



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110280** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

A61K 47/30 (2006.01)**A61P 35/00****A61K 9/51** (2006.01)**B82Y 5/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21)	Номер заявки:	а 2014 05945	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22)	Дата подання заявки:	30.05.2014		Anionic Micelle-Forming Triblock Copolymers as Nanocontainers for Doxorubicin / L. R. Kunitskaya, R. S. Stoika, Y. A. Shlyakhtina et al. // Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2012) : 2-nd International conference, Alushta, the Crimea, September 17-22, 2012 / Edited by: A. Pogrebnjak. - Sumy : Sumy State University, 2012. - V. 1, No. 2, abstract.
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.12.2015		Block Copolymers of Polyacrilamide and Poly(ethylene oxide) as Nanocarriers for Drug Delivery: Micellization and Bulk Structure / L. Kunitskaya, T. Zheltonozhskaya, N. Permyakova // Macromolecular Symposia. – 2012. - Vol. 317. - № 1. – P. 47-54
(41)	Публікація відомостей про заявку:	10.10.2014, Бюл.№ 19		Kunitskaya, L. et al. The Self-Assembly of Diblock Copolymers MePEG-b-PAAm Into Micellar Structures and Their Interaction with Doxorubicin // Mol. Cryst. Liq. Cryst.-2011.- 536.-P. 398-404
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.12.2015, Бюл.№ 23		
(72)	Винахідник(и):	Куницька Лариса Ремівна (UA), Желтоножська Тетяна Борисівна (UA), Стойка Ростислав Степанович (UA), Бойко Наталія Миколаївна (UA)		
(73)	Власник(и):	КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01601 (UA)		

(54) МІЦЕЛЯРНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИРАКОВОГО ПРЕПАРАТУ**(57) Реферат:**

Винахід стосується міцелярної композиції для доставки протиракового препарату, що як міцелярні носії протиракового препарату містить частково гідролізовані подвійні гідрофільні диблок- або триблок-кополімери (ДБК-СООН або ТБК-СООН) поліакриламідну та метоксиполіетиленоксиду або поліетиленоксиду (МОПЕО-*b*-ПАА або ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА) з хімічно комплементарними блоками різної довжини, які утворюють інтрамолекулярні полікомплекси та міцелярні структури моно- і полімолекулярного типів, а як протираковий препарат містить гідрохлорид доксорубіцину.

UA 110280 C2

Винахід належить до створення і застосування в живих організмах біосумісних міцелярних систем доставки речовин протипухлинної дії, зокрема доксорубіцину (ДРЦ), і може використовуватись в біології, медицині та нанобіотехнологіях для створення розчинних форм токсичних лікарських препаратів та зниження їх активної дози, що дозволяє захистити здорові органи і тканини організму від руйнівної дії токсичних лікарських субстанцій при хіміотерапії.

Для вирішення проблеми доставки в живих організмах погано розчинних у воді та токсичних протипухлинних препаратів використовують комплексоутворюючі агенти, органічні та неорганічні нано- і мікрочастинки, мікроемulsії, міцелярні системи. Серед них найбільш перспективними носіями токсичних лікарських субстанцій є міцелярні наноконтейнери. У даному винаході створення водорозчинної форми ДРЦ досягається шляхом його інкапсуляції міцелами подвійних гідрофільних блок-кополімерів з хімічно комплементарними компонентами.

Аналогом запропонованого винаходу є система для адресної доставки ліків на основі міцелярної композиції, до складу якої входить ДРЦ та кополімер стиролу з малеїновою кислотою [Greish K. SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumors/ K.Greish, T.Sawa, J.Fang, T.Akaike, H.Maeda// J.Controlled Release. - 2004.V.97. - P.219-230]. В такій системі ДРЦ утримується міцелами кополімеру за рахунок гідрофобних взаємодій між молекулами лікарського препарату та стирольної складової.

Однак для створення таких полімерних міцелярних систем використовують блок-кополімери, побудовані з гідрофільних та гідрофобних блоків, що потребує особливих умов їх приготування.

Відомі композиції слабозрозчинних у воді лікарських препаратів, в тому числі ДРЦ, з міцелами на основі кополімерів N-вінілпіролідону, N-ізопропілакриламід та естеру малеїнового ангідриду з поліетиленгліколем, які додатково зшиті N,N'-метилен-біс-акриламідом для стабілізації міцелярної структури [Євразійський патент 017682 B1. - Опубл. 28.02.2013].

Нажаль, N-вінілпіролідон та N-ізопропілакриламід є токсичними речовинами і їх присутність в препаратах, передбачених для застосування в живих організмах, є небезпечною. Крім того зшиті полімери, як правило, не розкладаються *in vivo*, отже їх застосування у фармацевтичних композиціях вкрай небажане.

Відомі також міцелярні композиції ДРЦ з диблок-кополімерами, одержаними на основі полівінілпіролідону і полі(D,L-лактиду) [Патент РФ 2308943 C2. -Опубл. 27.10.2007], поліетиленоксиду і похідних поліаспарагінової кислоти [Патент РФ № 2321412 C2. -Опубл. 10.04.2008], поліетиленгліколю та інших гідрофобних поліетерів [Патент США 6,623,729 B2. - Опубл. 23.09.200310], в яких ДРЦ хімічно прив'язаний до гідрофобного блока.

Такі композиції прискорюють доставку ДРЦ до пухлини і запобігають його токсичним проявам щодо здорових тканин, але синтез таких кон'югатів є багаторічним і досить складним.

Запропонована також система доставки погано розчинних у воді біологічно активних речовин шляхом їх інкапсуляції водорозчинними гребенеподібними кополімерами, що містять полі-N-вінілпіролідон, полівініловий спирт, поліакриламід, полі-N-(2-гідроксипропіл)метакриламід, солі ненасичених карбонових кислот (гідрофільна складова) та один або два аліфатичних радикала з числом атомів вуглецю у вуглеводневому ланцюзі 6-25 (гідрофобна складова) [Патент RU № 2325151 C2 -Опубл. 27.05.2008].

