



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98076** (13) **C2**
(51) МПК (2012.01)
A61K 33/44 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 04882	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	19.04.2011	UA 29540 C2, 15.11.2000
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.04.2012	Фуллерены как основа создания оригинальных противоопухолевых соединений/ Буренин И.С., Полянская Н.И., Кузьмина З.В.// Микроэлементы в мед.. – 2005. – Т.6. – N 1. – С. 20-21
(41) Публікація відомостей про заяву:	12.09.2011, Бюл.№ 17	G.V. Andrievsky, I.S. Burenin. ON MEDICINAL AND PREVENTIVE EFFICACY OF SMALL DOSES OF HYDRATED C60 FULLERENES AT CANCER PATHOLOGIES. Chemistry Preprint Archive, Volume 2002, Issue 6, June 2002, p. 50-65
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2012, Бюл.№ 7	G.V. Andrievsky, A.V. Zhmuro, L. V. Zabobonina. FIRST CLINICAL CASE OF TREATMENT OF PATIENT (VOLONTEER) WITH RECTAL ADENOCARCINOMA BY HYDRATED FULLERENES: NATURAL COURSE OF THE DISEASE OR NON-SPECIFIC ANTICANCER ACTIVITY. The Electrochemical Society Interface (197-th Meeting, May 14-18, 2000, Toronto, Ontario, Canada), Spring 2000, Abs# 700
(72) Винахідник(и): Прилуцька Світлана Володимирівна (UA), Бурлака Анатолій Павлович (UA), Прилуцький Юрій Іванович (UA)		P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann, I. M. Dmytruk, M. M. Bilyi, O. A. Golub, A. V. Khavryuchenko, E. V. Buzaneva, V. L. Aksenov, M. V. Avdeev, Yu. I. Prylutsky, S. S. Durov. Structure of C60 fullerene in water: spectroscopic data. Carbon, 2004, 42, 1203-1206
(73) Власник(и): КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, вул. Володимирська, 64, МСП, м. Київ, 01061 (UA)		Антиоксиданты нового поколения на основе молекулярно-коллоидных растворов фуллеренов в воде /Андриевский Г. В., Росляков А. Д., Клочков В. К., Буренин И. С., Валуева И. М., Полянская Н. И., Борисова Л. М.// 6 Международная конференция "Биоантиоксидант", Москва, 16-19 апр., 2002: Тезисы докладов. М. 2002, С. 36-37

(54) ЗАСТОСУВАННЯ НЕМОДИФІКОВАНИХ ФУЛЕРЕНІВ C₆₀ ЯК ПРОТИПУХЛИННИХ АГЕНТІВ У ТЕРАПІЇ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ**(57) Реферат:**

Застосування немодифікованих фулеренів C₆₀ як високоефективних протипухлинних агентів, що здатні проявляти як протекторну, так і інгібуючу дії у терапії злоякісних новоутворень.

UA 98076 C2

Винахід, що заявляється, належить до галузі експериментальної онкології і стосується застосування немодифікованих фулеренів C_{60} у терапії злоякісних новоутворень.

Відомо, що біологічно активні водорозчинні немодифіковані фулерени C_{60} є нетоксичними сполуками [1-2], проявляють мембранотропні [3] та антиоксидантні властивості [4-5] і, таким чином, слугують основою для створення нового класу перспективних лікарських препаратів протипухлинної дії. Так, модельні дослідження [6] виявили значну антиангіогенну дію похідних фулеренів C_{60} , а саме блокування ними утворення нових мікросудин у пухлині, що перешкоджало її подальшому росту і прогресії. Автори роботи [7] показали, що наночастинки металофулеренів C_{60} здатні проникати крізь плазматичну мембрану пухлинних клітин, ефективно пригнічувати їхню проліферацію та знижувати активність тих ферментів, які відповідають за продукцію активних форм кисню.

Але при цьому недоліками вказаних аналогів [6-7] при подальшому використанні фулеренових наноструктур у клінічній онкології є складність проведення хімічної модифікації фулеренів C_{60} для їх розчинення у воді і, як наслідок, зростання їх токсичності відносно нормальних клітин, а також відсутність оцінки протипухлинної активності в експериментах *in vivo*.

