



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69587** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 45/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 09836	(72) Винахідник(и): Красносельський Микола Віленович (UA), Дикий Микола Петрович (UA), Довбня Анатолій Миколайович (UA), Медведева Олена Павлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.08.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.05.2012	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2012, Бюл.№ 9	(74) Представник: Євтушенко Тамара Григорівна, реєстр. №0

(54) СПОСІБ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ВПЛИВУ НА АДЕНОКАРЦИНОМУ ЕРЛІХА

(57) Реферат:

Спосіб терапевтичного впливу на злоякісні утворення включає крапельну інфузію цисплатину. Інфузують радіоактивний цисплатин.

UA 69587 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до онкології та експериментальної медицини, і може бути використаною для терапевтичного впливу на аденокарциному Ерліха.

Відомо, що ефективність лікування злоякісних утворень залежить в основному від токсичних, фармакологічних і протипухлинних властивостей препарату. Високі вимоги фахівці
5 пред'являють до вибірковості дії препарату, його токсичності та можливості синергізму дії такого препарату з променевою терапією.

Останнього часу з'явився новий клас препаратів на основі неорганічних з'єднань металів, тоді як переважна більшість протипухлинних препаратів за хімічною структурою є органічними речовинами. Першим неорганічним ефективним протипухлинним препаратом є цисплатин. За
10 фізико-хімічними властивостями цисплатин є нейтральним комплексом платини, що полегшує його транспорт через клітинні мембрани. Хімічна рухливість груп, що заміщаються, досить висока, а це створює гарні умови для зв'язків з нуклеофільними центрами важливих біохімічних субстратів в організмі. Немаловажна також наявність у структурі препарату як амінного ліганду дуже активної молекули аміаку.

15 Цисплатин - високотоксичне з'єднання, найбільш грізною і лімітуючою для цисплатину є нефротоксичність. Хіміотерапевтичний індекс препарату низький. Біологічний ефект комплексів платини залежить від дози, що також можна віднести до недоліків препарату. Існує вікова залежність у переносимості препарату.

Позитивною особливістю цисплатину, на відміну від інших цитостатиків, є те, що у здорових
20 тварин в терапевтичних дозах він не викликає істотних змін кровотворення. Коливні помірні зміни клітинного складу кісткового мозку, що виникають після застосування препарату, швидко загасають і відновлюються до вихідних показників морфологічної картини і клітинності. Нерідко виникає навіть понадкомпенсація. Помірна анемія, що відзначається після застосування цисплатину не зв'язана з прямою токсичною дією на циркулюючі еритроцити, а, як припускають,
25 обумовлена мієлосупресивною і аутоімунною дією препарату. Відмінною рисою цисплатину є те, що поряд зі зниженням загальної імунологічної реактивності він приводить до підвищення імунногенності самих пухлинних клітин (як антигену) і таким чином робить їх краще розпізнаваними і більш уразливими. Анафілактогенні властивості препарату виражені слабо.

Антибластична і цитотоксична дія цисплатину доведена на багатьох експериментальних
30 моделях: мікроорганізмах і вірусах, рослинних і тваринних клітинах, а також перевивних пухлинах і лейкозах. Численні дані свідчать про те, що препарат має дуже широкий спектр високої протипухлинної і протилейкозної активності у тварин із солідними й асцитними пухлинами, а також при лейкозах різного генеза і морфологічної будови - перевивних, вірусних, індукованих.

35 Дані по фармакокінетиці дозволили удосконалити режим введення цисплатину. Виявилося, що після інфузії протягом 20 годин, на відміну від інфузії протягом 1 години, препарат більш довгостроково затримується в організмі і менше активного незв'язаного препарату виводиться із сечею. За 2 дні після годинної інфузії виводиться 26,6-50 % ліків, а після 20-годинної - 21,4-25,9 %. Здатність затримувати цисплатин в організмі і зменшувати його виведення із сечею
40 виявив манітол - з манітолом за добу екскретується 16 %, а без нього - 40 %. На підставі цих даних рекомендовано в клініці використовувати метод тривалої інфузії, при якому знижується виведення препарату і підвищується його накопичення в тканинах, у тому числі в пухлині [Green M., McClure B., Smith J., Waite B., Zalcberg J. A novel combination of cisplatin, irinotecan and capecitabine in patients with advanced cancer // Invest. New Drugs.-2004. - V. 22 (2). - P. 185-192;
45 Kern W., Braess J., Koschovsky M., Samel S., Becker H. et al Application of cisplatin as intraoperative hyperthermic peritoneal lavage (IHPL) in patients with locally advanced gastric cancer: analysis of pharmacokinetics and of nephrotoxicity // Anticancer Res.-2002. - Vol. 24. - P. 19-38.].