Недоліком запропонованої системи є те, що при її приготуванні використовуються токсичні органічні розчинники, наприклад, етилацетат, ДМСО, ДМФА, що є небезпечними для живих організмів. Крім того, випаровування розчинника припускає дію підвищеної температури на реагенти, що може привести до розпаду фармацевтично активних інгредієнтів та зниження їх фармакологічної дії.

Найбільш близькими за технічним рішенням до заявленого винаходу - прототип - є міцелярні системи на основі амфіфільних блок-кополімерів за участю поліетиленгліколю (ПЕГ) та поліортоестерів (ПОЕ) типу ПЕГ-b-ПОЕ, ПЕГ-b-ПОЕ-b-ПЕГ або ПОЕ-b-ПЕГ-b-ПОЕ [Патент США US5939453 А. -Опубл. 17.08.1999]. Полімерна складова таких систем, побудована з гідрофільних блоків ПЕГ та гідрофобних блоків ПОЕ, утворює міцели в водному середовищі і здатна інкапсулювати широкий спектр фармацевтичних агентів, включаючи антигени, антитіла, гормони, антидепресанти, наркотичні речовини, серцево-судинні та гіпотензивні препарати, протипухлинні препарати, в тому числі ДРЦ. Однак відсутність в патенті інформації щодо біологічної активності заявлених систем не дає можливості визначити терапевтичну дозу лікарського препарату, одержаного на основі запропонованих блок-кополімерів. Крім того, методика їх одержання передбачає двостадійний синтез з виділенням проміжних продуктів реакції, що значно ускладнює загальний процес приготування міцелярної системи.

Задачею даного винаходу є розробка більш простої за приготуванням міцелярної композиції на основі міцел подвійних гідрофільних блок-кополімерів, що одержуються в одну стадію та не потребують виділення проміжних продуктів реакції, та погано розчинного у воді токсичного протипухлинного препарату доксорубіцину (ДРЦ), яка посилює протиракову активність препарату, дозволяє знизити його терапевтичну дозу при хіміотерапії і таким чином зменшити його токсичну дію на здорові органи і тканини організму.

Поставлена задача вирішується тим, що як міцелоутворюючі блок-кополімери з асиметричними, біосумісними, неімуногенними, гідрофільними і взаємодіючими між собою блоками використовують ди- та триблок-кополімери (ДБК та ТБК) МОПЕО-*b*-ПАА і ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА, що містять метоксиполіетиленоксид або поліетиленоксид з середнім ступенем полімеризації $P_n=16-136$ і $23-909$, відповідно, та поліакриламід з $P_n=140-3520$, а також їх частково гідролізовані похідні (ДБК-СООН та ТБК-СООН). Блоки МОПЕО/ПЕО та ПАА є хімічно комплементарними і в результаті взаємодії за рахунок кооперативних водневих зв'язків утворюють інтрамолекулярні полікомплекси (ІнтраПК).

Подальша сегрегація гідрофобних ділянок зв'язування блоків у водному середовищі призводить до формування особливих нанорозмірних міцелярних структур з гідрофобним комплексним "ядром". В "короні" таких міцел знаходяться "надлишкові" (незв'язані) ланки більш довгих блоків ПАА або їх частково гідролізованих похідних.

Таким чином, міцели ДБК/ТБК та ДБК(СООН)/ТБК(СООН) є нанорозмірними структурами з гідрофобним "ядром", утвореним ділянками зв'язування блоків ПАА і ПЕО, та гідрофільною "короною", побудованою незв'язаними сегментами ПАА або їх частково гідролізованими похідними, а заявлена міцелярна композиція - це міцели вказаних блок-кополімерів з інкапсульованим протираковим препаратом доксорубіцином. Композиція має високу стабільність, що запобігає швидкому вивільненню ДРЦ і посилює його протиракову активність. Хімічна модифікація одного з гідрофільних блоків з утворенням в макромолекулах ДБК(СООН)/ТБК(СООН) протилежно заряджених груп є додатковим стабілізуючим фактором для утримання лікарського препарату у ядрі міцели.

Технічний результат заявленої міцелярної композиції полягає у легкості її приготування та високій стабільності, яка запобігає швидкому вивільненню ДРЦ і посилює його протиракову активність в 2-5 разів у порівнянні з ефективністю чистого препарату, а створення в макромолекулах ДБК-СООН та ТБК-СООН невеликої кількості карбоксильних груп сприяє більш сильному їх зв'язуванню з лікарським препаратом, що дозволяє знизити терапевтичну дозу ДРЦ при хіміотерапії і таким чином зменшити його токсичну дію на здорові органи і тканини організму.

Технічна суть і принцип дії винаходу пояснюються на прикладах виконання синтезу блок-кополімерів, характеристики їх міцел, методики одержання міцелярних композицій з ДРЦ, *in vitro* біологічних досліджень на культурах ракових клітин з посиленням на додані креслення, де:

Фіг. 1а - ^1H ЯМР спектр ДБК у D_2O при $C_{\text{ДБК}}=10 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$.

Фіг. 1б - ^1H ЯМР спектр ТБК у D_2O при $C_{\text{ТБК}}=10 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$.

Фіг. 2а - Приклад FTIR спектра тонкої плівки (1~10 мкм) зразка.

ТБК-СООН в областях $\nu\text{C}=\text{O}$, $\delta\text{N-H}$ коливань.

Фіг. 2б - Приклад FTIR спектра тонкої плівки (1~10 мкм) зразка

ТБК-СООН в областях $\nu\text{N-H}$, $\nu\text{C-H}$ і $\nu\text{O-H}$ коливань.

