



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100000** (13) **C2**

(51) МПК (2012.01)

A61K 36/82 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 11776**

(22) Дата подання заявки: **06.10.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **12.11.2012**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.04.2012, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **12.11.2012, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):

**Залєток Софія Петрівна (UA),
Орловський Олексій Аркадійович (UA),
Шляховенко Володимир Олексійович
(UA),
Кленов Олег Олександрович (UA),
Самойленко Олена Анатоліївна (UA),
Гоголь Сергій Володимирович (UA),
Карнаушенко Олена Володимирівна (UA),
Вербіненко Алла Віталіївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

UA 40714 U, 27.04.2009

UA 45097 U, 26.10.2009

UA 201107789 U, 20.06.2011

GE P 20094610 B, 10.02.2009

GE P 20094609 B, 10.02.2009

Wei Dongzhi, Mei Yuying, Liu Jianwen

Quantification of doxorubicin and validation of
reversal effect of tea polyphenols on multidrug
resistance in human carcinoma cells.

Biotechnol. Lett.. 2003. 25, N 4, с. 291-294

**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ХІМІОТЕРАПІЇ РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ХІМІОТЕРАПІЇ
ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН**

(57) Реферат:

Винахід належить до медицини та стосується способу підвищення ефективності хіміотерапії резистентних до хіміотерапії злоякісних пухлин. Заявлений спосіб полягає у тому, що додатково до хіміотерапії застосовують екстракт зеленого чаю, який містить поліфеноли і частинки якого мають нанорозмір, що забезпечується шляхом розпилювального сушіння та/або помелу на кульовому млині.

UA 100000 C2

Винахід, що заявляється, належить до медицини, зокрема онкології.

Рівень техніки. Відомі, вибрані як показник рівня техніки і водночас як прототипи, спосіб застосування біокомпозиту зеленого чаю для лікування злоякісних пухлин [1], при якому забезпечується гальмування росту злоякісних пухлин та підвищення терапевтичної активності протипухлинного лікарського препарату - цисплатину, а також спосіб лікування злоякісних пухлин [2], в якому екстракт зеленого чаю (ЕЗЧ) та синтетичний інгібітор біосинтезу поліамінів - полігексаметиленгуанідин - взаємно посилюють викликаний ними ефект гальмування росту злоякісних пухлин. Відомий також спосіб підвищення ефективності хіміотерапії резистентних до хіміопрепаратів злоякісних пухлин [3], в якому ЕЗЧ підвищує терапевтичну активність протипухлинних лікарських препаратів - цисплатину та доксорубіцину - щодо злоякісних пухлин, резистентних до цих препаратів. Спільним недоліком перших двох прототипів є те, що вони розроблені для лікування пухлин, які не є резистентними до лікарських препаратів, тоді як у клінічній практиці застосування хіміотерапії майже в кожному випадку призводить, більшою або меншою мірою, до виникнення резистентності пухлин до лікарських препаратів, що застосовуються. Спільним недоліком всіх трьох прототипів є застосування звичайного ЕЗЧ, виробленого в Грузії, згідно з розробкою Інституту біохімії та біотехнології ім. С. Дурмішідзе НАН Грузії (м. Тбілісі) [4]. Частинки звичайного ЕЗЧ у висушеному вигляді мають занадто великі розміри (в середньому істотно більше від 1000 нм) і при розчиненні у воді утворюють міцели відповідного розміру, що призводить до неповної біологічної доступності звичайного ЕЗЧ і тим самим знижують його ефективність. Відомі також [5] численні схеми лікування злоякісних пухлин, в яких подолання лікарської резистентності останніх тією чи іншою мірою досягається завдяки застосуванню комбінацій цитостатичних лікарських препаратів різної хімічної природи та різного механізму дії. Спільним недоліком таких схем є те, що при їх застосуванні часто посилюється не лише терапевтичний ефект, але водночас і побічна токсична дія на здорові клітини організму.