В основу винаходу поставлена задача створити спосіб застосування фулеренів C_{60} в експериментальній онкології, які б ефективно перешкоджали/уповільнювали ріст злоякісних пухлин в системі *in vivo*.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі застосування фулеренів C_{60} у терапії злоякісних новоутворень використовують немодифіковані (чисті) фулерени C_{60} , які є водорозчинними і не цитотоксичними, і, які, згідно з винаходом, за підібраних низьких терапевтичних доз та технології введення в живий організм, здатні проявляти високу протипухлинну активність.

Використання немодифікованих фулеренів C_{60} як нових протипухлинних агентів, з одного боку, активує роботу імунної системи організму, що перешкоджає росту злоякісних пухлин (захисний ефект), а з іншого боку, викликає антиангіогенну дію, цілеспрямовано уповільнюючи ріст пухлин (пригнічуючий ефект).

Суть винаходу пояснюється таким прикладом.

Приклад.

Водні розчини немодифікованих фулеренів C_{60} (чистота 99,5 %) були отримані за методикою, яка базується на переведенні молекул C_{60} з толуолу у воду внаслідок обробки ультразвуком [8]. Виявилось, що цей темно-коричневий розчин є типовою колоїдною системою, яка містить як поодинокі молекули C_{60} , так і сферичні кластери діаметром до 3 нм у гідратованому стані [9]. Встановлено [8], що найбільш енергетично вигідною структурою у такому водному кластері є клатрат $C_{60}(H_2O)_{60}$. Важливо зазначити, що дана технологія отримання водних розчинів фулеренів C_{60} відрізняється від способу [10], де фулерени C_{60} здебільшого знаходяться в агрегатних станах розміром до 32 нм.

Вихідна концентрація фулеренів C_{60} у водному розчині складала 1.0 мг/мл.

Зображення субмоношарів плівок фулеренів C_{60} , нанесених з водного розчину на поверхню Au(111), отримані за допомогою скануючої тунельної мікроскопії, приведені на Фіг. 1. Вони виявили розподіл фулеренових кластерів розміром до ~2,8 нм (перший стабільний сферично-подібний кластер, що складається із 13 гідратованих фулеренів C_{60} [9]) уздовж кристалографічного напрямку <112> (Фіг. 1, а). Незважаючи на високу рухливість молекул C_{60} на поверхні Au(111) за кімнатної температури, вдалося зафіксувати зображення поодиноких фулеренів C_{60} (діаметр ~0,7 нм) (Фіг. 1, б).

Миші чоловічої статі лінії C57B1/6J вагою 20-21 г утримувалися у віварії на стандартному харчовому раціоні. Середня температура у віварії дорівнювала 19 ± 1 °C.

Досліди з тваринами проводили з дотриманням етичних норм, затверджених Європейською комісією з утримання тварин.

Середнє значення об'єму пухлини розраховували за такою формулою: $V = \frac{\pi \cdot a \cdot b \cdot c}{6}$, де a, b і c - максимальні розміри пухлини у взаємноперпендикулярних напрямках. Пригнічення росту пухлини (індекс інгібування) оцінювали за такою формулою: $k_1 = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \cdot 100\%$, де V_0 і V_1 - середні значення об'ємів пухлини в групі 0 (контроль) та піддослідній групі 1, наприклад.

Водні розчини немодифікованих фулеренів C_{60} концентрацією 1,0 мг/мл в об'ємі 0,1 мл вводили внутрішньочеревно мишам чоловічої статі лінії C57B1/6J вагою 20-21 г (доза 5 мг/кг) з перещепленим внутрішньом'язово в кінцівку штамом карциноми Льюїса (рак легень) (група 1; пригнічуючий ефект). Введення фулеренів C_{60} починали через день після перещеплення

пухлини, яка візуально з'являлася на 10-й день після початку перещеплення. Фулерени C_{60} вводили одноразово протягом 5-ти днів з інтервалом через день з урахуванням того факту, що введені внутрішньочеревно щурам фулерени C_{60} (доза 500 мг/кг) виводяться з організму протягом 2-4 днів [4]. Також водні розчини немодифікованих фулеренів C_{60} в об'ємі 0,1 мл вводили внутрішньочеревно мишам одноразово протягом 5-ти днів з інтервалом через день до перещеплення пухлини (група 2; захисний ефект). Нарешті, групу 0 (без введення фулеренів C_{60} , але з перещепленою пухлиною) використовували як контроль. Початкова кількість тварин у кожній піддослідній групі в Експерименті 1 складала 5, а в Експерименті 2-7.