Фіг. 3а - Залежності величини поглинання гідроксил-іонів від рН, для ДБК-СООН, розраховані за даними титрування кополімерів та "холостого" розчину (води) 0,2 н. NaOH. $C_{\text{ДБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$, $T=25^\circ\text{C}$.

Фіг. 3б - Залежності величини поглинання гідроксил-іонів від рН, для ТБК-СООН, розраховані за даними титрування кополімерів та "холостого" розчину (води) 0,2 н. NaOH. $C_{\text{ТБК}}=1 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$, $T=25^\circ\text{C}$.

Фіг. 4а - Концентраційні залежності інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла при $\lambda=520 \text{ нм}$ і $\theta=90^\circ$ для ДБК.

Фіг. 4б - Концентраційні залежності інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла при $\lambda=520 \text{ нм}$ і $\theta=90^\circ$ для ТБК.

Фіг. 4в - Концентраційні залежності інтенсивності розсіювання вертикально поляризованого світла при $\lambda=520 \text{ нм}$ і $\theta=90^\circ$ для ТБК-СООН.

Фіг. 5а - Електронні мікрофотографії міцел ДБК з $P_{\text{нПЕО}}=113$.

Фіг. 5б - Електронні мікрофотографії міцел ТБК з $P_{\text{нПЕО}}=136$.

Фіг. 5в - Електронні мікрофотографії міцел ТБК з $P_{\text{нПЕО}}>230$.

Фіг. 6 - Структурна формула молекули доксорубіцину.

Фіг. 7 - Динаміка кількості клітин Т-лейкозу людини лінії Jurkat за присутності в культуральному середовищі міцел ТБК-СООН різної концентрації через 24 год. інкубації. Контроль (без додавання міцел) - 100 %.

Фіг. 8а - Динаміка кількості живих клітин Т-лейкемії людини залежно від концентрації ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного ДРЦ -3 через 24 год. інкубації.

Фіг. 8б - Динаміка кількості живих клітин Т-лейкемії людини залежно від концентрації ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного ДРЦ -3 через 48 год. інкубації.

Фіг. 9а - Динаміка кількості живих клітин гострого лімфолейкозу миші за присутності ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного ДРЦ -3 через 24 год. інкубації.

Фіг. 9б - Динаміка кількості живих клітин гострого лімфолейкозу миші за присутності ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного ДРЦ -3 через 48 год. інкубації.

Фіг. 10 - Динаміка кількості живих трансформованих фібробластів миші за присутності ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК -1 і ТБК-СООН -2 у порівнянні з дією вільного ДРЦ -3. Тривалість інкубації 24 год.

Приклад 1. Синтез асиметричних ДБК та ТБК за участю хімічно комплементарних метоксиполіетиленоксиду або поліетиленоксиду та поліакриламід (МОПЕО-б-ПАА та ПАА-б-ПЕО-б-ПАА) з різною довжиною блоків проводили методом радикальної матричної блок-кополімеризації ПАА з метоксиполіетиленгліколем (МОПЕГ) або поліетиленгліколем (ПЕГ), що мали середній ступень полімеризації $P_n=16-136$ і $23-909$, відповідно. Ініціатором процесу був діамонійгексанітратоцерат. Блок-кополімеризацію проводили в інертній атмосфері при $20-25^\circ\text{C}$ і постійному перемішуванні протягом 24 год. при мольних співвідношеннях $[\text{Ce}^{\text{IV}}]/[\text{МОПЕГ}]=1-1,2$ і $[\text{Ce}^{\text{IV}}]/[\text{ПЕГ}]=2-2,4$. Концентрацію мономеру - акриламід (АА) в реакційній суміші варіювали в межах $0,1-0,5$ моль·дм⁻³.

Для процесів блок-кополімеризації ПАА з МОПЕГ та ПЕГ були характерні як негативні, так і позитивні матричні ефекти (зменшення або збільшення швидкості полімеризації та конверсії мономеру у порівнянні з гомополімеризацією АА в аналогічних умовах), що було пов'язано з утворенням між ланцюгами МОПЕГ або ПЕО і зростаючими "дочірніми" ланцюгами ПАА кооперативної системи водневих зв'язків. Знак і величина матричного ефекту складним чином залежала від довжини блоків МОПЕО/ПЕО та концентрацій ініціатору і мономеру.

Одержані ДБК та ТБК гарно розчинялись у воді, проте за рахунок взаємодії блоків МОПЕО/ПЕО з ПАА їх розчини при високих концентраціях демонстрували слабку опалесценцію, що свідчило про розвиток процесів міцелоутворення.

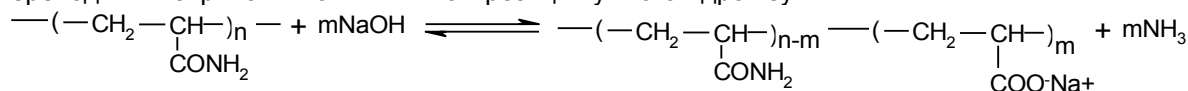
Приклад 2. Для підтвердження хімічної будови синтезованих ДБК/ТБК та визначення середнього ступеня полімеризації блоків ПАА використовували ЯМР спектроскопію. Приклади ¹H ЯМР спектрів, записаних у D₂O для одного зразка ДБК і одного зразка ТБК, показані на фіг. 1.

