



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 152091

(13) U

(51) МПК

G01N 21/75 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2022 01798	(72) Винахідник(и):	Першко Наталія Юріївна (UA), Левченко Олег Євгенович (UA), Пономарьова Ольга Володимирівна (UA), Червинський Іван Сергійович (UA), Сидоренко Михайло Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки:	30.05.2022	(73) Володілець (володільці):	Першко Наталія Юріївна, вул. Виставкова, буд. 8, кв. 41, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	27.10.2022	(74) Представник:	Оцалюк Валентин Михайлович, реєстр. №359
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	26.10.2022, Бюл.№ 43		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ХІМІОПРЕПАРАТІВ З АЛЬБУМІНОМ

(57) Реферат:

Спосіб визначення зв'язування хіміопрепарату з альбуміном включає наступні стадії: приготування розчину альбуміну в дистильованій воді; приготування розчину хіміопрепарату в розчині альбуміну; нанесення тонкого шару хіміопрепарату в розчині альбуміну, розчину хіміопрепарату та розчину альбуміну на предметні скельця; висушування предметних скелець; дослідження предметних скелець на інфрачервоному спектрофотометрі у діапазоні 1600...1700 см⁻¹.

UA 152091 U

Корисна модель належить до галузі біохімії, біофізики, онкології, фармакології, тощо, а саме до способу визначення зв'язування хіміопрепаратів з альбуміном.

У плазмі за зв'язування з ліками відповідають три головні білки: альбумін, кислий альфа-1 глікопротеїн і ліпідопропротеїни. Препарати можуть зв'язуватися не тільки з одним білком.

5 Альбумін, головний білок у процесі зв'язування, становить близько 60 % від загальної кількості білків у плазмі крові, зв'язує багато лікарських препаратів, наприклад сульфаніламід, пеніциліни і бензодіазепіни, а також багато ендогенних речовин. Тому процес зв'язування альбуміну знаходиться у сфері інтересів багатьох медичних (фармакологія, фармакотерапія, токсикологія тощо) і біологічних наук (біохімія, біофізика, фізіологія).

10 Рівень приєднання препарату до білків плазми зазвичай визначається двома способами: вирівнювальним діалізом або ультрафільтрацією, причому вирівнювальний діагноз застосовується частіше. В цьому випадку плазма або розчин, який містить білок, поміщається в діалізну камеру, до іншого відсіку якої заливають розчин, що не містить білок (зазвичай це фосфатний буфер). Плазма і буферний білок розділені напівпроникною мембраною з порами
15 такого розміру, що білок крізь неї не проходить, тоді як молекули препарату, не зв'язані з білком, вільно проходять крізь цю мембрану.

До буферного розчину додається відома концентрація препарату і по досягненню рівноваги, тобто коли вільна фракція препарату в плазмі дорівнює відомій концентрації препарату в буферному розчині, поділений на загальну концентрацію препарату в плазмі.

20 Оскільки вільна концентрація препарату звичайно буває відносно низькою, то часто застосовується радіоактивний мічений препарат. Цей метод є простим і точним і потребує невеликих за об'ємом зразків. Прийнято вважати, що і метод ультрафільтрації, і метод вирівнювального діалізу еквівалентні і дають однакові результати.

Одним з найпоширеніших спектральних методів вирішення цієї задачі є застосування
25 флуоресцентної спектроскопії, зокрема вимінювання гасіння власної флуоресценції білка при додаванні до нього ліганду, яке ґрунтується на застосуванні класичного або модифікованого рівняння Штерна-Фольмера. При цьому дані, отримані з застосуванням цього підходу, часто суперечать даним інших методів (калориметрії, діалізу тощо).

Таким чином, наявні методи, попри заявлену простоту, потребують додаткового обладнання
30 і реактивів, а кількісні показники, отримані одним методом, можуть відрізнятися від таких, отриманих іншим методом.

Тому на сьогодні існує потреба в простому експрес-способі визначення зв'язування хіміопрепаратів з альбуміном, що знайде застосування при дослідженні та розробці нових лікарських засобів та визначення їх зв'язування з білками, зокрема альбуміном.

