



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115251** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

A61P 35/00

A61K 33/24 (2006.01)**A61K 47/28** (2006.01)**A61K 49/18** (2006.01)

B82Y 5/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2015 05603**
(22) Дата подання заявки: **08.06.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.10.2017**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.01.2016, Бюл.№ 1**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2017, Бюл.№ 19**

- (72) Винахідник(и):
**Гольцев Анатолій Миколайович (UA),
Бондарович Микола Олександрович (UA),
Бабенко Наталія Миколаївна (UA),
Гасвська Юлія Олександрівна (UA),
Дубрава Тетяна Георгіївна (UA),
Челомбійсько Ольга Василівна (UA),
Останков Максим Вадимович (UA),
Останкова Людмила Василівна (UA),
Клочков Володимир Кирилович (UA),
Малюкін Юрій Вікторович (UA),
Кавок Наталія Сергіївна (UA)**
(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA),
ІНСТИТУТ СЦИНТИЛЯЦІЙНИХ
МАТЕРІАЛІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ,
пр. Науки, 60, м. Харків, 61072 (UA)**

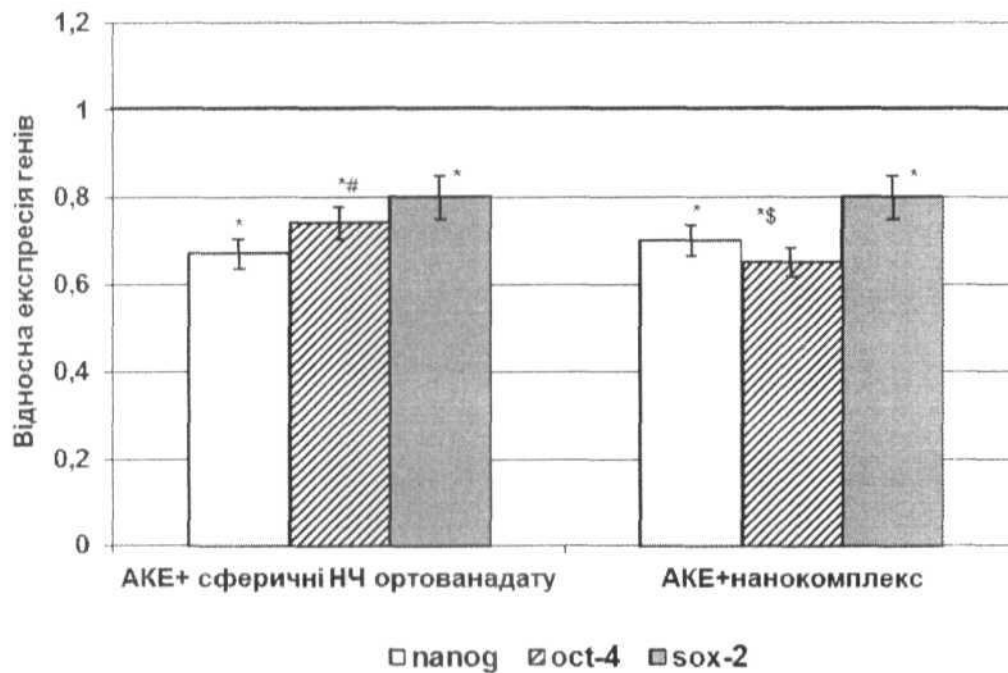
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Клочков В.К. Эффект специфического взаимодействия нанокристаллов GdYVO₄ : Eu³⁺ с ядрами клеток / В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малюкин, В.П. Семиноженко // Доп. НАН України. - 2010. - № 10. - С. 81-86
Klochkov V. Size and shape influence of luminescent orthovanadate nanoparticles on their accumulation in nuclear compartments of rat hepatocytes / Vladimir Klochkov, Nataliya Kavok, Ganna Grygorova, Olga Sedyh, Yuri Malyukin // Materials Science and Engineering C. - 2013. - Vol. - P. 2708-2712
UA 106337 C2, 11.08.2014
UA a201405121, 10.11.2014
UA 87508 U, 10.02.2014
UA 108011 C2, 10.03.2015
WO 2014186366 A1, 20.11.2014
WO 2009073193 A2, 11.06.2009
Клочков В.К. Водные коллоидные растворы нанолюминофоров nReVO₄:Eu³⁺ (Re-Y, Gd, La) / В.К. Клочков // Наноструктурное материаловедение. - 2009. - №2. - С. 3-8
Klochkov V.K. Characteristics of nLnVO₄:Eu³⁺ (Ln = La, Gd, Y, Sm) sols with nanoparticles of different shape and sizes / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh // Journal of Applied Spectroscopy. - 2012. - Vol. 79. - N.5. - P. 726-730
Klochkov V.K. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh, Y.V. Malyukin // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. - 2012. - Vol. 409. - P. 176-182
Kavok N.S. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements / N.S. Kavok, K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, [et al] // European Physical Journal E. - 2014. - Vol. 37: 127. - P. 1-8
Huang H.-T. Diode-pumped passively Q-switched Nd:Gd_{0.5}Y_{0.5}VO₄ laser at 1.34 μ m with V₃:YAG as the saturable absorber / Huang H.-T., ZFiang B.-T., He J.-L. et al // Optics Express. - 2009. - Vol. 17. - N. 9. - P. 6946-6951
Tkacheva T.N. Dynamics of dye release from nanocarriers of different types in model cell membranes and living cells // Tkacheva T.N., Yefimova S.L., Klochkov V.K., Sorokin A.V., Malyukin Yu.V // Biopolymers and Cell. - 2014. - Vol. 30. - N.4. - P. 314-320