Фіг. 1 Спектри демонструють сигнали протонів >CH- (а) та -CH₂- груп (б) блоків ПАА з величинами хімічного зсуву $\delta=2,1-2,4$ та $1,4-1,9$ м. ч., а також сигнал протонів -CH₂- груп (в) блоків МОПЕО або ПЕО з величиною $\delta=3,70$ м. ч. Крім того, в спектрі ДБК (фіг. 1а) проявляється слабкий сигнал протонів кінцевих -OCH₃ груп з $\delta=3,38$ м. ч. Використовуючи інтегральні інтенсивності (А) відповідних сигналів, розраховували значення P_n блоків ПАА у складі ДБК та ТБК за наступними формулами:

$$P_{n\text{ПАА}(\text{АА})} = \frac{2 \cdot P_{n\text{ПАА}} \cdot A_a}{A_b} ; P_{n\text{ПАА}(\text{ОА})} = \frac{P_{n\text{ПАА}} \cdot A_a}{A_b} ,$$

де A_b та A_v - інтегральні інтенсивності сигналів б і в, відповідно. Таким чином, було встановлено асиметричний характер синтезованих ДБК і ТБК, що мали середні ступені полімеризації (P_n) окремих компонентів в межах $16-136$ і $23-909$ відповідно для МОПЕО і ПЕО блоків та $140-3520$ для блоків ПАА. Однак, у всіх випадках величина P_n для блоків МОПЕО/ПЕО була меншою, ніж для ПАА.

Приклад 3. Частину акриламідних ланок блоків ПАА в макромолекулах ДБК і ТБК переводили в акрилатні ланки шляхом реакції лужного гідролізу:



Реакцію проводили у водних розчинах ДБК/ТБК з концентрацією $5-45 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$ в присутності 5М розчину NaOH при $T=30-60^\circ\text{C}$ і постійному перемішуванні протягом 10 хв. В результаті, отримували частково гідролізовані зразки ДБК-СООН/ТБК-СООН у Na-формі, які переводили в Н-форму шляхом підкислення розчинів добавками HCl до $\text{pH} \sim 2$. Наявність карбоксильних груп у складі модифікованих зразків кополімерів підтверджували методом FTIR спектроскопії. Зразок FTIR спектра для одного зі зразків ТБК-СООН показано на фіг. 2.

Фіг. 2 В спектрі частково гідролізованих кополімерів крім традиційних смуг коливань $\nu_{\text{C=O}}$ (амід I), $\delta_{\text{N-H}}$ (амід II) (фіг. (а), а також смуг $\nu_{\text{N-H}}(\text{CONH}_2)$ (фіг. 2б), які притаманні вихідним зразкам ДБК/ТБК і характеризують зв'язані різними видами водневих зв'язків амідні групи блоків ПАА, з'являються нові смуги $\nu_{\text{C=O}}(\text{COOH})$ та $\nu_{\text{O-H}}(\text{COOH})$ при $\sim 1722 \text{ см}^{-1}$ та $\sim 2550 \text{ см}^{-1}$, відповідно. Ці смуги відображують коливання Н-зв'язаних карбоксильних груп, що утворюються на ланцюгах ПАА макромолекул ДБК і ТБК в результаті часткового гідролізу акриламідних ланок.

Ступінь гідролізу акриламідних ланок в зразках ДБК-СООН та ТБК-СООН характеризували методом потенціометричного титрування у варіанті розрахунку кривих поглинання гідроксил-іонів, який застосовують для слабких поліелектролітів (фіг. 3).

Фіг. 3 Ступінь гідролізу (А) акриламідних ланок розраховували за формулою:

$$A = \frac{\sigma_{\text{lim}} \cdot 10^{-3}}{n_{\text{ПАА}}} \cdot 100\%,$$

де σ_{lim} - гранична величина поглинання гідроксил-іонів за кривими поглинання як на фіг. 3 при $\text{pH} \sim 8$ ($\text{мг} \cdot \text{екв} \cdot \text{г}^{-1}$), $n_{\text{ПАА}}$ - кількість ланок ПАА у вихідному зразку ДБК/ТБК (осн-моль $\cdot \text{г}^{-1}$).

Таким чином, були отримані зразки ДБК-СООН/ТБК-СООН зі ступенем гідролізу акриламідних ланок $A=10-17\%$.

Приклад 4. Стабільність міцел ДБК/ТБК та ДБК-СООН/ТБК-СООН у водному середовищі оцінювали шляхом визначення критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) та стандартної вільної енергії Гіббса ($-\Delta G^\circ$). Приклади знаходження величини ККМ методом пружного світлорозсіювання наведені на фіг. 4.

Фіг. 4 Інтенсивність розсіювання вертикально поляризованого світла вимірювали за допомогою модернізованого приладу ФПС-3 (Росія), що містив світлодіод WP7113VGC/A ($\lambda=520 \text{ нм}$) від "Kingbright", контролер ADC-CPU™ фірми "Insoftus" (Україна) і програму "WINRECORDER". Вимірювання проводили при куті розсіювання $\theta=90^\circ$. Вільну енергію Гіббса розраховували за значенням ККМ, використовуючи формулу: $\Delta G^\circ \approx RT \cdot \ln \text{ККМ}$.

Для всіх зразків кополімерів були знайдені малі величини ККМ $= (0,049-1,3) \cdot 10^{-6} \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$ і великі значення енергії Гіббса ($-\Delta G^\circ = 33,0-41,2 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$), що свідчило про високу стабільність міцел ДБК/ТБК та ДБК-СООН/ТБК-СООН у воді і, завдяки тому, про перспективність їх використання для інкапсуляції і транспортування в середовищі живого організму погано розчинних лікарських субстанцій. Було встановлено зменшення ККМ і збільшення енергії Гіббса, тобто збільшення стабільності міцел при зростанні довжини блоків ПЕО і ПАА. Було показано також, що значення ККМ та $-\Delta G^\circ$ для зразків ДБК-СООН/ТБК-СООН, які містили частково гідролізовані (в межах 10-47 %) акриламідні ланки, практично не відрізнялися від аналогічних параметрів для відповідних немодифікованих зразків ДБК/ТБК (приклад на фіг. 4б, в).

Приклад 5. Морфологічні особливості і розмір міцел ДБК/ТБК та ДБК-СООН/ТБК-СООН, які визначали методом проникної електронної мікроскопії, показані на фіг. 5.