35 Використання запропонованого способу дозволить підвищити ефективність досліджень процесу зв'язування лікарських засобів, зокрема хіміопрепаратів, з альбуміном, який представляє інтерес в таких галузях як біохімія, біофізика, онкологія, фармакологія, тощо.

Відповідно об'єктом корисної моделі є спосіб визначення зв'язування хіміопрепарату з альбуміном. При розробці способу використовувались аптечні хіміопрепарати, які в даний час
40 використовуються в комплексному лікуванні хворих на рак різної локалізації:

1. Гемцитабін (вміст 40 мг в 1 мл водного розчину).
2. Доксацел (вміст 40 мг в 1 мл водно-спиртового розчину).
3. Карбоплатин (вміст 10 мг в 1 мл водного розчину).
4. Паклітаксел (вміст 6 мг в 1 мл спиртово-масляного розчину).
- 45 5. Цисплатин (вміст 0,5 мг в 1 мл водного розчину).

Розроблений спосіб визначення зв'язування хіміопрепарату з альбуміном включає наступні стадії:

- а) приготування розчину альбуміну в дистильованій воді;
- б) приготування розчину хіміопрепарату в розчині альбуміну;
- 50 в) нанесення тонкого шару хіміопрепарату в розчині альбуміну, розчину хіміопрепарату та розчину альбуміну на предметні скельця;
- г) висушування предметних скелець;
- д) дослідження предметних скелець на інфрачервоному спектрофотометрі у діапазоні 1600...1700 см⁻¹.

55 Попередні дослідження показали, що альбумін, розчинений у фізіологічному розчині, утворює неякісну плівку на предметному склі, тому готують 5 % розчин альбуміну в дистильованій воді. Така концентрація відповідає вмісту альбуміну в крові.

Розчин альбуміну розливають по 1 мл в 5 пробірок, в кожен додають 0,2 мл розчину хіміопрепарату, одержуючи таким чином розчини хіміопрепаратів в 5 % розчині альбуміну і
60 використовують для визначення зв'язування хіміопрепаратів з альбуміном.

На поверхні підготовлених предметних скелець (ретельно вимитих у суміші ефіру та спирту у відношенні 1:1 та висушених) утворюють тонкий шар, рівномірно розподіляючи 0,05 мл згаданих вище розчинів хіміопрепаратів (кожний розчин на окреме скло у кількості, що досліджуються, 5 % розчину альбуміну та розчинів хіміопрепаратів в 5 %-му розчині альбуміну).

Предметні скельця з нанесеними на них розчинами, що будуть досліджуватись, висушуються протягом 20 хв. у сушильній шафі при температурі $t=36^{\circ}\text{C}$.

Реєстрація спектрів проводилась на інфрачервоному спектрофотометрі Specord M80, оснащеному приставкою відбивання ATR, у смузі Амід I (в діапазоні $1600\ldots 1700\text{ см}^{-1}$). Ця ділянка спектра, як відомо, використовується в ІЧ-спектроскопії для визначення α -спіралі, β -структури та невпорядкованого клубка в білках.

Приведений вище перелік хіміопрепаратів не є обмежуючим і наведений лише з метою ілюстрації розробленого способу. Запропонований спосіб може бути використаний до будь-якого лікарського засобу, зокрема хіміотерапевтичного агента.

Корисна модель пояснюється за допомогою наступних креслень, на яких зображено:

Фіг. 1 - спектри поглинання альбуміну, гемцитабіну і альбуміну з гемцитабіном у смузі Амід I;

Фіг. 2 - спектри поглинання альбуміну, доцетакселу і альбуміну з доцетакселем у смузі Амід I;

Фіг. 3 - спектри поглинання альбуміну, карбоплатину, альбуміну з карбоплатином у смузі Амід I;

Фіг. 4 - спектри поглинання альбуміну, паклітакселу і альбуміну з паклітакселем у смузі Амід I;

Фіг. 5 - спектри поглинання альбуміну, цисплатину і альбуміну з цисплатином у смузі Амід I;

Фіг. 6 - спектри поглинання хіміопрепаратів у смузі Амід I;

Фіг. 7 - спектри поглинання альбуміну та альбуміну в поєднанні з хіміопрепаратами у смузі Амід I.

Розроблений спосіб здійснювали наступним чином.