Результати Експерименту 1 представлені в Табл. 1. Протипухлинний ефект фулеренів C_{60} почали реєструвати на 15-й день (05.11.2010) після перещеплення пухлини (22.10) для групи 1 (пригнічуючий ефект) та групі 2 (захисний ефект; це 25-й день після початку введення фулеренів C_{60} (12.10)). Пригнічення росту пухлини в групі 1 зростало від 30,0 % (15-й день), досягало максимуму 37,2 % (18-й день), а потім зменшувалося до 16,0 % (25-й день після перещеплення пухлини). Пригнічення росту пухлини в групі 2 демонструє тенденцію до зменшення від 17,0 % (15-й день) до величини 3,1 % (25-й день після перещеплення пухлини). Остання тварина у контрольній групі 0 загинула на 32-й день (22.11) від початку експерименту. Виживаність тварин у групі 1 складала 40,0 %, а в групі 2 - 20,0 % порівняно з контролем. Нарешті, тривалість життя останньої піддослідної тварини у групі 1 (пригнічуючий ефект) та групі 2 (захисний ефект) (38 днів) перевищила цей параметр для останньої тварини з контрольної групи 0 (31 день) в 1,23 рази.

Результати Експерименту 2 представлені в Табл. 2. Протипухлинний ефект фулеренів C_{60} почали реєструвати на 13-й день (01.03.2011) після перещеплення пухлини (17.02) для групи 1 (пригнічуючий ефект) та 2 (захисний ефект; це 23-й день після початку введення фулеренів C_{60} (07.02)). Пригнічення росту пухлини в групі 1 досягало максимуму 25,1 % на 16-й день після перещеплення пухлини, а потім зменшувалося до 5,0 % (27-й день). Пригнічення росту пухлини в групі 2 демонструє тенденцію до зростання (на відміну від результатів Експерименту 1) від 15,0 % (13-й день) до максимальної величини 35,0 % (27-й день після перещеплення пухлини). Остання тварина у контрольній групі 0 загинула на 30-й день (18.03) від початку експерименту. Виживаність тварин у групі 1 складала 85,7 %, а в групі 2 - 28,6 % порівняно з контролем. Нарешті, тривалість життя останньої піддослідної тварини у групі 2 (53 дні) (захисний ефект) та групі 1 (36 днів) (пригнічуючий ефект) перевищила цей параметр для останньої тварини з контрольної групи 0 (29 днів) в 1,83 та 1,24 (добре узгодження з даними Експерименту 1 для групи 1) рази, відповідно.

На Фіг. 2 з метою візуального порівняння пухлинного росту представлені тварини піддослідної групи 0 (контроль; Фіг. 2, а) і групи 2 (захисний ефект; Фіг. 2, б) в Експерименті 2 (15.03., 27-й день після перещеплення пухлини). Розрахунки показують, що середній об'єм пухлини у контролі перевищує цей параметр у піддослідній групі 2 (захисний ефект) в ~1,3 рази.

На Фіг. 3 з метою візуального порівняння пухлинного росту представлені тварини піддослідної групи 1 (пригнічуючий ефект; Фіг. 3, а) і групи 2 (захисний ефект; Фіг. 3, б) в Експерименті 2 (22.03., 34-й день після перещеплення пухлини). Розрахунки показують, що середній об'єм пухлини у піддослідній групі 1 (пригнічуючий ефект) перевищує цей параметр у піддослідній групі 2 (захисний ефект) в ~2 рази.

Важливо також зазначити, що візуальні спостереження за піддослідними тваринами показали, що тварини групи 2 (захисний ефект) у порівнянні з тваринами контрольної групи 0 і групи 1 (пригнічуючий ефект) проявляли більш високу рухливість, колір їхньої шерсті мав більш яскраво-виражений відтінок. Нарешті, тривалість життя останньої піддослідної тварини у групі 2 (захисний ефект) перевищила цей параметр для останньої тварини з групи 1 (пригнічуючий ефект) та контролю в ~1,5 та ~1,8 рази, відповідно.