Фіг. 5 В цих дослідженнях використовували електронний мікроскоп JEM-1230 фірми "JEOL" (Японія) при напрузі 90 кВ. Зразки міцел готували таким чином: брали малі краплини ($1 \cdot 10^{-4} \text{ см}^3$) міцелярних розчинів кополімерів з $C=0,2-0,3 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$, наносили на мідні сіточки, вкриті плівкою формвару та вуглецю, потім висушували при кімнатній температурі протягом $\sim 0,5-1$ хв. на повітрі і ще 1 добу у вакуум-ексикаторі.

На одержаних електронних мікрофотографіях (фіг. 5) проявлялись не тільки відносно великі міцели полімолекулярного типу, але й міцели мономолекулярного типу (малі темні точки на мікрофотографіях), які були фактично індивідуальними ІнтраПК.

У випадку використання ДБК/ТБК та ДБК-СООН/ТБК-СООН з $R_{\text{ПЕО}} < 230$ полімолекулярні міцели мали переважно сферичну морфологію (фіг. 5а, б), однак, при використанні зразків кополімерів з $R_{\text{ПЕО}} > 230$, на мікрофотографіях спостерігались також полімолекулярні міцели незвичайної кубічної (або пластинчастої) морфології (фіг. 5в).

Для інкапсуляції протипухлинного препарату доксорубіцину використовували розчини ДБК/ТБК і ДБК-СООН/ТБК-СООН, що містили моно- та полімолекулярні міцели сферичної форми з розмірами 4-45 та 28-250 нм, відповідно.

Приклад 8. Випробування in vitro цитотоксичної дії ДРЦ, інкапсульованого в міцели ДБК/ТБК та ДБК-СООН/ТБК-СООН, проводили на клітинах лінії L1210 гострого лейкозу миші,

трансформованих фібробластів (лінія L929) миші та лейкозних Т-лімфоцитів (лінія Jurkat) людини. Клітини ліній L1210 і L929 культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), а клітини лінії Jurkat - у середовищі RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), за присутності 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Інкубацію клітин

проводили при температурі 37 °C у 96-лункових планшетах ("Falcon", США), у CO₂-інкубаторі ("JENCONS NUAIRE", Англія) в атмосфері 5 % CO₂ і 95 % повітря.

В експериментах порівнювали дію вільного ДРЦ, міцелярного носія з інкапсульованим ДРЦ і вільного носія. Напівлетальною (LD₅₀) дозою доксорубіцину для досліджуваних клітин вважали концентрацію 1 мкг·см⁻³. Ефективність дії досліджуваних речовин визначали за кількістю живих клітин у порівнянні з контролем, тобто клітинами, які інкубували без додавання протипухлинного препарату. Підрахунок кількості клітин здійснювали через 24 та 48 год. після початку інкубації у гемоцитометричній камері Горяєва. Для підрахунку кількості відмерлих клітин проводили фарбування трипановим синім.

Було встановлено, що модифіковані кополімери ТБК-СООН, діючи у високій концентрації 50 мкг·см⁻³ протягом 24 год., незначно зменшували кількість живих клітин Т-лейкозу людини (приклад на фіг. 7). За дози 100 мкг·см⁻³ кількість клітин Т-лейкозу людини знижувалася більш ніж на 20 %.

Фіг. 7 Деякі інші результати випробувань представлені на фіг. 8-10. Вони, зокрема, демонструють, що через 24 год. інкубації цитотоксична дія ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК-СООН, по відношенню до клітин Т-лейкозу людини збільшується при зростанні його концентрації від 0,1 до 1 мкг·см⁻³ і є більшою за дію вільного ДРЦ та препарату, інкапсульованого в міцели немодифікованого ТБК (відповідно, у 1,64 і 1,73 разу при концентрації ДРЦ 0,1 мкг·см⁻³ та у 1,31 і 1,44 разу при концентрації ДРЦ 0,5 мкг·см⁻³) (фіг. 8а). Разом з тим, при концентрації вільного ДРЦ 1 мкг·см⁻³ він проявляв більшу активність, ніж препарат, що був інкапсульований у міцели ТБК і ТБК-СООН. Результати, отримані через 48 год. інкубації (фіг. 8б), ще більше переконують в тому, що міцелярні системи ДРЦ/ТБК і ДРЦ/ТБК-СООН є ефективнішими (у 2,8-4,2 разу), ніж вільний ДРЦ за всіх досліджених концентрацій.

Фіг. 8 Аналогічну картину спостерігали за дії вільного та інкапсульованого ДРЦ на клітини лінії L1210 гострого лейкозу миші (фіг. 9). В цих експериментах найбільш активно виявилась міцелярна система ДРЦ/ТБК-СООН. Через 24 год. інкубації ефективність дії ДРЦ в даних міцелярних носіях була вищою за ефективність дії вільного препарату у 1,70, 1,79 та 1,83 разу, відповідно, при концентраціях 0,01, 0,1 та 1 мкг·см⁻³ (фіг. 9а).

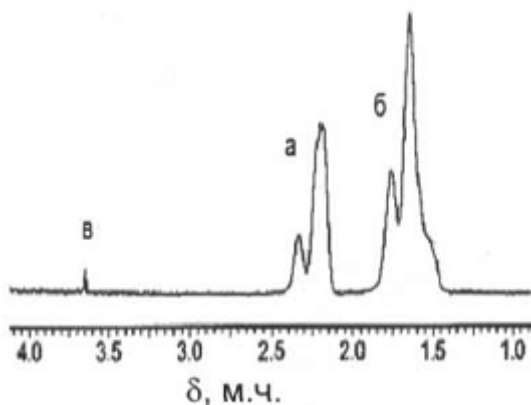
Аналогічні порівняльні розрахунки за даними, одержаними через 48 год. інкубації (фіг. 9б), показують більш високу ефективність дії інкапсульованого препарату у 1,93, 3,40 і 4,50 разу при вказаних вище концентраціях, відповідно. Характерно, що присутність обох міцелярних систем в культуральному середовищі з доданим ДРЦ у концентрації 1 мкг·см⁻³ через 48 год. викликала майже повну загибель злоякісних клітин (на відміну від дії вільного ДРЦ).

