



МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116227** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)  
**A61K 41/00**

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>a 2015 06703</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>07.07.2015</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>26.02.2018</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>12.01.2016, Бюл.№ 1</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.02.2018, Бюл.№ 4</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Заболотний Михайло Аполлінарійович (UA), Куліш Микола Полікарпович (UA), Дмитренко Оксана Петрівна (UA), Соляник Галина Іванівна (UA), Прилуцький Юрій Іванович (UA), Драпіковський Максим Анатолійович (UA), Кузьменко Марина Олегівна (UA), Полуян Надія Анатоліївна (UA), Кияшко Владислав Андрійович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01601 (UA)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Солнцев В'ячеслав Сергійович</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Здвіжков Ю. Особливості застосування полімерних носіїв на основі поліетиленгліколю для доставки ліків в орган-мішень / Ю. Здвіжков, М. Бура // Вісник Львівського університету. – 2014. – Вип. 64. – С. 3-20 Bunkin N. F. Bubbstons: stable microscopic gas bubbles in very dilute electrolytic solutions / N. F. Bunkin, F. V. Bunkin // Sov. Phys. JETP. – 1992. – No. 72(2). – P. 271-278 Радиационная стерилизация лекарственной формы доксорубицина на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц / О. О. Максименко, Е. П. Павлов, Э. Г. Тушов [та інш.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2008. - Том 42. - №6. - С. 52-56 Вплив молекулярного оточення на властивості алкалоїдів протипухлинного препарату Коніум / М. А. Заболотний, Н. А. Полуян, Г. І. Довбешко [та інш.] // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2014. – Т. 12. - №4. – С. 651-664 Модифікація протипухлинних препаратів наноструктурами / М. А. Заболотний, М. П. Куліш, І. С. Чекман [та інш.] // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2015. – Т. 13. - №1. – С. 1-14 Імобілізація протипухлинних препаратів на наночастинках / Ю. І. Прилуцький, М. А. Заболотний, Т. І. Соляник [та інш.] // Biotechnologia ACTA. – 2015. – Vol. 8. – No. 2. – P. 107-111 RU 2155051 C1, 27. 08. 2000</p>
--	---

**UA 116227 C2**

**(54) СПОСІБ МОДИФІКАЦІЇ ВОДОРОЗЧИННИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ РАДІАЦІЙНОГО ОПРОМІНЕННЯ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу модифікації водорозчинних протипухлинних препаратів за допомогою радіаційного опромінення, що включає розчинення протипухлинного препарату в дистильованій воді чи водному розчині хлориду натрію, де перед розчиненням протипухлинного препарату в розчиннику, розчинник окремо від протипухлинного препарату опромінюють радіаційним опроміненням електронами в дозі від 1 кГр до 10 кГр, а як протипухлинний препарат використовують доксорубіцин або коніум.

Винахід належить до галузі біології та медицини і стосується нанотехнологічних способів модифікації протипухлинних препаратів та може бути застосованим в фармакологічній галузі для підвищення ефективності існуючих та/або створення нових протипухлинних препаратів з підвищеною терапевтичною дією з метою мінімізації негативних наслідків їх застосування та зменшення дозового терапевтичного навантаження на організм.

Досвід застосування протипухлинної хіміотерапії показав обмеженість її можливостей і низьку ефективність при лікуванні місцево поширених і дисемінованих форм злоякісних новоутворень. Аналіз особливостей протипухлинної медикаментозної терапії (ПМТ), пов'язаних з низькою специфічністю протипухлинної дії та високою токсичністю відносно нормальних органів та тканин гостро ставить питання щодо розробки шляхів підвищення її ефективності [1-4]. Розробка нових лікарських засобів та модифікація фармакологічних властивостей вже відомих протипухлинних агентів, що спрямовані на підвищення їх ефективності та зниження токсичності - шляхи розв'язання цієї проблеми.