(54) СПОСІБ ІНГІБІЦІЇ РОСТУ СТОVBУРОВИХ РАКОВИХ КЛІТИН

UA 115251 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до експериментальної медицини і може бути використаний для розробки нових методів дослідження цитостатичних властивостей протипухлинних препаратів, що містять метали, для діагностики та лікування онкозахворювань. Спосіб інгібіції росту стовбурових ракових клітин включає введення в організм гібридного комплексу, що містить 1,3 г/л сферичних наночастинок ортованадату гадолінію-ітрію, активованого європієм, та 0,55 г/л холестерину. Використання зазначеного гібридного комплексу забезпечує підвищення індексу інгібіції пухлини до $74,70 \pm 4,38$ %.



Винахід належить до експериментальної медицини і може бути використаний для розробки нових методів дослідження цитостатичних властивостей протипухлинних препаратів, що містять метали, для діагностики та лікування онкозахворювань.

Ідентифікація та інгібіція стовбурових ракових клітин (СРК), які є індукторами пухлинного процесу, є однією з надзадач сучасної онкології. Саме така концепція лежить в основі напрямку, який одержав назву "тераностика", який заснований на поєднанні діагностики і таргетного лікування хворих, заснованого на результатах цієї діагностики. На теперішній час актуальною проблемою є розробка способів, які б дозволили одночасно і виявляти СРК, і інгібувати їх ріст, що надасть можливість оперативно діагностувати і лікувати пухлину, а також скоротити витрати на діагностику та лікарські препарати.

Відомі способи інгібіції росту ракових клітин із використанням препаратів похідних платини (Pt) (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин). Ці препарати здатні ушкоджувати ДНК, формуючи Pt-ДНК аддукти, які блокують реплікацію, транскрипцію і, як результат, клітинну проліферацію [1].

Однак при використанні цих препаратів виникає токсичний ефект (нефротоксичність, ототоксичність, нейротоксичність) і лікарська резистентність [2]. До того ж ці препарати не дозволяють ідентифікувати СРК.

Відомий спосіб ідентифікації ракових клітин з використанням наночастинок (НЧ) дендримеру поліамідоміну, кон'югованого з моноклональними антитілами к карциноембріональному антигену [3]. Але цей наноконструкт не дозволяє ідентифікувати СРК і не виявляє здатності гальмувати ріст пухлини.

Відомий спосіб інгібіції росту ракових клітин з використанням веретеноподібних НЧ ортованадату гадолінію, активованого європієм ($GdVO_4:Eu^{3+}$). Ці препарати здатні зв'язуватися з пухлинними клітинами і блокувати клітинну проліферацію [4], але у зв'язку з низькою проникаючою здатністю в СРК, веретеноподібні НЧ не можуть бути використані для ідентифікації цих клітин.

Найбільш близьким до заявленого за своєю суттю є спосіб ідентифікації і інгібіції СРК за допомогою сферичних НЧ ортованадату гадолінію-ітрію, активованого європієм ($GdYVO_4:Eu^{3+}$) [5]. Цей спосіб забезпечує ефективну ідентифікацію СРК, однак є недостатньо ефективним щодо інгібіції росту СРК. При його використанні вміст СРК знижується лише в 2 рази, що відображується на індексі інгібіції росту пухлини, який становить лише $58,24 \pm 3,45$ %.