Власне опис винаходу, що заявляється. В основу винаходу поставлено задачу: розробити спосіб підвищення ефективності хіміотерапії резистентних до хіміопрепаратів злоякісних пухлин, в якому для підсилення терапевтичного ефекту було б застосовано агент, що не має істотного токсичного впливу на здорові клітини організму та має підвищену біологічну доступність порівняно зі звичайним ЕЗЧ, так що ефект посилення терапевтичної активності протипухлинних лікарських препаратів щодо резистентних до них пухлин був би більшим, ніж при застосуванні звичайного ЕЗЧ.

Поставлена задача вирішується тим, що лікарський препарат, до якого лікована пухлина є резистентною, застосовують в комбінації з наноекстрактом зеленого чаю (НЗЧ), тобто наноекстрактом ЕЗЧ, що його одержують зі звичайного ЕЗЧ шляхом розпилювального сушіння із застосуванням особливо тонких форсунок та/або помелу на кульовому млині до розміру наночастинок. Вибір та дозування протипухлинного лікарського препарату, а також режим поїння НЗЧ, як і у випадку звичайного ЕЗЧ, визначається в експерименті моделлю пухлинного росту, тобто видом тварин і штамом пухлини.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом винаходу наступний. Для злоякісних пухлин, у яких вироблена резистентність до протипухлинних лікарських препаратів, що широко застосовуються, зокрема доксорубіцину, характерними є високий вміст поліамінів, особливо їх мембранозв'язаних форм [6], та диспропорційний вміст р50- і р65-субодиниць фактора транскрипції NF-κB в ядрах пухлинних клітин. А саме, вміст білка р50 в ядрах резистентних клітин значно збільшений у порівнянні з пухлинами вихідного штаму, тоді як вміст білка р65, навпаки, істотно зменшений [7]. Така ситуація сприяє утворенню, замість класичної гетеродимерної форми (р50/р65) фактора NF-κB, значної кількості його гомодимерної форми р50/р50. Проте ця форма може бути функціонально активною лише за наявності в клітині поліамінів у кількостях, що набагато перевищують їх нормальні рівні. Таким чином, резистентність злоякісних пухлин до лікарських препаратів істотною мірою залежить від метаболізму поліамінів у клітинах цих пухлин. Поліфеноли ЕЗЧ пригнічують біосинтез та інтерконверсію поліамінів і завдяки цьому значно знижують функціональну активність фактора транскрипції NF-κB [8], головним чином внаслідок інактивації його гомодимерної форми. Ці ефекти добре виражені в злоякісно трансформованих клітинах і практично відсутні в здорових клітинах. Завдяки цьому біохімічна основа лікарської резистентності клітин значно послаблюється, причому цей ефект є високоспецифічним, оскільки стосується практично лише пухлинних клітин, головним чином резистентних до лікарських препаратів.

У викладеній частині механізм дії екстракту зеленого чаю є спільним для звичайного ЕЗЧ та його наномодифікації (НЗЧ). Специфіка дії НЗЧ порівняно зі звичайним ЕЗЧ полягає в тому, що,

завдяки більш ніж на порядок зменшеному розміру колоїдних міцел НЗЧ порівняно з ЕЗЧ, значно полегшується проникнення таких міцел всередину клітини та їх включення в метаболізм клітини, тобто підвищується біологічна доступність екстракту зеленого чаю.

Загалом, перераховані вище явища призводять до підвищення терапевтичної ефективності протипухлинного лікарського препарату та зменшення його побічної токсичності, причому ефект посилення терапевтичної активності протипухлинних лікарських препаратів щодо резистентних до них пухлин зазвичай є більшим, ніж при застосуванні звичайного ЕЗЧ, чим і досягається технічний ефект, що є задачею винаходу.

Приклади практичного застосування винаходу

При випробуваннях способу, що заявляється, було застосовано два типи тест-систем: 1) перещеплювані пухлини тварин, штучно селекціоновані на резистентність до певного протипухлинного лікарського препарату; 2) перещеплювані пухлини тварин, що мають природну резистентність до певного протипухлинного лікарського препарату.

Приклад 1

Порівняльне дослідження збільшення терапевтичного ефекту доксорубіцину щодо субштаму карциноми Герена щурів, штучно селекціонованого на резистентність до доксорубіцину, за допомогою ЕЗЧ та НЗЧ.