На сьогоднішній день спостерігається стійка тенденція до індивідуалізації лікування онкологічних хворих, що пов'язано зі значною індивідуальною варіабельністю чутливості організму до терапевтичних засобів (яка може відрізнятися в 10-40 разів) та низькою вибірковістю протипухлинної дії ПМТ. Остання проявляється в тому, що різниця між дозою протипухлинних препаратів, яка забезпечує ефективне інгібування пухлинного процесу, та дозою, що обумовлює значні ураження нормальних органів та тканин організму, дуже мала [4]. Суттєвий вклад у високу варіабельність чутливості організму до ПМТ вносить лікарська резистентність злоякісних пухлин. Останні роки первинно чутливими до хіміотерапії є не більше 40 % первинних хворих на рак і з роками спостерігається тенденція до зменшення цього відсотка. Отже, розробка оптимальної стратегії і тактики ефективної індивідуальної ПМТ як створення нових протипухлинних препаратів, спрямована на підвищення їх протипухлинної ефективності, зниження токсичності та мінімізації дозового терапевтичного навантаження є актуальною задачею.

Відомий метод [5], вибраний, як аналог, підвищення ефективності протипухлинної дії наноплатини для інактивації ракових клітин. (Протипухлинна дія наночастинок платини обумовлюється створенням активних форм кисню ( $H_2O_2$  та  $O_2$ ) під впливом іонів платини та пошкодженням ними ДНК клітин. Для запобігання коагуляції частинок наноплатини та забезпечення сталого режиму генерації активних форм кисню використовуються різні використовуються різні типи стабілізаторів наночастинок (полісахариди, полівініловий спирт, наночастинки фолатів). Модифіковані за допомогою цього методу протипухлинні препарати мають покращену цитотоксичну дію і таргетну селективність у порівнянні з нестабілізованими препаратами.

Разом з тим, відомо, що створені за цією методикою протипухлинні препарати мають суттєві недоліки. Так, внаслідок того, що стабілізатори утворюють асоціати з наночастинками платини за використання сильного електростатичного зв'язку, їх важко роз'єднати між собою при досягненні терапевтичної мішені, що значно зменшує протипухлинну ефективність препарату і робить менш прогнозованим час його виведення із організму.

Ще одним відомим аналогом [6, 7] є метод модифікації водорозчинних протипухлинних препаратів за рахунок зміни його властивостей за допомогою допування його вуглецевими наноструктурами, серед яких найчастіше використовується фулерен  $C_{60}$ . Використання в ролі допанту  $C_{60}$  було викликано його високою біологічною активністю, що обумовлювався електронodefіцитністю  $C_{60}$ . Ця особливість допанту приводить до появи його здатності взаємодіяти з вільними радикалами та передавати енергію збудженого стану молекулам звичайного кисню, перетворюючи його в синглетний кисень.

При цьому методі модифікації протипухлинного препарату використовувалося з'єднання та подальше перемішування лікарського препарату. Проведені дослідження [7] показали (на прикладі доксорубіцину) покращення терапевтичних властивостей комплексу лікарський препарат + фулерен. Недоліком цього способу є можливість утворення непередбачуваних асоціатів, які складаються з декількох молекул активних субстанцій лікарських препаратів і однієї молекули фулерену. Така можливість обумовлена здатністю фулерену абсорбувати 6-7 електронів. Ще більша терапевтична невизначеність дії модифікованого препарату виникає при утворенні в розчині димерів фулерену, біологічна дія яких слабо досліджена.

У роботі [8] було запропоновано радіаційний метод, який приймається за прототип, збільшення ефективності дії водорозчинних протипухлинних препаратів, зокрема доксорубіцину, за рахунок застосування нової нанорозмірної системи доставки активних субстанцій ліків у клітини пухлин, як чутливих, так і резистентних до дії протипухлинних препаратів. Для цього використовували модифікований поліетиленгліколем полімерний носій

ВЕР - ГМА, синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету "Львівська Політехніка".