Фіг. 9 Вивчення динаміки кількості живих трансформованих фібробластів L929 миші за присутності в культуральному середовищі ДРЦ, інкапсульованого в міцели ТБК і ТБК-СООН, також свідчить про те, що даний протипухлинний препарат у міцелярних носіях діє більш ефективно, ніж вільна форма цього препарату (фіг. 10). В цих тестах більшу активність щодо знищення пухлинних клітин проявила, як і раніше, міцелярна система ДРЦ/ТБК-СООН. Ефективність її дії перевищила дію вільного ДРЦ у 1,23, 1,44 і 2,37 разу при концентраціях протипухлинного препарату 0,1, 0,5 і 1 мкг·см⁻³, відповідно.

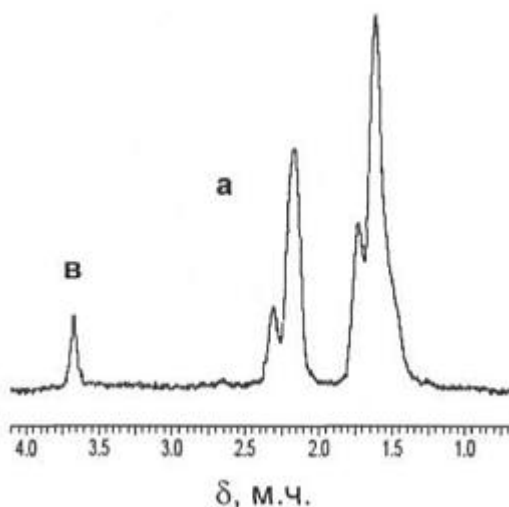
Фіг. 10 Таким чином, використання композицій протипухлинного препарату доксорубіцину у складі міцел подвійних гідрофільних блок-кополімерів і, особливо, їх частково гідролізованих похідних посилює цитотоксичну дію препарату і дозволяє у перспективі зменшити загальну токсичність його дії при застосуванні хіміотерапії завдяки суттєвому зниженню терапевтичної дози препарату, що підтверджує передбачений технічний результат.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

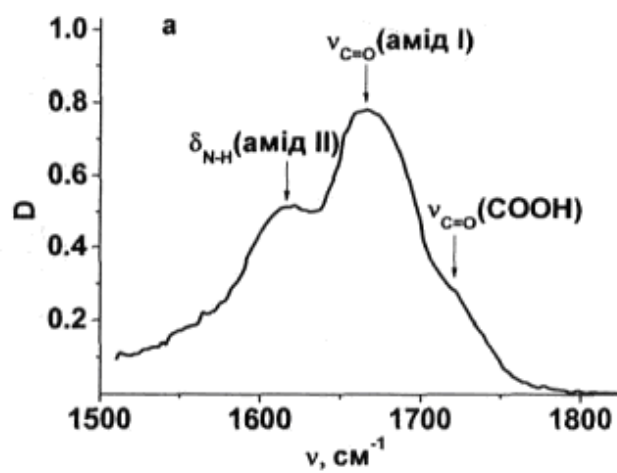
1. Міцелярна композиція для доставки протиракового препарату, що як міцелярні носії
- 5 протиракового препарату містить частково гідролізовані подвійні гідрофільні диблок- або триблок-кополімери (ДБК-СООН або ТБК-СООН) поліакриламідів та метоксиполіетиленоксиду або поліетиленоксиду (МОПЕО-*b*-ПАА або ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА) з хімічно комплементарними
- 10 блоками різної довжини, які утворюють інтрамолекулярні полікомплекси та міцелярні структури моно- і полімолекулярного типів з розміром 4-45 та 28-250 нм, а як протираковий препарат містить гідрохлорид доксорубіцину, причому співвідношення між гідрохлоридом доксорубіцину і
- міцелярним носієм складає 0,01:0,05 моль-осн-моль⁻¹.
2. Міцелярна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що містить гідролізовані диблок- або триблок-кополімери МОПЕО-*b*-ПАА або ПАА-*b*-ПЕО-*b*-ПАА зі ступенем гідролізу 10-17 %.
3. Міцелярна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що концентрація міцелярних структур
- 15 моно- і полімолекулярного типів в процесі інкапсуляції складає 0,1-0,5 кг/м³.
4. Міцелярна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що концентрація гідрохлориду доксорубіцину в процесі інкапсуляції складає 0,05-0,2 кг/м³.
5. Міцелярна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що середній ступінь полімеризації для блоків МОПЕО і ПЕО складає 16-136 і 23-909 відповідно, а для блоків ПАА - 140-3520, причому
- 20 у всіх випадках ця величина для блоків МОПЕО і ПЕО є меншою, ніж для блоків ПАА.