Отже, водорозчинні нетоксичні немодифіковані фулерени C_{60} за низької загальної терапевтичної дози 25 мг/кг, з одного боку, викликають протипухлинну імунну відповідь, що супроводжується вірогідним гальмуванням об'єму пухлини карциноми легені Льюїса у мишей чоловічої статі лінії C57B1/6J (максимальний терапевтичний ефект досягав 35,0 % за індексом інгібування; максимальна виживаність тварин складала 28,6 % порівняно з контролем; максимальна тривалість життя останньої піддослідної тварини в 1,83 рази перевищила цей параметр для тварини з контрольної групи; Експеримент 2), а з іншого боку, цілеспрямовано пригнічують ріст цієї пухлини (максимальний терапевтичний ефект досягав 25,1 % за індексом інгібування; максимальна виживаність тварин складала 85,7 % порівняно з контролем; максимальна тривалість життя останньої піддослідної тварини в 1,24 рази перевищила цей параметр для тварини з контрольної групи; Експеримент 2) внаслідок блокування ними утворення нових мікросудин у пухлині.

Таблиця 1

Експеримент 1: введення фулеренів C_{60} до перещеплення пухлини - 12.10; 14.10; 16.10; 18.10 і 20.10.2010 (група 2). Початок перещеплення пухлини - 22.10.2010. Введення фулеренів C_{60} після перещеплення пухлини - 24.10; 26.10; 28.10; 30.10 і 01.11.2010 (група 1). Початкова кількість тварин у кожній піддослідній групі складала 5. У дужках вказаний процент виживаності тварин

Дата	Група 0 (контроль)	Група 1 (введення C_{60} після перещеплення)	Пригнічення росту пухлини, k_1 ; (%)	Група 2 (введення C_{60} до перещеплення)	Пригнічення росту пухлини, k_2 (%)
05.11	n=5	n=5	30.0	n=5	17.0
08.11	n=5	n=5	37.2	n=5	4.0
10.11	n=5	n=5	19.4	n=4	13.0
12.11	n=4	n=5	13.6	n=3	11.3
15.11	n=3	n=4	16.0	n=3	3.1
17.11	n=2	n=2		n=2	
22.11	n=0	n=2 (40.0 %)		n=1 (20.0 %)	
25.11		n=1		n=1	
29.11		n=0		n=0	

Таблиця 2

Експеримент 2: введення фулеренів C_{60} до перещеплення пухлини - 07.02; 09.02; 11.02; 13.02 і 15.02.2011 (група 2). Початок перещеплення пухлини - 17.02.2011. Введення фулеренів C_{60} після перещеплення пухлини - 19.02; 21.02; 23.02; 25.02 і 27.02.2011 (група 1). Початкова кількість тварин у кожній піддослідній групі складала 7. У дужках вказаний процент виживаності тварин

Дата	Група 0 (контроль)	Група 1 (введення C_{60} після перещеплення)	Пригнічення росту пухлини, k_1 ; (%)	Група 2 (введення C_{60} до перещеплення)	Пригнічення росту пухлини, k_2 (%)
01.03	n=7	n=7	4.0	n=7	15.0
04.03	n=7	n=7	25.1	n=7	27.2
09.03	n=7	n=7	5.4	n=7	25.0
11.03	n=4	n=7	17.0	n=7	23.3
15.03	n=2	n=6	5.0	n=6	35.0
17.03	n=2	n=6		n=3	
18.03	n=0	n=6 (85.7 %)		n=2 (28,6 %)	
21.03		n=4		n=2	
22.03		n=2		n=2	
25.03		n=0		n=2	
11.04				n=0	

Джерела інформації:

- 5 1. S. V. Prylutska, O. P. Matyshevskaya, A. A. Golub, Yu. I. Prylutskiy, G. P. Potebnya, U. Ritter, P. Scharff. Study of C_{60} fullerenes and C_{60} -containing composites cytotoxicity in vitro. Mater.Sci.& Engineer. C, 2007, 27, 1121.
2. S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, S. M. Grebinyk, O. P. Matyshevskaya, Yu. I. Prylutskiy, U. Ritter, C. Siegmund, P. Scharff. Comparative study of biological action of fullerenes C_{60} and carbon nanotubes in thymus cells. Mat. wiss. u. Werkstofftech., 2009, 40, 238.
- 10 3. S. V. Prylutska, O. P. Matyshevskaya, I. I. Grynyuk, Yu. I. Prylutskiy, U. Ritter, P. Scharff. Biological effects of C_{60} fullerenes in vitro and in a model system. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 2007, 468, 265.
4. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S. R. Wilson, F. Moussa. C_{60} fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. Nano Lett., 2005, 5, 2578.
- 15 5. S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, O. P. Matyshevskaya, Yu. I. Prylutskiy, U. Ritter, P. Scharff. Antioxidant properties of C_{60} fullerenes in vitro. Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostruct, 2008, 16, 698.