5 Основою технології, що використовується у виробництві таких препаратів, є електронні прискорювачі, що мають змогу формувати спрямований потік прискорених електронів з енергією кілька MeV, здійснювати опромінення протягом довільно обраного часу, точно дозувати поглинену об'єктом дозу опромінення. При реалізації цієї методики [8] було використано оригінальні технологічні рішення, коли при спільному і одночасному опроміненні біологічноактивних молекул і водорозчинних інертних полімерів (поліетиленоксид, поліакриламід, декстрини) досягається ковалентне зшивання полімеру й активної речовини без пошкодження навіть нестійких молекул. Зшивання здійснюється шляхом активації вільно-радикальних процесів, характеризується формуванням міцних ковалентних зв'язків. Використання даної технології дало змогу створювати лікарські препарати з низькою токсичністю (відсутність алергічних реакцій), високою ефективністю (збільшення тривалості дії за рахунок іммобілізації на полімері-носії молекул активних субстанцій, що не піддаються деградації), а також високою біодоступністю (полімер-носії дає активним речовинам змогу всмоктуватися в кишечнику, захищаючи від руйнування травними ферментами).

20 В результаті проведених досліджень було показано, що доксорубіцин, іммобілізований на такому полімерному носії, значно сильніше, ніж вільний доксорубіцин, пригнічує проліферацію клітин лінії A549 карциноми легені людини, лінії HCTU6 колоректальної карциноми людини, лінії MCF-7 та її резистентної до доксорубіцину сублінії MCF-7/ADR карциноми молочної залози людини. Було показано, що застосування полімерного носія ВЕР-ГМА-ПЕГ дало змогу знизити діючу дозу доксорубіцину щонайменше у 10 разів зі збереженням антинеопластичного ефекту цього препарату, що передбачає суттєве зменшення негативних побічних ефектів такої хіміотерапії.

25 В той же час таке використання радіаційного опромінення має ряд недоліків. Так, оскільки взаємодія радіаційного опромінення з молекулами речовини має ймовірностний характер, не можливо забезпечити ініціювання ним тільки процесу зшивки молекул полімеру і активної субстанції. Одночасно під дією високоенергетичного опромінення може реалізуватися неконтрольована деструкція вихідних реагентів, результаті якої можуть утворюватися токсичні (або біологічно агресивні) речовини. Крім того, були зареєстровані випадки, що утворені ковалентні зв'язки кон'югатів полімер - активна субстанція зв'язки заважають звільненню молекул активних субстанцій, що спричинено впливом навколишнього середовища. Це обумовлює необхідність використання для вивільнення вихідної лікарської речовини *in situ* активації препаратів зовнішньо- чи внутрішньоклітинними ферментами або зміни рН при використанні комплексу ПЕГ - активна субстанція.

35 Задача винаходу полягає в розробці безпечного способу який зможе забезпечити ініціювання процесу зшивки молекул полімеру і лікарської речовини без утворення побічних токсичних продуктів.

40 Поставлена задача винаходу вирішується за рахунок зміни властивостей (конформаційного стану) молекул активних субстанцій в розчинах, що базується на використанні попереднього опромінення розчинника, перед розчиненням в ньому лікарського препарату.

45 Технічний результат запропонованого винаходу полягає у створенні нового способу модифікації водорозчинних активних субстанцій, зокрема, з підвищеною терапевтичною дією, що приводить до мінімізації негативних наслідків їх застосування та зменшення дозового терапевтичного навантаження.

Технічний результат запропонованого винаходу полягає у підвищенні терапевтичної дії протипухлинних препаратів, за рахунок створення нового більш безпечного способу модифікації водорозчинних активних субстанцій та зменшенні негативних наслідків їх застосування за рахунок зменшення дозового терапевтичного навантаження на організм.