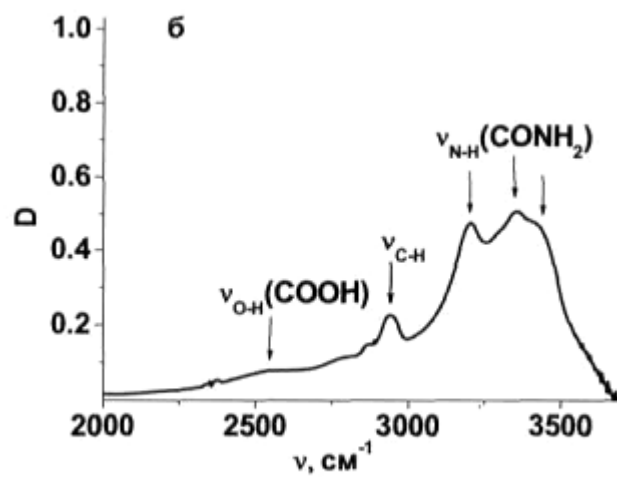
Фиг. 1а



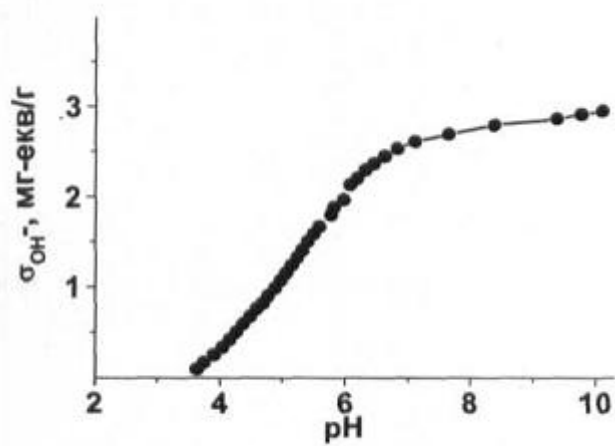
Фиг. 1б



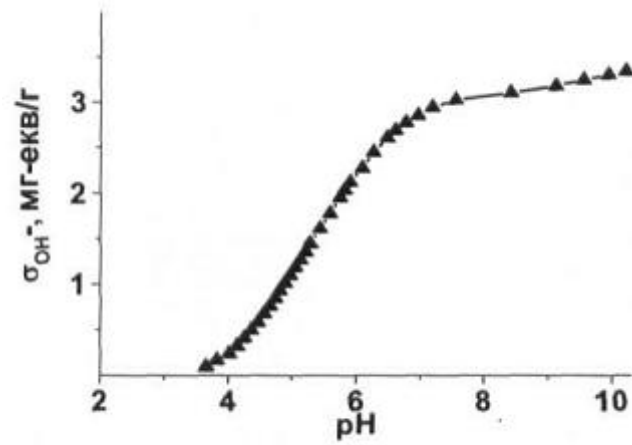
Фиг. 2а



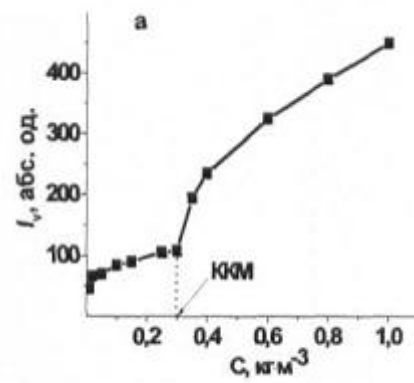
Фиг. 2б



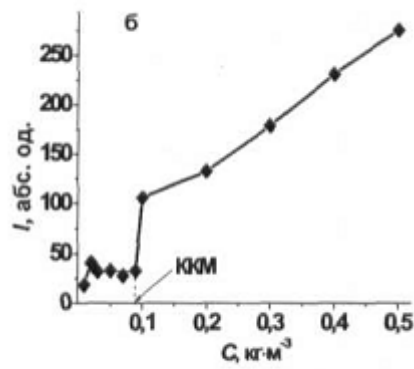
Фиг. 3а



Фиг. 3б



Фиг. 4а



Фиг. 4б

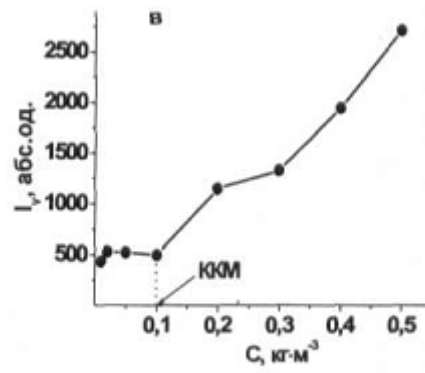


Fig. 4B

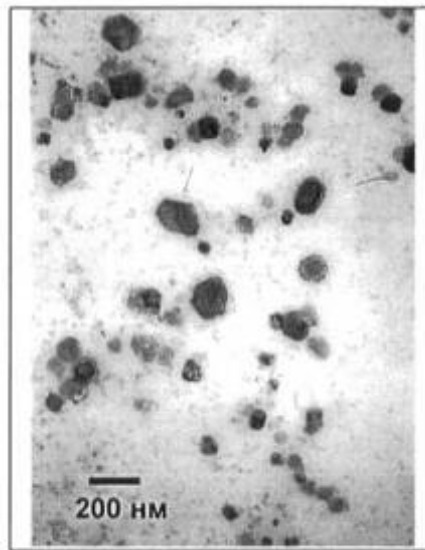


Fig. 5a

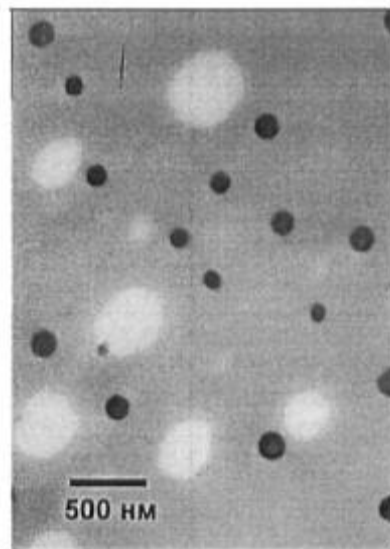


Fig. 5b

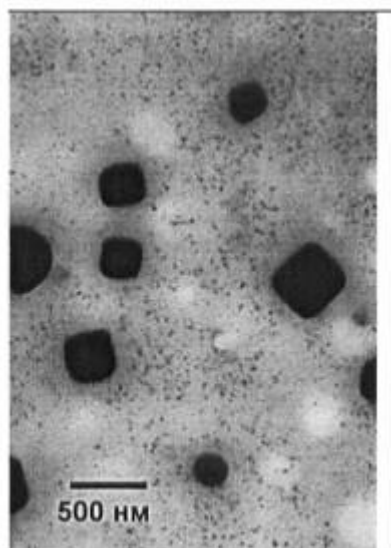