6. S. Murugesan, S. A. Mousa, L. J. O'Connor, D. W. Lincoln, R. J. Linhardt, Carbon inhibits vascular endothelial growth factor- and fibroblast growth factor-promoted angiogenesis. *FEBS Lett*, 2007, 557, 1157.

7. J.-J. Yin, F. Lao, P. P. Fu, W. G. Warner, Y. Zhao, P. C. Wang, Y. Qiu, B. Sun, G. Xing, J. Dong, X.-J. Liang, C. Chen. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*, 2009, 30, 611.

8. P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann, I. M. Dmytruk, M. M. Bilyi, O. A. Golub, A. V. Khavryuchenko, E. V. Buzaneva, V. L. Aksenov, M. V. Avdeev, Yu. I. Prylutsky, S. S. Durov. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*, 2004, 42, 1203.

9. L. Bulavin, I. Adamenko, Yu. Prylutsky, S. Durov, A. Graja, A. Bogucki, P. Scharff. Structure of fullerene C_{60} in aqueous solution. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2000, 2, 1627.

10. G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, E.L. Karyakina, N.O. Mchedlov-Petrosyan. STUDIES OF AQUEOUS COLLOIDAL SOLUTIONS OF FULLERENE C_{60} BY ELECTRON MICROSCOPY. *Chem.Phys.Lett.*, 300 (1999) 392-396.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування немодифікованих фулеренів C_{60} у формі водних розчинів з розміром фулеренових кластерів не більше 3 нм як протипухлинних агентів у терапії злоякісних новоутворень.

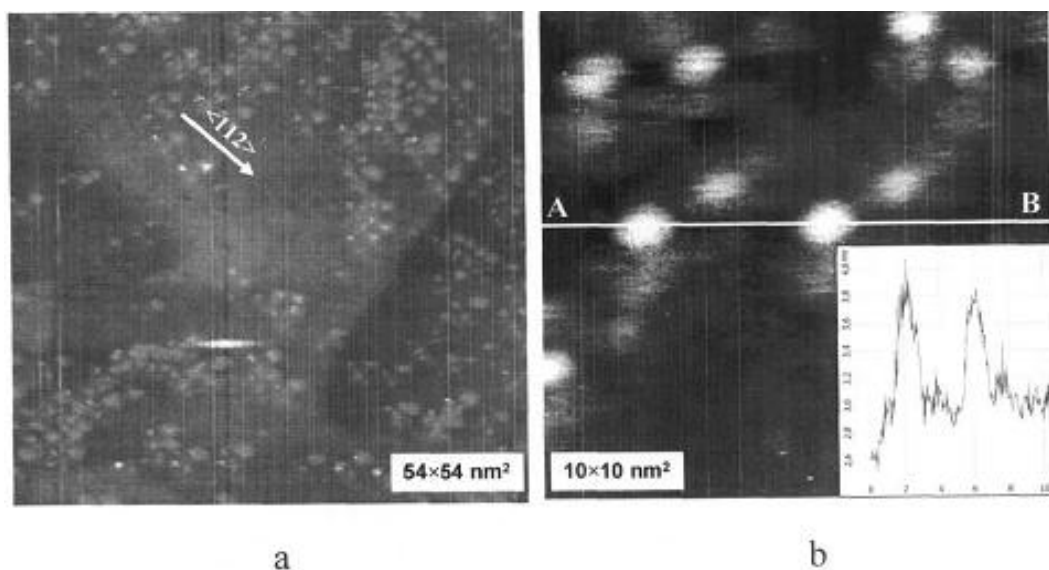
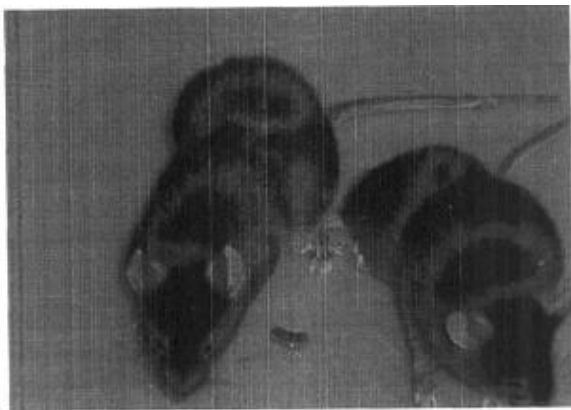


Fig. 1



a



a



b

Fig. 2



b

Fig. 3

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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