В основу винаходу поставлена задача удосконалити відомий спосіб ідентифікації та інгібіції росту СРК шляхом використання більш ефективного засобу, що дозволить підвищити ступінь інгібіції росту СРК при збереженні можливості їх ідентифікації.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі ідентифікації і інгібіції росту СРК, що передбачає використання сферичних НЧ ортованадату гадолінію-ітрію, активованого європієм (далі сферичні НЧ ортованадату), відповідно до винаходу, використовують гібридний комплекс цих НЧ з холестериним (далі гібридний наноконструкт).

Гібридний наноконструкт синтезували згідно з методом, описаним в документі [6], а одержання сферичних НЧ ортованадату гадолінію-ітрію, активованого європієм, здійснювали методом, відомим з документа [7].

Гібридний наноконструкт має високу проникаючу здатність завдяки наявності у ньому холестерину, який має високу спорідненість до мембран пухлинних клітин [8]. Це дозволяє здійснювати "адресну" доставку засобу саме до клітин пухлини без впливу на немалігнізовані клітини, одержати більш високий, ніж у прототипі, ефект інгібіції СРК, і, як результат, підвищити індекс інгібіції росту пухлини до $74,70 \pm 4,38$ %. При цьому здатність сферичних НЧ ортованадату ідентифікувати СРК не знижується.

Ефективність заявленого способу досліджували на 8-місячних самках мишей лінії BALB/c масою 16-18 г, яких утримували в умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Як первинні культури використовували стабілізовані після кріоконсервування клітини аденокарциноми Ерліха (АКЕ). Стабілізацію клітин проводили за морфо-функціональними показниками шляхом 3-кратної перевивки *in vivo*.

Миші були розділені на 3 групи. Тваринам групи 1 внутрішньочеревно в перитоніальну порожнину (ПП) в дозі 3×10^6 клітин/мишу вводили клітини АКЕ, які попередньо інкубували 3 години в ізотонічному розчині 5 %-ної глюкози без додавання сферичних НЧ ортованадату (контроль). Тваринам групи 2 внутрішньочеревно в ПП вводили клітини АКЕ, попередньо інкубовані зі сферичними НЧ ортованадату, в дозі 3×10^6 клітин/мишу, об'ємом 0,3 мл (прототип). Інкубацію клітин АКЕ зі сферичними НЧ ортованадату (1,3 г/л) проводили в ізотонічному 5 %-ному розчині глюкози протягом 3 годин при кімнатній температурі. В групі 3 тваринам внутрішньочеревно в ПП вводили клітини АКЕ, попередньо інкубовані в ізотонічному 5 %-ному

розчині глюкози з гібридним наноконкомплексом (сферичні НЧ ортованадату - 1,3 г/л, холестерин - 0,55 г/л). Клітини вводили в дозі 3×10^6 клітин/мишу об'ємом 0,3 мл.

Із загальної популяції клітин АКЕ виділяли фракцію CD44⁺ за допомогою магнітного сортера (BDTM [magnet]) з використанням первинних немічених моноклональних антитіл до CD44 і вторинних Mouse Ig1 Magnetic Particles-DM ('BD Pharmingen', США) відповідно до протоколу виробника.

Ідентифікацію інкубованих клітин проводили на люмінесцентному мікроскопі Olympus IX 71 із джерелом збудження - ксеноновою лампою 75 W. Для збудження люмінесценції в мікроскопі був використаний фільтр, що пропускає випромінювання з довжиною хвилі 460-490 нм. Спостереження проводили при збільшенні X1000 в умовах масляної імерсії.

Після 3-годинної інкубації клітин АКЕ із сферичними НЧ ортованадату відзначалася чітка локалізація НЧ в $6,00 \pm 0,81$ % трансформованих клітин, в той час як при інкубації збагаченої СРК фракції CD44⁺ клітин, виділеної методом магнітного сортування, був виявлений високий відсоток клітин, що світилися ($49,57 \pm 3,56$ %). Додавання до сферичних НЧ ортованадату холестерину статистично не впливала на їх візуалізуючу здатність $5,6 \pm 0,73$ % в загальній популяції та $47,34 \pm 4,56$ % в фракції CD44⁺.

Оцінку показників у дослідних та контрольних тварин проводили після виведення тварин з експериментів на 7 добу після ініціації АКЕ. Індекс інгібіції росту АКЕ обчислювали за формулою [9]:

$$\frac{V(k) - V(o)}{V(k)} \times 100\%, \text{ де}$$

$V(k)$ - абсолютна кількість клітин АКЕ в ПП контрольної групи,

$V(o)$ - абсолютна кількість клітин АКЕ в ПП дослідної групи

Оцінку вмісту СРК в ПП здійснювали методом прямої мембранної імунофлуоресценції на проточному цитофлуориметрі (FACS Calibur (BD, США)) з використанням антимишачих ФІТЦ-мічених моноклональних антитіл (BD, США) до CD44, CD117.