Даний спосіб терапевтичного впливу на злоякісні утворення є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його
50 вибрано за прототип.

В основу корисної моделі покладено задачу розширення арсеналу способів терапевтичного впливу на аденокарциному Ерліха.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі терапевтичного впливу на злоякісні утворення, який включає крапельну інфузію цисплатину,
55 згідно з корисною моделлю, інфузують радіоактивний цисплатин. Радіоактивний цисплатин інфузують одноразово. На одиницю ваги радіоактивний цисплатин інфузують в дозі у 10^7 разів менше вихідного.

Технічний ефект корисної моделі обумовлений тим, що введення радіоактивного цисплатину запускає процес вільнорадикального перекисного окиснення на рівні мембран
60 клітин і органел клітин. Інтенсивність вільнорадикального перекисного окиснення лімфоцитів

при дії на них радіоактивного цисплатину в 1,5 раз вище, ніж при дії вихідного. Аналіз дозової залежності дії вихідного і радіоактивного цисплатину на життєздатність клітин аденокарциноми Ерліха виявив перевагу клітин в стані апоптозу і некрозу в пухлинних клітинах з радіоактивним цисплатином. Число загиблених клітин при використанні радіоактивного цисплатину складає 70 %, вихідного - 32 %. Морфологічні особливості некрозу і апоптозу виявляються в різний термін інкубації клітин. Все вищезгадане й обумовлює підвищення ефективності терапевтичного впливу на аденокарциному Ерліха.

Спосіб виконують наступним чином: Для одержання протипухлинного ефекту терапевтичного впливу на аденокарциному Ерліха радіоактивний цисплатин вводять одноразово. На одиницю ваги радіоактивний цисплатин інфузують в дозі у 10^7 разів менше вихідного. При необхідності призначають променеву терапію.

Ефективність способу доказана експериментально.

Проведено експерименти з дослідження впливу вихідного й радіоактивного цисплатину на суспензію клітин аденокарциноми Ерліха. Концентрація клітин становила $1,8 \cdot 10^6$ клітин/мл. Життєздатність клітин склала 98 %. Оцінка життєздатності клітин аденокарциноми Ерліха після забарвлювання трипановим синім виконана за допомогою світлової мікроскопії в динаміці через 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 і 48 годин. Підрахунок клітин проводився в камері Горяєва під мікроскопом МББ-1 ($\times 900$).

Доза вихідного цисплатину, яку вводили, склала 7,5 мкг/мл, радіоактивного цисплатину - 0,017 і 0,17 пкг/мл. У кожную пробу вводили 0,03 мл пеніциліну, що відповідало 180 од. і 0,03 мл стрептоциду, що відповідало 300 мкг. Проби були залишені в термостаті при температурі 37 °C для інкубації.

Обміряно розмір пухлинних клітин на поляризаційному мікроскопі ($\times 200$) до введення цитостатиків. Розмір клітин склав 0,015 мм. Після 12 годин інкубації з вихідним цисплатином розмір клітин склав 0,010-0,015 мм, з радіоактивним цисплатином - 0,005-0,007 мм.

Життєздатність клітин Ерліха після дії вихідного цисплатину падає з 78 % після однієї години до 25 % після 6 годин інкубації. При дії радіоактивного цисплатину в дозі 0,017 пікограм відзначається подібна залежність. Життєздатність пухлинних клітин після однієї години впливу радіоактивного цисплатину становить 54 %, а через 6 годин - 3 %. Слід зазначити, що за короткий строк після введення радіоактивного цисплатину в дозі 0,17 пікограм реєструється вірогідно необоротне пригнічення життєздатності пухлинних клітин. У динаміці досліджень проявляється втрата здатності клітин до необмеженого розмноження навіть при тимчасовому збереженні морфологічної цілісності. В початковий період інкубації (2-6 години) число життєздатних клітин з радіоактивним цисплатином менше, ніж з вихідним цисплатином. Надалі виявляється достовірна різниця в зменшенні числа життєздатних клітин при дії на них радіоактивного цисплатину щодо вихідного.

При дії вихідного й радіоактивного цисплатину в різних дозах в динаміці експерименту відзначені різні морфологічні зміни. Розмір клітин Ерліха після дії вихідного цисплатину був більше, ніж розмір клітин після дії радіоактивного цисплатину. Число загиблених клітин при дії радіоактивного цисплатину, незалежно від дози, що вводиться (0,017 і 0,17 пікограм), було більшим, ніж при дії вихідного цисплатину. Поява апоптозних клітин після дії радіоактивного цисплатину спостерігалася через 6-8 годин інкубації, у той час як при дії вихідного цисплатину - через 12-16 годин. Кількість загиблених клітин, а також кількість апоптозних клітин виявляється більш високою при дії радіоактивного цисплатину.