а) готували 5 % розчин альбуміну в дистильованій воді, розчиняючи 5 г альбуміну в 95 г дистильованої води;

б) вносили згадані вище розчини гемцитабіну, доцетакселу, карбоплатину, паклітакселу та цисплатину у 5 % розчин альбуміну;

в) рівномірно наносили тонким шаром одержані на стадіях а) - б) розчини (кожний розчин на окреме скло у кількості 20 мкл) на поверхні підготовлених предметних скелець (ретельно вимиті у суміші ефіру та спирту у відношенні 1:1 та висушені);

г) предметні скельця з нанесеними на них розчинами висушували протягом 20 хв. у сушильній шафі при температурі $t=36^{\circ}\text{C}$;

д) знімали ІЧ спектри на інфрачервоному спектрофотометрі Specord M80, оснащеному приставкою відбивання ATR, у смузі Амід I ($1600\ldots 1700\text{ см}^{-1}$).

Спектр гемцитабіну має виражені смуги поглинання практично у всій області інфрачервоного спектра. Але саме в області смуги Амід I, яка є предметом наших досліджень, він не має істотних піків (див. Фіг. 1).

Якщо в області смуги Амід I спектри альбуміну і гемцитабіну являють собою практично плавну лінію, без скільки-небудь виражених піків поглинання, то в спектрі плівки, утвореної з розчину гемцитабіну в розчині альбуміну, в зазначеній області мають місце численні піки з вираженими мінімумами поглинання $1695, 1680, 1665, 1650, 1645$ і 1635 см^{-1} .

На відміну від спектрів поглинання альбуміну, доцетакселу, які у смузі Амід I являють собою практично плавну лінію, в спектрі поглинання плівки, утвореної шляхом висушування розчину доцетакселу в розчині альбуміну (див. Фіг. 2), в зазначеній області мають місце досить виражені мінімуми поглинання при $1695, 1680, 1672, 1665, 1650, 1645, 1635$ і 1615 см^{-1} - втім, менш інтенсивні, ніж у випадку альбуміну з гемцитабіном.

Спектри альбуміну і карбоплатину в області смуги Амід I (див. Фіг. 3) являють собою практично плавну лінію, без виражених піків поглинання. В той же час, у спектрі поглинання плівки, утвореної шляхом висушування розчину карбоплатину в розчині альбуміну, в зазначеній області мають місце виражені мінімуми поглинання при $1695, 1680, 1650, 1645$ і 1635 см^{-1} . Але, як і з розчином доцетакселу в розчині альбуміну, вони є менш інтенсивними, ніж у випадку альбуміну з гемцитабіном.

В області смуги Амід I спектри альбуміну і паклітакселу (див. Фіг. 4) являють собою практично плавну лінію без виражених піків поглинання. При цьому в спектрі висушеної плівки розчину паклітакселу в розчині альбуміну в зазначеній області з'являються помітні мінімуми поглинання при $1665, 1650$ і 1645 см^{-1} . Втім, ці піки мають порівняно невелику інтенсивність.

Спектри альбуміну і цисплатину в смузі Амід І (див. Фіг. 5) являють собою практично плавну лінію, а в спектрі плівки висушеного розчину цисплатину в розчині альбуміну в зазначеній області з'являються досить виражені й інтенсивні піки з мінімуми поглинання при 1700, 1680, 1672, 1650, 1645 і 1635 cm^{-1} . Водночас, поглинання суттєво збільшується на ділянці 1690...1660 cm^{-1} .

На Фіг. 6 та 7 графічно інтегрально показані ІЧ-спектри в діапазоні 1700...1600 cm^{-1} хіміопрепаратів та їх розчинів у розчині альбуміну, які залучено до експериментальних досліджень.

З наведених спектрів добре видно, що жоден із цих препаратів у зазначеному діапазоні не має скільки-небудь виражених піків поглинання, що дозволяє знехтувати безпосереднім впливом надлишкової кількості незв'язаних препаратів на спектри поглинання зразків крові та її компонентів.