50 Суть винаходу полягає в тому, що під дією поглинутого опромінення розчинник переходить у збуджений метастабільний стан, обумовлений появою радіаційно обумовлених бабстонів [9] (нанорозмірних повітряних пузирчиків, оточених подвійним електричним шаром). Час експозиції розчинника пов'язаний з флюенсом радіаційного опромінення конкретного джерела опромінення, визначається експериментально і вибирається таким чином щоб концентрація індукованих опроміненням бабстонів в розчиннику перевищувала їх концентрацію в рівноважному (до опромінення) стані, але не була такою, щоб процеси коагуляції та кластеризації бабстонів стали суттєвими. Крім того, опромінення виконувалось при забезпеченні відсутності значних нерівноважних локальних температур в середині розчинника. Температурна однорідність зразка забезпечувала однорідність генерації бабстонів в розчиннику. Час існування бабстонів може досягати декілька місяців. При наближенні бабстонів

до молекул активних субстанцій може утворитись комплекс бабстон + молекула активної субстанції. Умова існування рівноважного стану створеного комплексу відрізняється від умови існування рівноважного стану молекули лікарського препарату. В комплексі бабстон + молекула активна субстанція молекула активної субстанції знаходиться у конформаційному стані, відмінному від конформаційного стану уособленої молекули. При підході комплексу бабстон + молекула активної субстанції до мішені, бабстон переходить до її оточення (як такої, що має більшу поверхню). Після розпаду комплексу від нього залишається усамітнена молекула активної субстанції в збудженому, в більш активному стані, температура розчинника під час опромінення не перевищує верхню межу біологічно значимого інтервалу температур.

Додатково суть винаходу пояснюється ілюстраціями:

Фіг. 1 Залежність 14 спектрів нормованого поглинання (А) розчину доксорубіцину в неопромінену (пунктирна крива) та опромінену (В) (поглинута доза 10 кГр, суцільна крива) розчин натрію хлориду від енергії фотонів ( $\epsilon$ );

Фіг. 2 ІЧ спектрів водних розчинів Коніуму при різних дозах поглинутого опромінення; крива 1-0 кГр, 2-5 кГр, 3-10 кГр. Криві 2 та 3 зсунуті по осі ординат вгору на 0,1 та 0,2 у.о. відповідно.

Приклад 1. Фіксація конформаційних змін водорозчинних молекул доксорубіцину проводилася за допомогою визначення обумовлених радіаційним опроміненням змін коливних спектрів розчинів доксорубіцину на приладі ІЧ-фур'є спектрометра Bruker IFS 66 (Німеччина). Точність визначення хвильового числа складала  $0,2 \text{ см}^{-1}$ , точність визначення пропускання  $0,1 \%$ . Реєстрація і обробка спектрів проводилася за допомогою програми OPUS 5.5. Як розчинник використовувався розчин для інфузій (натрію хлорид концентрації  $9 \text{ мг/мл}$ , виробництва ТОВ "Новофарм - Біосинтез", Украфна). Перед додаванням розчинника до доксорубіцину (виробник ВАТ "Київмедпрепарат", м. Київ, Україна), його опромінювали електронним опроміненням на лінійному прискорювачі ІЛУ - 6 з енергіями  $1,8 \text{ Мев}$  та  $2,0 \text{ Мев}$ . Опромінювалися зразки розчинника, набраного в стерильні медичні шприци  $20 \text{ мл}$ . Величини дози (І) поглинутого опромінення були  $1, 10, 40$  та  $80 \text{ кГр}$ , при проведенні опромінення температура розчинника змінювалася не більше ніж на  $5^\circ\text{C}$ . Безпосередній час експонування знаходився в межах  $4\text{-}30$  хвилин, час знаходження зразка в камері прискорювача (час експонування та час його охолодження) не перевищував  $5$  годин. Після опромінення колір використаних шприців не змінювався. Після закінчення опромінення розчинника, розчинник та розчин доксорубіцину з'єднувалися у пропорції  $1:1$  при кімнатній температурі та перемішували за допомогою одноквилинного збовтування. У випадках, коли час між опроміненням зразків і виміром його поглинання не перевищував  $7\text{-}10$  днів поглинання не залежало від часу вимірів, при більших проміжках часу фіксувалися релаксаційні процеси. Результати вимірів ілюструє Фіг. 1, де наведені  $14$  спектри нормованого поглинання (А) розчину доксорубіцину в неопромінену та опромінену розчині натрію хлориду.