Облік даних, отриманих цитофлуориметричним аналізом, здійснювали за допомогою програми WinMDi 2.8.

При атестації клітинного складу гетерогенного пулу АКЕ були оцінені такі субпопуляції клітин: CD44^{hi}, які є найбільш імовірними претендентами на роль СРК, та CD117⁺ акцесорно-регуляторні клітини пухлини.

Результати фенотипічних і функціональних характеристик клітин АКЕ контрольних та дослідних груп наведені в Таблиці. З Таблиці видно, що при всіх видах обробки АКЕ відбувалися виражені зміни процесу формування *in vivo* (у ПП) як загального пулу клітин, так і CD44^{hi}-, CD117⁺-субпопуляцій. Обробка клітин АКЕ гібридним наноконкомплексом приводила до зниження концентрації найбільш канцерогенних CD44^{hi}- і підвищення вмісту CD117⁺-клітин, що обумовлювало зменшення абсолютної кількості клітин АКЕ в ПП і, відповідно, інгібіцію росту пухлини у порівнянні з прототипом.

Аналіз експресії генів *nanog*, *oct-4*, *sox-2* у клітинах АКЕ проводили методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Характер експресії в клітинах пухлини генів плюрипотентності *nanog*, *oct-4*, *sox-2*, які характеризують виразність прогресії пухлинного росту до і після впливу гібридного наноконкомплексу представлена на графіку. За "I" прийняті значення відносної експресії генів у клітинах АКЕ, нормовані по *house-keeping* гену (18s rRNA); * - результати мають статистично значимі розходження в порівнянні з контролем; \$ - результати мають статистично значимі розходження між групами, яким вводили сферичні НЧ ортованадату, # - яким вводили гібридний комплекс, ($p < 0,05$). Після предобробки клітин АКЕ сферичними НЧ-ми ортованадату та гібридним наноконкомплексом у ПП сформувалися пухлини, у клітинах яких експресія вивчених генів була вірогідно знижена в порівнянні з контролем (графік). На графіку показано, що відносна експресія гена *nanog*, що є ключовим у визначенні самопідтримки СРК, найбільшою мірою (в 1,6 рази) знижувалася при використанні гібридного наноконкомплексу, що супроводжувалося максимальною інгібіцією росту пухлини. У найменшому ступені знижувався рівень експресії гена *sox-2* (на 20 %), причому рівною мірою у всіх варіантах обробки. Експресія гена *oct-4* мала деяку залежність від виду сполук і була максимально інгібована після інкубації клітин АКЕ з гібридним наноконкомплексом.

Зниження рівня експресії досліджуваних генів при всіх видах обробки АКЕ корелювало зі зниженням вмісту CD44^{hi}-клітин.

Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить про те, що зміна кількості СРК та експресії генів плюрипотентності чітко корелює з індексом інгібіції пухлини, що визначає

зляючись властивості пухлини. Максимально виражене зниження вмісту СРК і ступеня експресії генів плюрипотентності при використанні гібридною наноконструкції забезпечувало підвищення індексу інгібіції в порівнянні з такими у мишей, лікованих сферичними НЧ ортованадату. При цьому гібридний наноконструкція не втрачає здатності до ідентифікації СРК.

5

Таблиця

Фенотипічні і функціональні характеристики клітин АКЕ контрольної та дослідних груп ($M \pm m$, $n=5$).

Групи	Концентрація клітин, %		Кількість клітин у ПП $\times 10^7$	Індекс інгібіції росту АКЕ, %
	CD44 ^{hi}	CD117 ⁺		
1. Контроль АКЕ per se	0,17 \pm 0,03	2,65 \pm 0,23	34,8 \pm 1,27	-
2. АКЕ+ НЧ ортованадату	0,09 \pm 0,01 [#]	5,04 \pm 0,32	14,53 \pm 0,72 [#]	58,24 \pm 3,45 [#]
3. АКЕ + гібридний наноконструкція	0,02 \pm 0,001 ^{*\$}	10,47 \pm 0,83 ^{*\$}	8,80 \pm 0,25 ^{*\$}	74,70 \pm 4,38 ^{\$}

