида и цисплатина, так и с отдельными препаратами. Обнаружен синергизм или аддитивное действие ПФН в комбинации с цисплатином при большинстве исследованных соотношений концентраций. В ходе испытаний ПФН на модели перевиваемой аденокарциномы молочной железы мыши Са755 с применением схем комбинированной терапии (в сочетании с низкими дозами препарата Цисплатин) было обнаружено, что Никлозамид-ПФ значительно повышает эффективность лечения: торможение роста опухоли достигало 75%. Показано увеличение средней продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой и группой мышей, получавших только Цисплатин.

- За счёт внебюджетных средств совместно с индустриальным партнером проведена разработка технологической схемы получения полимерных форм

препаратов с использованием микрофлюидной технологии, разработаны лабораторные регламенты производства полимерной формы этопозида (Этопозид-ПФМ) и полимерной формы никлозамида (Никлозамид-ПФМ). Качество полученных образцов позволяет утверждать, что метод их получения имеет большие перспективы с точки зрения создания полимерных наночастиц, обладающих заданными свойствами.

- Создана следующая научно-техническая продукция: «Лабораторный регламент получения полимерной формы этопозида (Этопозид-ПФМ)», «Лабораторный регламент получения полимерной формы никлозамида (Никлозамид-ПФМ)».
- Демонстрации и популяризации промежуточных результатов проекта осуществлена путем участия в одной конференции.
- На этапе №4 получены охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД). По результатам выполнения работы подана заявка на патент, в которой описывается состав и свойства полимерной формы никлозамида.

На этапе №4 роль индустриального партнёра заключалась в софинансировании проекта в необходимом объёме – проведение работы № 4.7 плана-графика исполнения обязательств «Разработка технологической схемы получения полимерных форм препаратов с использованием микрофлюидной технологии».

Все задачи, предусмотренные на данном этапе, выполнены в полном объеме.

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