При співставленні залежностей  $A(\epsilon)$  при різних І використовувався кореляційний аналіз Пірсона [10]. Для визначення величини кореляції між спектрами поглинання  $A(\epsilon, 0 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon, 10 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon, 40 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon, 80 \text{ кГр})$  на проміжку  $[1000, 2000]$ , цей проміжок рівномірно розбивався на точки ( $\epsilon_i, i=1\text{-}201$ ), в яких при використанні даних вимірів визначалися значення  $A(\epsilon_i, 0 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon_i, 10 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon_i, 40 \text{ кГр})$ ,  $A(\epsilon_i, 80 \text{ кГр})$ . З використанням одержаних даних обраховувалися коефіцієнти кореляції Пірсона. Було визначено, що  $\langle A(\epsilon_i, 0 \text{ кГр}), A(\epsilon_i, 10 \text{ кГр}) \rangle = 0,31$ ;  $\langle A(\epsilon_i, 0 \text{ кГр}), A(\epsilon_i, 40 \text{ кГр}) \rangle = 0,29$ ;  $\langle A(\epsilon_i, 0 \text{ кГр}), A(\epsilon_i, 80 \text{ кГр}) \rangle = 0,26$ . Критичне значення коефіцієнту кореляції при такій величині виборки і при рівні значимості (точності прогнозування)  $0,01$  ( $1 \%$ ) рівний  $0,13$ .

Приклад 2. Дослідження змін молекул спиртового розчину алкалоїдів препарату Коніум (виробництва КТ "Фармація", Україна) проводилася за допомогою визначення обумовлених радіаційним опроміненням змін коливних спектрів розчинів Коніуму на приладі ІЧ-фур'є спектрометра Bruker IFS 66 (Німеччина). Точність визначення хвильового числа складала  $0,2 \text{ см}^{-1}$ , точність визначення пропускання  $0,1 \%$ . Реєстрація і обробка спектрів проводилася за допомогою програми OPUS 5.5. В якості розчинника використовувався дистиллят води (виробництва об'єднання "Мікорпаг", Україна) в ампулах  $10 \text{ мл}$ . Перед додаванням розчинника до Коніуму, дистиллят води опромінювали електронним опроміненням на лінійному прискорювачі ІЛУ - 6 з енергією  $2,0 \text{ Мев}$ . Опромінювалися зразки розчинника, набраного в стерильні медичні шприци  $20 \text{ мл}$ . Величини дози поглинутого опромінення були  $5, 10$  та  $15 \text{ кГр}$ , при проведенні опромінення температура розчинника змінювалася не більш ніж на  $5^\circ\text{C}$ . Після закінчення опромінення розчинника, розчинник та розчин Коніуму з'єднувалися у пропорції  $1:1$  при кімнатній температурі та перемішували за допомогою одноквилинного збовтування. Виміри відбувалися не пізніше  $10$  днів після опромінення дистилляту води. Температура зразка знаходилася в межах  $20\text{-}25^\circ\text{C}$ . Результати вимірів ілюструє Фіг. 2, де наведені  $14$  спектри

нормованого поглинання розчину Коніуму в неопроміненому та опроміненому дистилляту води. З наведених графіків видно, що додавання опроміненого розчинника впливає на положення максимумів смуг поглинання. Наприклад, зміщення лінії 1120 см<sup>-1</sup> (крива 1) в положення 1106 см<sup>-1</sup> (крива 2), а потім в точку 1089 см<sup>-1</sup> (крива 3). Таке зміщення ліній поглинання в коливній ділянці оптичного спектру свідчить про конформаційні зміни молекул Коніуму, обумовлені додаванням до нього радіаційно опроміненого дистилляту води.