На Фіг. 7 чітко видно, що при взаємодії кожного з досліджуваних хіміопрепаратів з альбуміном відбувається структурна перебудова альбуміну, яка в ІЧ-спектрі виражається наявністю піків в областях альфа-спіралі і бета-структур.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє зареєструвати ефект взаємодії альбуміну з зазначеними вище хіміопрепаратами, який виражається в появі піків в області 1620...1650 cm^{-1} , що характеризують стан альфа-спіральних бета-структурних ділянок альбуміну.

Розроблений експрес-метод (дослідження можна провести протягом півгодини) дозволяє оцінити взаємодію альбуміну з вказаними вище хіміопрепаратами, і, можливо, з іншими речовинами. Даний спосіб не потребує додаткового обладнання, крім інфрачервоного спектрофотометра, і додаткових реактивів, крім досліджуваних. При цьому в способі відсутнє контактування досліджуваного розчину з іншими середовищами.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення зв'язування хіміопрепарату з альбуміном, що включає наступні стадії:

а) приготування розчину альбуміну в дистильованій воді;

б) приготування розчину хіміопрепарату в розчині альбуміну;

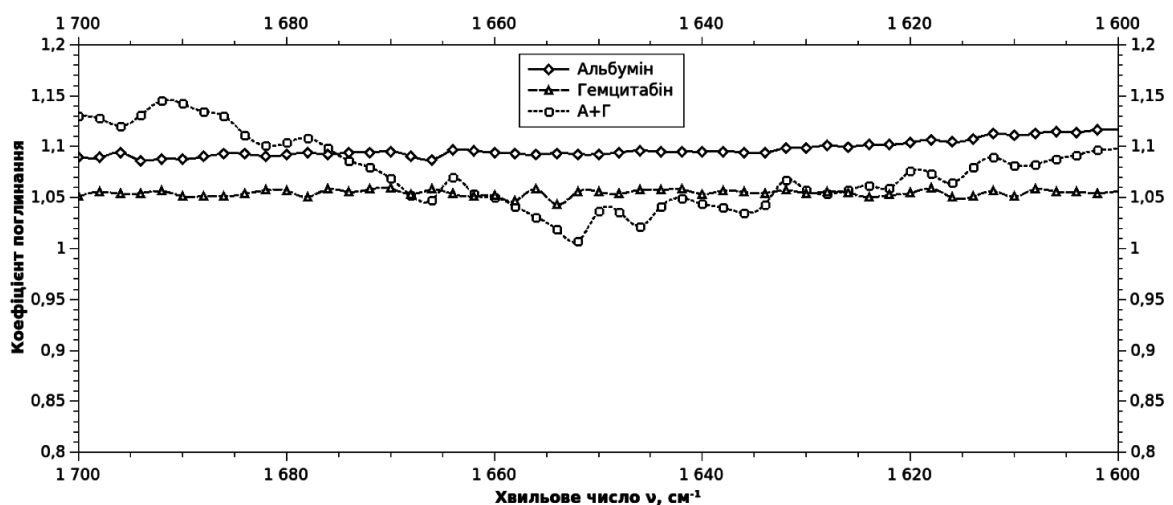
в) нанесення тонкого шару хіміопрепарату в розчині альбуміну, розчину хіміопрепарату та розчину альбуміну на предметні скельця;

г) висушування предметних скелець;

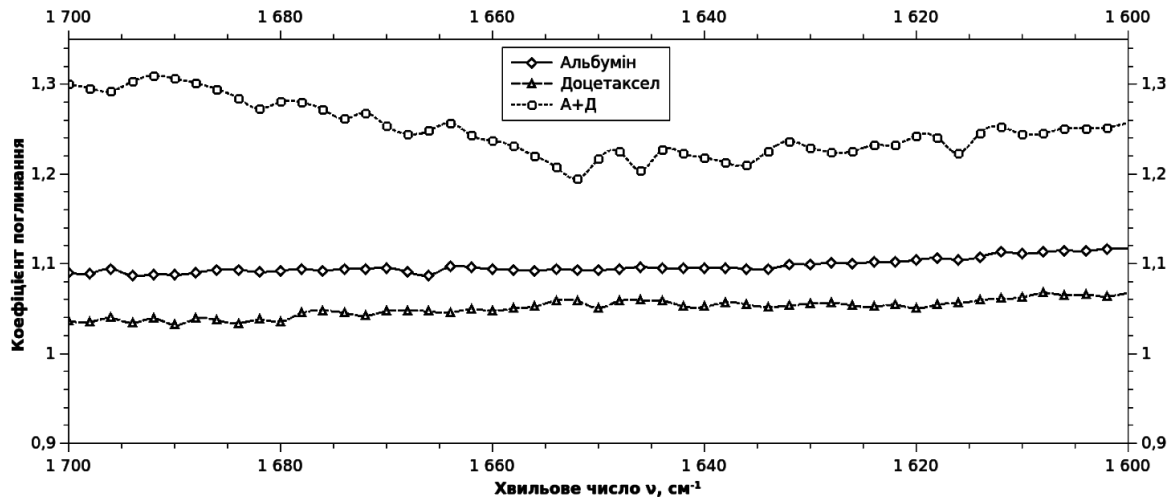
д) дослідження предметних скелець на інфрачервоному спектрофотометрі у діапазоні 1600...1700 cm^{-1} .