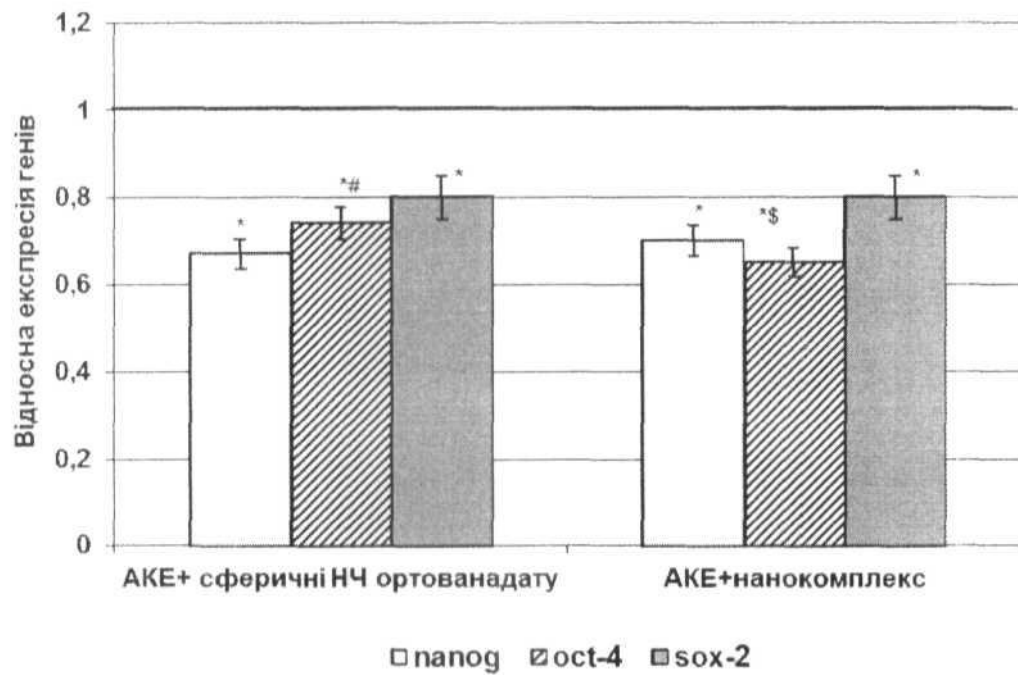
Примітка: * - результати мають статистично значимі розходження в порівнянні з контролем; результати мають статистично значимі розходження між групами: \$ - яким вводили сферичні НЧ ортованадату, # - яким вводили гібридний наноконструкція, ($p < 0,05$).

Джерела інформації:

1. Beretta G.L., Righetti S.C., Lombardi L., Zunino F., Perego P. Electron microscopy analysis of early localization of cisplatin in ovarian carcinoma cells //Ultrastruct. Pathol. - 2002. - Vol. 26, № 5. - P. 331-334.
2. Гоженко А.И., Москаленко А.М., Стебловский В.В., Жуков В.А. О нефротоксичности цисплатина у онкобольных //Актуальные проблемы транспортной медицины. - 2010. - Т. 19, № 1. - С. 81-86.
3. Tiernan J.P., Ingram N., Marston G., Perry S.L., Rushworth J.V., Coletta P.L., Millner P.A., Jayne D.G., Hughes T.A. CEA-targeted nanoparticles allow specific in vivo fluorescent imaging of colorectal cancer models //Nanomedicine (Lond). 2015 Feb 19:1-9. [Epub ahead of print]
4. Пат. України 106337, А61К 33/00, А61К 33/24, А61Р 35/00. Спосіб інгібування росту пухлини/ публ.: 11.08.2014.
5. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Гаевская Ю.А., Бондарович Н.А., Останков М.В., Челомбитко О.В., Дубрава Т.Г., Клочков В.К., Кавок Н.С., Малюкин Ю.В. Способность наночастиц на основе ортованадатов к идентификации in vitro и инактивации in vivo стволовых раковых клеток //Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. - 2013. - Т. 11, № 4. - С. 729-739.
6. Пат. України 108011, А61К 9/10, 47/02, С07J 9/00. Спосіб отримання водної дисперсії холестерину / публ.: 10.03.2015.
7. Клочков В.К. Водные коллоидные растворы нанолюминофоров nReVO₄:Eu³⁺ (Re-Y, Gd, La) / В.К. Клочков // Наноструктурное материаловедение. - 2009. - № 2. - С. 3-8.
8. Radwan A.A., Alanazi F.K. Targeting cancer using cholesterol conjugates //Saudi Pharmaceutical Journal. - 2014. - Vol. 22. - P. 3-16.
9. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Л.: Медицина, 1978. - С. 98-99.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Спосіб інгібіції росту стовбурових ракових клітин, який включає введення в організм сферичних наночастинок ортованадату гадолінію-ітрію, активованого європієм, який **відрізняється** тим, що вводять гібридний комплекс зазначених наночастинок з холестерином, який містить 1,3 г/л наночастинок і 0,55 г/л холестерину.



Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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