Підсилена антибластична дія та висока вибірковість впливу радіоактивного цисплатину доказана також і на тваринах. Проведено серію експериментів по вивченню впливу вихідного й радіоактивного цисплатину на ріст солідної форми пухлини мишей. Дослідження проведені на мишах (самцях), вагою 18 г. Як пухлинна модель використана суспензія 8 добових асцитних клітин аденокарциноми Ерліха. Життєздатність пухлинних клітин визначали методом суправітельного забарвлювання трипановим синім шляхом підрахунку клітин у камері Горяєва. Життєздатність склала 98 %. Концентрація клітин склала $1,7 \cdot 10^8$ клітин/мл. Суспензію клітин у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин/мл інокулювали в область правого стегна миші. Дослідження росту солідної форми аденокарциноми Ерліха у мишей проведено на тлі цитостатичної терапії вихідним і радіоактивним цисплатином. Для цього тварини були розподілені за 3-а групами: 1 група - тварини пухлиноносії (10 шт.); 2 група - тварини пухлиноносії, яким вводився вихідний цисплатин (15 шт.); 3 група - тварини пухлиноносії, яким вводився радіоактивний цисплатин (15 шт.).

Починаючи з 11 дня після перевивки пухлини, тваринам 2-ї групи через день усередину очеревини вводили вихідний цисплатин у дозі 1,8 мкг/г ваги тварин. Усього було проведено 5

ін'єкцій. Тваринам 1-ї групи за тією ж схемою вводили 0,5 мл води для ін'єкцій. Тваринам 3-ї групи був введений радіоактивний цисплатин 1 раз у дозі 0,017 пікограм на 18 г.

- 5 Для оцінки впливу препаратів, що вводяться, на ріст пухлини, обчислювали відсоток гальмування її росту (D %), що обчислювався за формулою: $D=100 \times (V_0 - V_1) / V_0$, де V_0 - об'єм пухлини контрольних тварин, V_1 - об'єм пухлини тварин, що одержували вихідний і радіоактивний цисплатин (табл. 1).

Таблиця 1

Патофізіологічні показники в мишей з перевитою солідною формою аденокарциноми Ерліха на тлі терапії вихідним і радіоактивним цисплатином

Групи тварин	Ваги пухлини (мг)	Кількість особин з метастазами	Відсоток гальмування росту пухлини, %
Тварини пухлиноносії	303±0,37	3	0
Тварини пухлиноносії, яким був введений вихідний цисплатин	284±0,42	Немає	35
Тварини пухлиноносії, яким був введений радіоактивний цисплатин	256±0,16	Немає	65

Відсоток гальмування при цьому в групі 2 склав 35 %, а в групі 3-65 %.

- 10 На 21 добу росту пухлини проведена декапітація тварин. Пухлини вилущували й зважували. В 3-х особин 1 групи були відзначені ознаки метастазування. У тварин 2 і 3 груп метастазування не виявлено.

На 21 добу після перевивки пухлини проведені виміри фізіологічних показників (маса тварини (г), селезінки (мг), тимуса (мг), пухлини (табл. 2).

15

Таблиця 2

Вплив вихідного й радіоактивного цисплатину на фізіологічні показники мишей з перевитою солідною формою аденокарциноми Ерліха

Групи тварин	Вага тварин (г)	Маса селезінки (мг)	Маса тимуса (мг)
Тварини пухлиноносії	20,3±0,6	174,7±9,5	82,1±6,2
Тварини пухлиноносії, яким був введений вихідний цисплатин	16,2±0,8	165,0±9,2	74,8±8,6
Тварини пухлиноносії, яким був введений радіоактивний цисплатин	16,9±0,3	145,6±8,8	62,7±5,1

Аналіз показників крові експериментальних тварин на фоні терапії вихідним і радіоактивним цисплатином представлений в табл. 3-5.

Таблиця 3

Загальна кількість еритроцитів, лейкоцитів і лейкоцитарна формула периферичної крові мишей з перевитою солідною формою аденокарциноми Ерліха після закінчення терапевтичної дії цисплатину