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що готують 5 % розчин альбуміну в дистильованій воді.

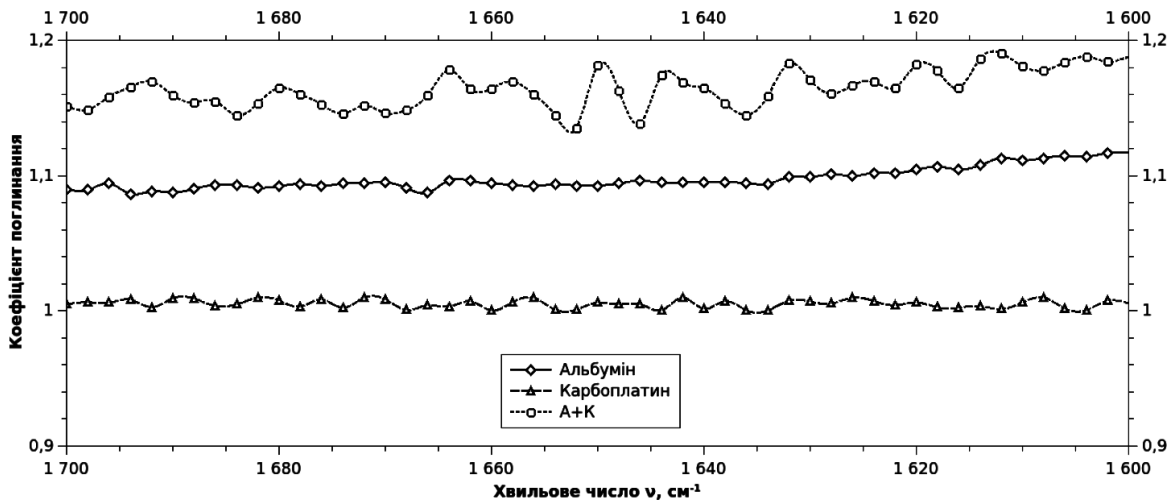
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ІЧ-спектри знімають на інфрачервоному спектрофотометрі, оснащеному приставкою відбивання ATR, у смузі Амід І.