Таким чином, попереднє радіаційне опромінення розчинника, не змінюючи суттєво самої активної субстанції (у всіх випадках коефіцієнт кореляції перевищує критичне значення), приводить до змін його властивостей в коливальному діапазоні, який суттєво залежить від конформаційного стану молекул. Запропонований спосіб забезпечує ініціювання процесу зшивки молекул полімеру і активної субстанції без утворення побічних токсичних продуктів, що приводить до створення нових способів модифікації водорозчинних активних субстанцій, зокрема протипухлинних засобів, з підвищеною терапевтичною дією та дозволяє досягти технічного результату, який полягає в мінімізації негативних наслідків їх застосування та зменшення дозового терапевтичного навантаження.

Джерела інформації:

1. Чехун В.Ф., Создание новых лекарственных форм на основе нанокompозитных материалов для решения современных проблем онкологии, *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies*, 2011, т. 9, №1, сс. 261-274.

2. Чекман І.С. Нанофармакологія. - К.: Задруга. - 2011. - 424 с.

3. Щепотін І.Б., Васильєв О.В., Розумій Д.О., Приймак В.В., Лукашенко А.В., Жуков Ю.О., Бурлака А.А. Індивідуалізація хіміотерапії у хворих на рак шлунка (огляд літератури та власних досліджень), *Український медичний часопис*. 2010, №4 (78) - VII/VIII, 67-69.

4. Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Пясовська О.М., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л. Спосіб застосування аконітинмісного агента як антиангіогенного протипухлинного засобу. Пат. 48524 Україна, МПК А 61 К 35/76, А 61 Р 35/04. № u200908954; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6.

5. Эстрела-Льопис В.Р., Чевычалова А.В., Фесенко Е.М. та інші, Гетерокоагуляция модифицированных полисахаридами и функционализированных фолатами наночастиц платины с раковыми клетками *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies*, 2013, т. 11, № 4, с. 741-755

6. Zabolotnyi M.A., Momot A.L., Dovbeshko G.I., Gnatyuk E.P., Solyanyk G.I., Dmytrenko O.P., Kulish N.P., Modification of alkaloid structure in the conium dtug with fullerenes C60 //Ukr. J. Phys. - 2012. - Vol. 57, No. 7. - 1739-1745.

7. Прилуцька С.В., Спосіб лікування злоякісних пухлин комбінацією не модифікованих фулеренів C<sub>60</sub> і доксорубіцину, Патент України № 102139, від 10.06.2013

8. Здвіжков Ю., Бура М. Особливості застосування полімерних носіїв на основі поліетиленгликолю для доставки ліків в орган - мішень, *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2014. Випуск 64. С. 3-20.

9. Bunkin N.F., Bunkin F.V., Bubbstons: stable microscopic gas bubbles in very dilute electrolytic solutions //JETP. 1992. Vol. 74. No. 2. P. 512-528.

10. Руденко В. М. Математична статистика. Навч. посіб. - К.: Центр учбової літератури, 2012. - 304 с.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб модифікації водорозчинних протипухлинних препаратів за допомогою радіаційного опромінення, що включає розчинення протипухлинного препарату в дистильованій воді чи водному розчині хлориду натрію, який **відрізняється** тим, що перед розчиненням протипухлинного препарату в розчиннику, розчинник окремо від протипухлинного препарату опромінюють радіаційним опроміненням електронами в дозі від 1 кГр до 10 кГр, а як протипухлинний препарат використовують доксорубіцин або коніум.