Fig. 5в

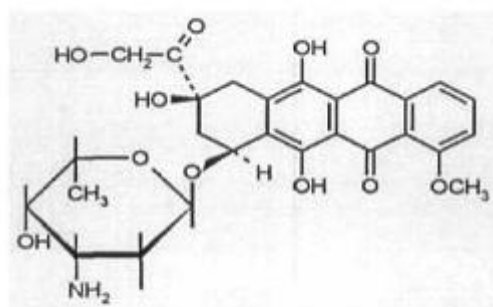


Fig. 6

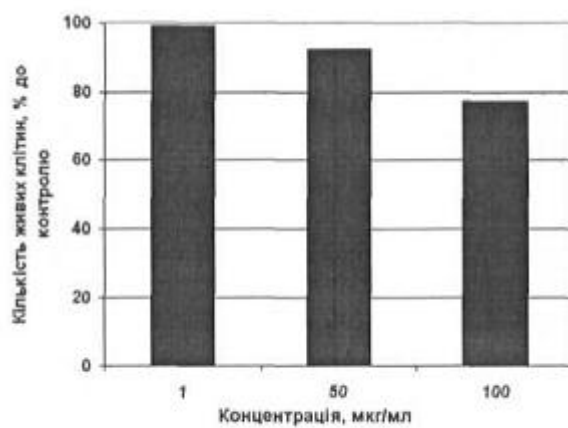


Fig. 7

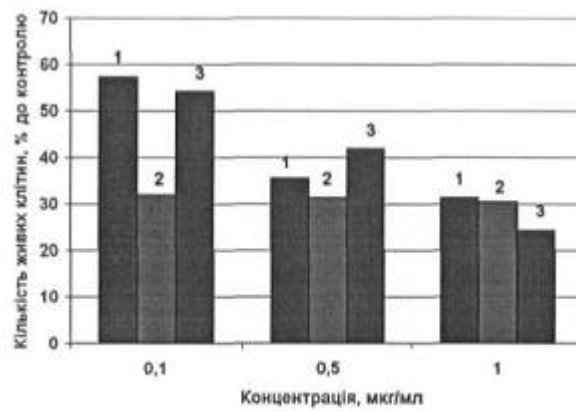


Fig. 8a

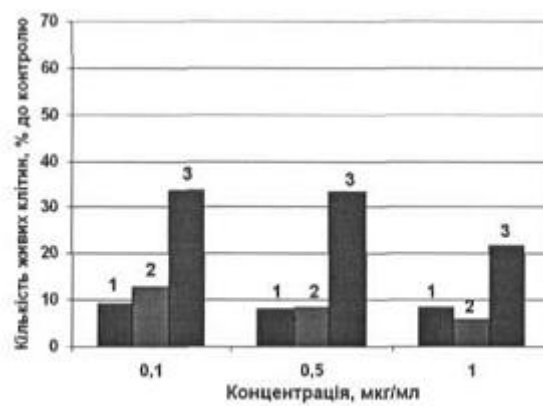


Fig. 8b

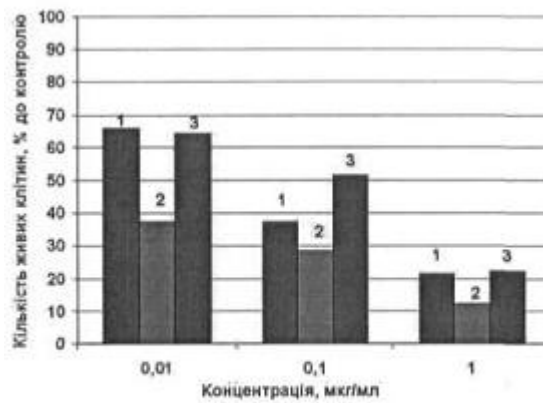


Fig. 9a

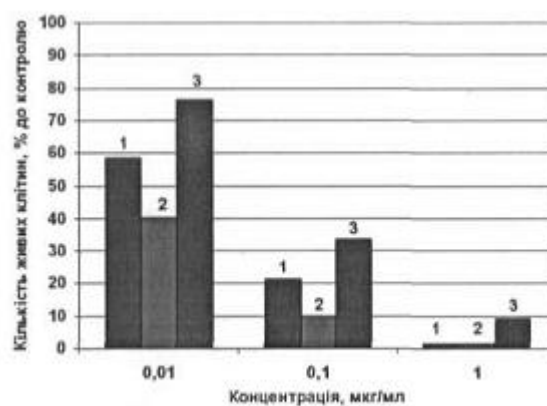


Fig. 9б

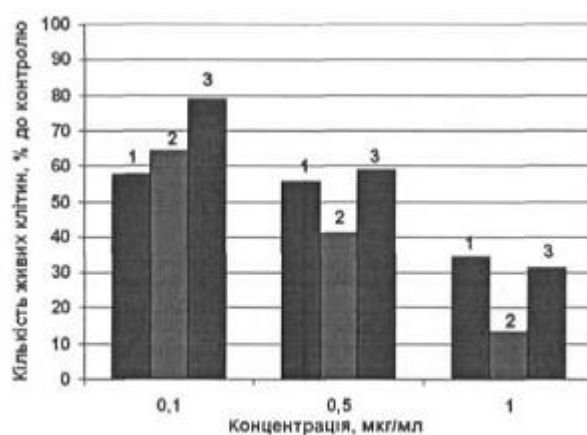


Fig. 10

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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