Субштам карциноми Герена, попередньо селекціонований на резистентність до доксорубіцину, перещеплювали щурам-самцям, вводючи підшкірно по 0,5 мл 25 % суспензії подрібненої пухлинної тканини. ЕЗЧ та НЗЧ застосовували у вигляді 0,1 % розчину в питній воді, їх споживання, наприклад, для щурів з масою тіла 200-300 г складало 25 ± 4 мл на добу. ЕЗЧ та НЗЧ застосовували в терапевтичному режимі, тобто з наступного дня після перещеплення пухлин і до моменту забою тварини споживали розчин ЕЗЧ або НЗЧ замість питної води. Доксорубіцин вводили в черевну порожнину 1 раз на 2 доби, починаючи з моменту, коли пухлини досягали діаметра близько 10 мм. Загалом проводили 4 ін'єкції доксорубіцину в дозі 1,5 мг/кг маси тварин. Тварин забивали через 17 діб після перещеплення пухлин. Одержані дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Середні маси пухлин на день забою у щурів-самців з карциномою Герена, резистентною до доксорубіцину

Група тварин	Середня маса пухлин (г)
Контроль (n=10)	$26,9 \pm 4,9$
Доксорубіцин (n=10)	$19,6 \pm 3,4$
НЗЧ (n=10)	$27,8 \pm 1,8$
Доксорубіцин+НЗЧ (n=10)	$12,1 \pm 1,5$
Доксорубіцин+ЕЗЧ (n=10)	$19,0 \pm 2,2$

Як видно з таблиці, при окремому застосуванні ані доксорубіцин, ані НЗЧ на цей термін досліджу не виявили гальмівної дії на ріст субштаму карциноми Герена, резистентного до доксорубіцину. При застосуванні комбінації Доксорубіцин+ЕЗЧ статистично значущого гальмівного ефекту також не спостерігалось. На відміну від цього, при застосуванні комбінації Доксорубіцин+НЗЧ ефект гальмування росту пухлин виявився достовірним ($P < 0,05$), а різниця між середньоарифметичними значеннями маси пухлин була в 2,7 разу більшою, ніж при застосуванні комбінації Доксорубіцин+ЕЗЧ, тобто технічний ефект винаходу досягнутий.

Приклад 2

Порівняльне дослідження посилюючого впливу ЕЗЧ та НЗЧ на терапевтичний ефект протилейкозного лікарського препарату метилглюксальбісгуанілгідрозон (МГБГ) щодо асцитної форми перещеплюваного лімфолейкозу Р388 мишей.

МГБГ - протипухлинний та протилейкозний лікарський препарат, який під фармацевтичною назвою Мітогуазон (Mitoguazone) застосовувався в клінічній онкології в деяких країнах Західної Європи в 60-х роках ХХ сторіччя [9, 10]. Від його клінічного застосування відмовились у зв'язку з його високою токсичністю. Однак висока ефективність МГБГ як інгібітору біосинтезу поліамінів і обумовлена цим його значна протипухлинна активність спричиняють періодичне поживлення інтересу до клінічного застосування цього препарату та його аналогів - як у варіанті монотерапії, так і в комбінації з іншими протипухлинними препаратами та радіотерапією [9-13].

Асцитну форму лімфолейкозу Р388 перещеплювали, вводючи в черевну порожнину гібридних мишей першого покоління C3H/Sn×DBA2 (скорочена назва CDF1) по 3×10^5 лейкозних

клітин штаму Р388 на мишу. ЕЗЧ та НЗЧ тварини одержували у вигляді 0,1 % розчину в питній воді за терапевтичною схемою - з наступного дня після перещеплення пухлин і до моменту забою. Результати дослідів подані в таблиці 2, схема дослідів наведена у лівому стовпчику таблиці.

5

Таблиця 2

Середня кількість асцитів та середня кількість лейкозних клітин на тварину у мишей з асцитною формою лейкозу Р388

Група тварин	Середня кількість асцитів, мл	Середня кількість клітин на тварину
Контроль (n=8)	2,95±0,24	548±50×10 ⁶
МГБГ (n=8)	1,87±0,20	445±32×10 ⁶
МГБГ + ЕЗЧ (n=8)	1,91±0,18	552±47×10 ⁶
МГБГ + НЗЧ (n=8)	1,42±0,18	216±31×10 ⁶

Як видно з таблиці, популяція асцитних клітин Р388 характеризується високою (близько 80 %) природною резистентністю до МГБГ, застосованого окремо. В даному прикладі технічний ефект винаходу був досягнутий з іще більш високою статистичною достовірністю, ніж у першому прикладі (різниця між групами МГБГ + НЗЧ та МГБГ + ЕЗЧ за об'ємом асцитів достовірна при $P < 0,1$; різниця за клітинністю асцитів - при $P < 0,01$).