Групи тварин	Загальна кількість еритроцитів $10^6/\text{мл}$	Загальна кількість лейкоцитів, $10^3/\text{мл}$	Нейтрофіли паличко-ядерні, %	Нейтрофіли сегментно-ядерні, %	Лімфоцити, %	Моноцити, %
Тварини пухлиноносії	$5450 \cdot 10^3 \pm 119 \cdot 10^3$	13000 ± 218	$14,0 \pm 2,0$	$11,0 \pm 1,0$	$60,0 \pm 3,0$	$6,0 \pm 0,3$
Тварини пухлиноносії, яким був введений вихідний цисплатин	$4225 \cdot 10^3 \pm 181 \cdot 10^3$	12300 ± 70	$9,3 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,7$	$69,0 \pm 2,5$	$5,7 \pm 0,2$
Тварини пухлиноносії, яким був введений радіоактивний цисплатин	$4098 \cdot 10^3 \pm 155 \cdot 10^3$	11735 ± 68	$9,0 \pm 1,0$	$4,8 \pm 0,5$	$72,5 \pm 1,5$	$4,1 \pm 0,2$

Таблиця 4

Показники протромбіну плазми крові тварин пухлиноносіїв на тлі терапії вихідним і радіоактивним цисплатином після закінчення терапевтичної дії цисплатину

Досліджувані групи	Концентрація протромбіну (мг/100 мл)
Тварини пухлиноносії	$50,2 \pm 1,3$
Тварини пухлиноносії, яким був уведений вихідний цисплатин	$71,5 \pm 2,7$
Тварини пухлиноносії, яким був уведений радіоактивний цисплатин	$85,3 \pm 4,0$

Таблиця 5

Показники згортання крові у тварин пухлиноносіїв на фоні терапії вихідним і радіоактивним цисплатином після закінчення терапевтичної дії цисплатину

Досліджувані групи	Швидкість згортання крові, сек.
Тварини пухлиноносії	60
Тварини пухлиноносії, яким був уведений вихідний цисплатин	73
Тварини пухлиноносії, яким був уведений радіоактивний цисплатин	80

5

Визначено поглинені дози радіоактивного цисплатину різними органами тварин. Радіоактивний цисплатин у дозі 13 кБк вводився тваринам внутрішньоочеревинно. Після введення радіоактивного, синтезованого цисплатину всі тварини були живі. Обміряно дозу поглинання (mGy/MBq) від ^{195}Pt в різних органах (нирки, печінка, селезінка, кишечник, сім'яники, стінка сечового міхура, шкіра). Досліджувані органи від 10 тварин були зважені й поміщені в алюмінієвий контейнер, що розміщався на Ge(Li)-детекторі для реєстрації поглиненої дози. Отримані результати показали, що найбільш висока доза поглинання ^{195m}Pt цисплатину реєструється в печінці - $0,72 \pm 0,23$; нирках - $0,40 \pm 0,07$; сім'яниках - $0,55 \pm 0,15$; селезінці - $0,35 \pm 0,05$; стінці сечового міхура - $0,25 \pm 0,02$; шкірі - $0,21 \pm 0,04$.

10

15

Таким чином, в границях експерименту було досліджено вплив вихідного й радіоактивного цисплатину з високою питомою активністю ($\sim 1 \text{ Ки/мг}$) на суспензію клітин аденокарциноми Ерліха. Зміна морфології клітин залежала від дози вводимого вихідного й радіоактивного

цисплатину. Явища некрозу й апоптоза, які ведуть до загибелі клітин, виявлялись при дії радіоактивного цисплатину в дозі 0,017 пікограм/мл, що в 10^7 разів менше дози вихідного цисплатину. При порівнянні величин апоптозного й мітотичного індексів виявлено високий апоптозний індекс при дії радіоактивного цисплатину на пухлинні клітини. Після введення високоактивного синтезованого цисплатину зберігалася 100 % виживаність експериментальних тварин. Відсоток гальмування росту солідної форми пухлини Ерліха при введенні вихідного й радіоактивного цисплатину склав 35 і 65 %, відповідно. Виявлена більш виражена життєва активність у тварин у динаміці росту пухлини при терапії радіоактивним цисплатином. Ці результати корелюють із даними гематологічного аналізу. Визначено дозу поглинання (mGy/MBq) від ^{195m}Pt різними органами (нирки, печінка, селезінка, кишечник, сім'яники, стінка сечового міхура, шкіра). Був доказаний внесок високореакційних форм кисню (синглетного й аніон радикала гідроксилу) у динаміці росту пухлини у тварин на фоні терапії вихідним і радіоактивним цисплатином. Визначено інтервали між введенням вихідного й радіоактивного цисплатину за допомогою реєстрації рівня падіння високореакційних форм кисню. Було встановлено, що для одержання протипухлинного ефекту радіоактивний цисплатин може бути введений одноразово.

20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб терапевтичного впливу на злоякісні утворення, який включає крапельну інфузію цисплатину, який **відрізняється** тим, що інфузують радіоактивний цисплатин.
- 25 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що радіоактивний цисплатин інфузують одноразово.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на одиницю ваги радіоактивний цисплатин інфузують в дозі в 10 разів менше вихідного.

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