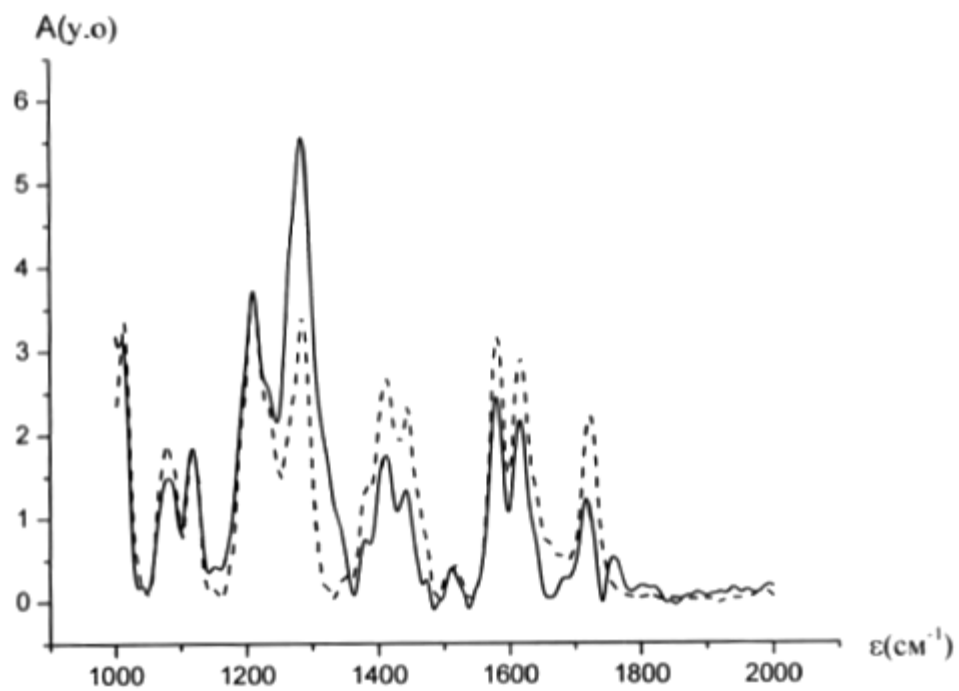


Fig. 1

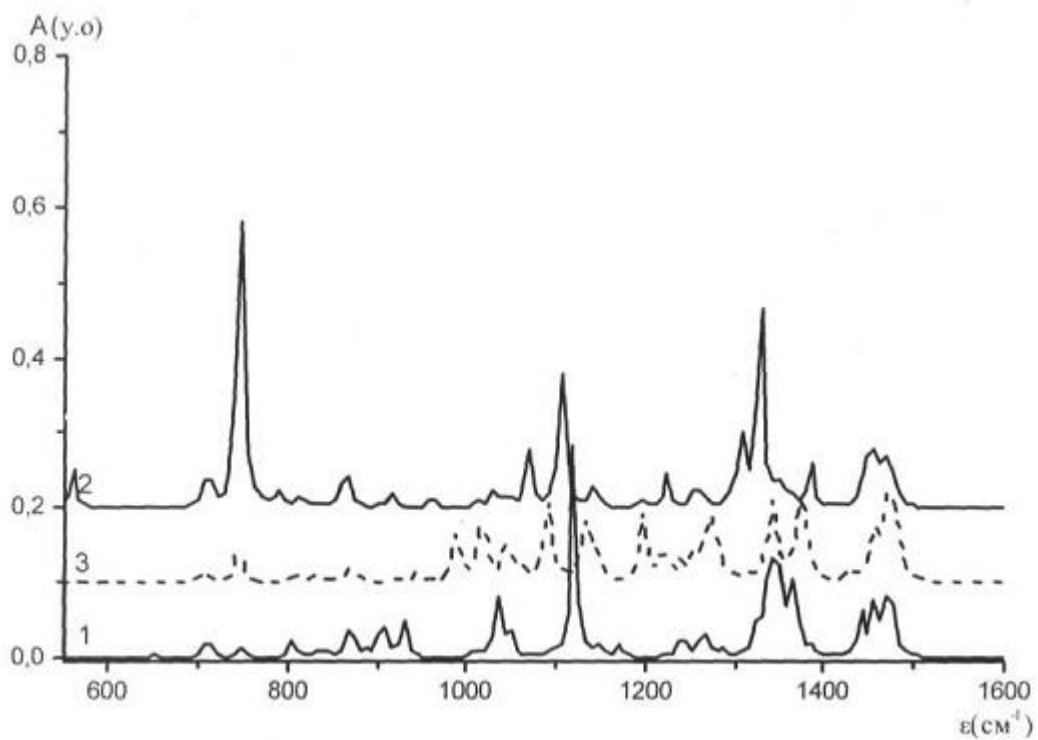


Fig. 2

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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