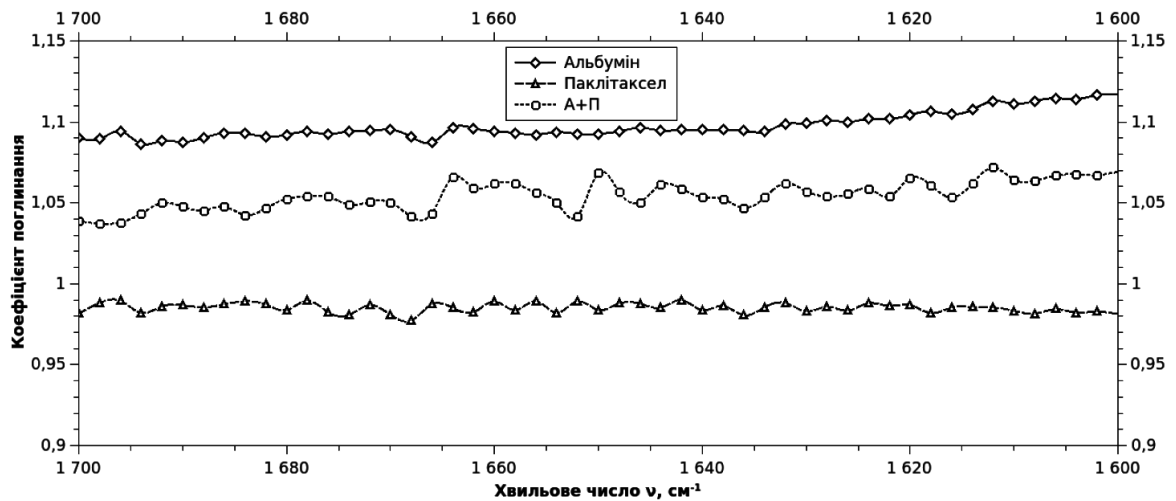
Фіг. 1



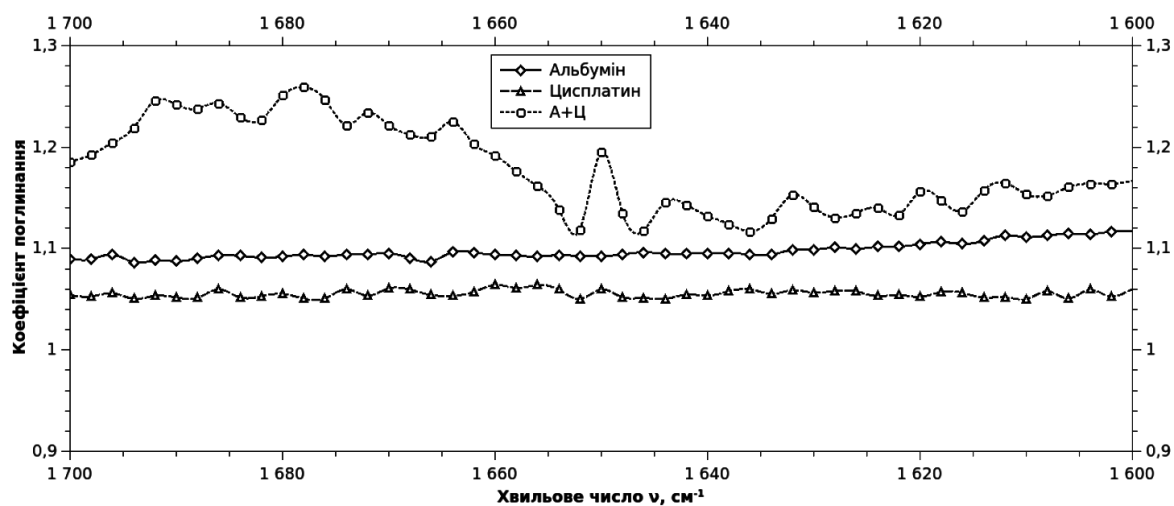
Фіг. 2



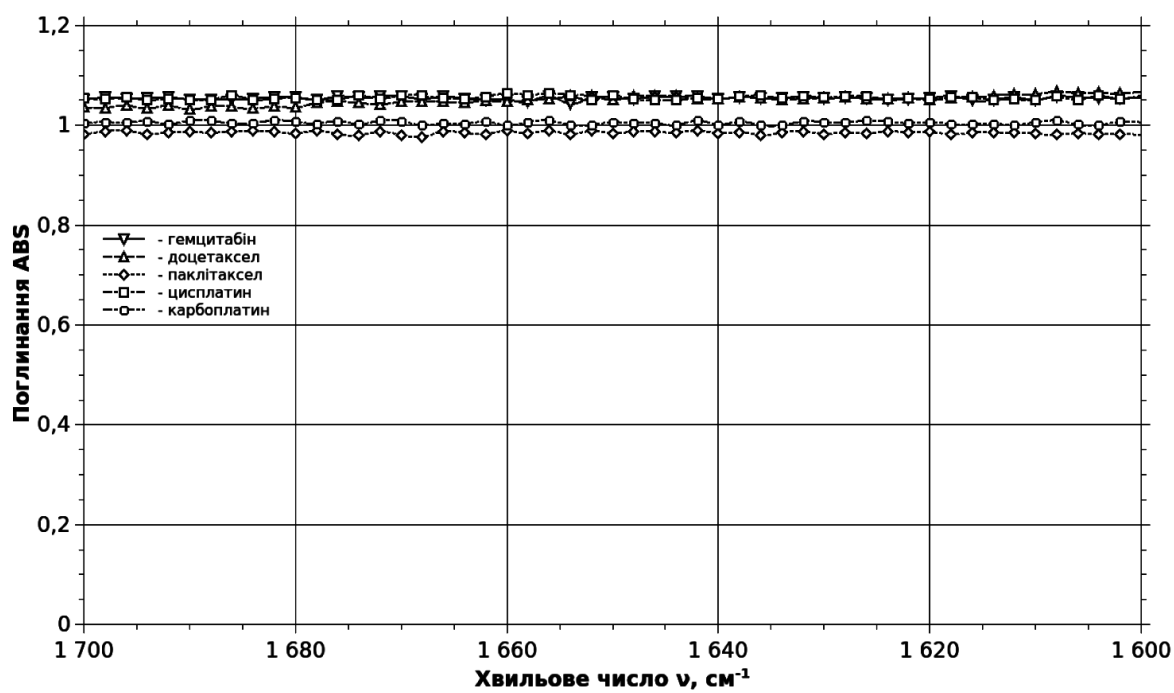