Джерела інформації:

1. Залеток С.П., Орловський О.А., Гоголь С.В. та ін. Застосування біокомпозиту зеленого чаю для лікування злоякісних пухлин. - Патент України на корисну модель № 40714. - (Опис). - Бюл. № 8, 27.04.2009.

2. Залеток С.П., Самойленко О.А., Орловський О.А. та ін. Спосіб лікування злоякісних пухлин. - Патент України на корисну модель № 45097. - (Опис). - Бюл. № 20, 26.10.2009.

3. Залеток С.П., Орловський О.А., Карнаушенко О.В., Кленов О.О., Самойленко О.А., Гоголь С.В. Спосіб підвищення ефективності хіміотерапії резистентних до хіміопрепаратів злоякісних пухлин. - Заявка № u201107789 на патент України на корисну модель, пріоритет від 20.06.2011.

4. Гулуа Л., Квеситадзе Г., Омиадзе Н., Мchedlishvili Н., Ахвледиани К. Лечебно-профилактическое растительное средство и метод его производства. - Пат. Грузии. - № 58174 от 31.03.2008.

5. Skeel R.T., Khelif S.N. Handbook of Cancer Chemotherapy. - Walters Kluwer Health/LWW, 2011.-832 p.

6. Залеток С.П., Бердинських Н.К., Лялюшко Н.М. та ін. Дослідження метаболізму поліамінів в пухлинах, що резистентні до хіміотерапії // Актуальные проблемы медицины и биологии. - 2003. - № 1. - С. 73-85.

7. Залеток С.П., Гоголь С.В., Самойленко О.А. та ін. Дослідження білків фактора транскрипції NF-κB (p50 і p65) та інгібіторних білків NF-κB (IκBα) в резистентних до цисплатину і доксорубіцину субштамах карциноми Герена // Укр. морфол. альманах. - 2007. - Т. 5, № 4. - С. 26-29.

8. Udalova I.A., Mott R., Field D. et al. Quantitative prediction of NF-κB DNA-protein interaction // PNAS.-2002. - V. 99, N 12. - P. 8167-8172.

9. Von Hoff D.D. MGBG: Teaching an old drug new tricks // Annals of Oncology. - 1994. - V. 5, N6. - P. 487 - 493.

10. Levine A., Tulpule A., Espina B.M., Von Hoff D., Tessman D. Mitoguazone (MGBG) with radiation therapy in AIDS-related primary CNS-lymphoma // Int. Conf. AIDS.-1996, Jul 7-12.-11.- P. 222 (abstract no. Th.B.184).

11. Simon S.M., Eckenrode J., Natale R.B. Phase II trial of methylglyoxal bis-guanyldihydrazone (MGBG) in refractory small cell lung cancer // Investigational New Drugs.-1990. - V. 8. - P. 79-81.

12. Rizzo, J., Levine, A.M., Weiss, G.R., Pearce, T., Kraynak, M., Mueck, R., Smith, S., et al. Pharmacokinetic profile of Mitoguazone (MGBG) in patients with AIDS related non-Hodgkin's lymphoma // Investigational New Drugs.-1996.- V.14, N 2. - P. 227-234.

13. Gonsalves R.F., Marques M.P.M. MGBG-Cisplatin combination chemotherapy against breast cancer // BMC Proceedings.-2010. - V.4, Suppl. 2.-P. 27.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб підвищення ефективності хіміотерапії резистентних до хіміотерапії злоякісних пухлин, який **відрізняється** тим, що додатково до хіміотерапії застосовують екстракт зеленого чаю, який містить поліфеноли і частинки якого мають нанорозмір, що забезпечується шляхом розпилювального сушіння та/або помелу на кульовому млині.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601