Фіг. 3



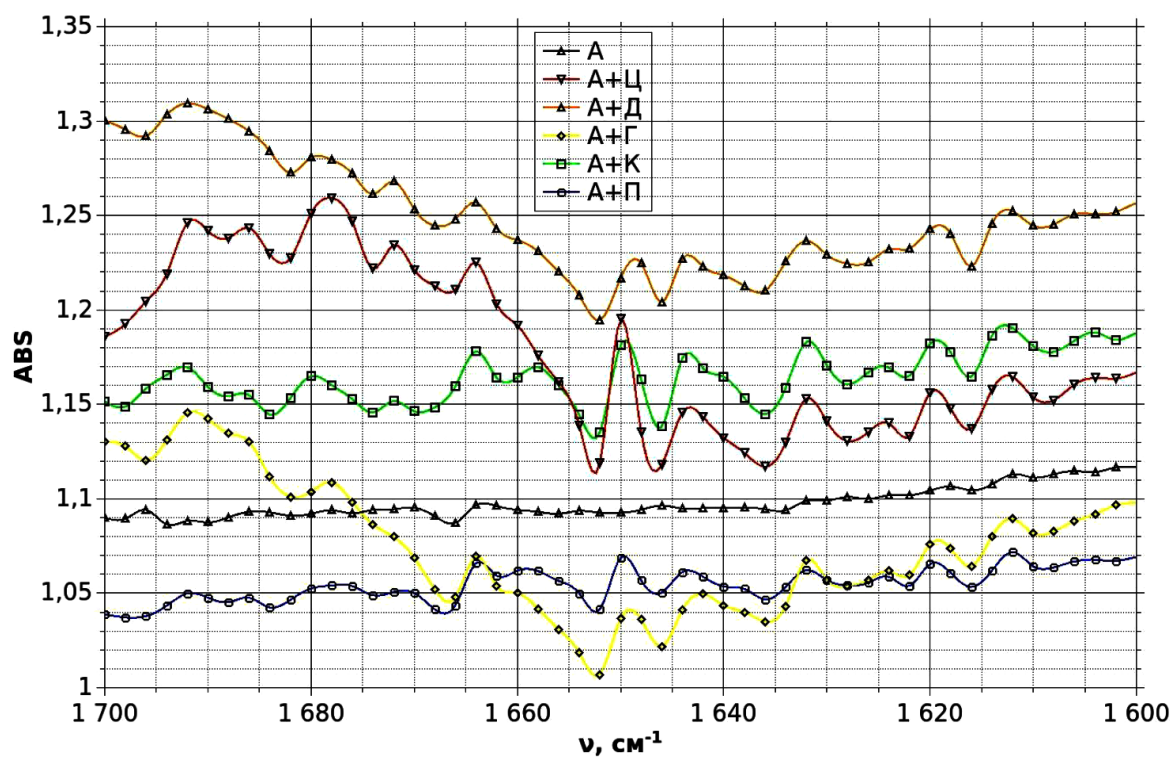
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фиг. 7