



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103450** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07F 17/00
A61K 31/495 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 01370**
(22) Дата подання заявки: **05.02.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.10.2013**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.07.2013, Бюл.№ 14**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2013, Бюл.№ 19**

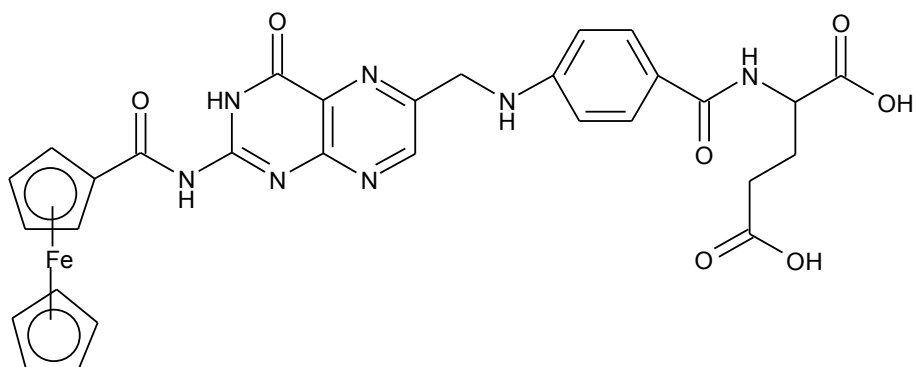
(72) Винахідник(и):
Рожнова Рита Анатоліївна (UA),
Гладир Ірина Іванівна (UA),
Макеєва Людмила Володимирівна (UA),
Галатенко Наталія Андріївна (UA)
(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ
СПОЛУК НАН УКРАЇНИ,
Харківське шосе, 48, м. Київ, 02160 (UA)
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
J. Zhang, S. Rana, R.S. Srivastava, R.D.K. Misra On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. Acta Biomaterialia.-2008. - Vol. 4. - p. 40-48
Min-Hua Chen, Chung-King Hsu, Feng-Huei Lin, Stobinski L., Peszke J. Folic acid immobilized ferrimagnetic DP-bioglass to target tumor cell for cancer hyperthermia treatment. Advances in Science and Technology-2006. - Vol. 53
Reeves P. C. Carboxylation of aromatic compounds: ferrocenecarboxylic acid. Organic syntheses.-1988. - Vol. 6. - p. 625-628
US 3 960 911 A; 01.06.1976
US 3 960 911 A; 01.06.1976
EP 1 533 316 A1; 25.05.2005
EP 1 733 727 A1; 20.12.2006 & UA
200704098 C2; 25.06.2007

(54) ФОЛАТ-КОН'ЮГОВАНИЙ ФЕРОЦЕН ЯК БІОЛОГІЧНО АКТИВНА СПОЛУКА МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

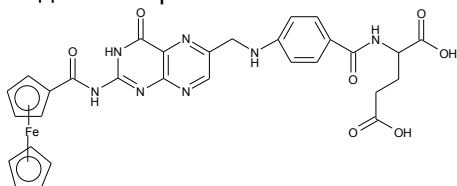
(57) Реферат:

Винахід стосується хімічної сполуки, а саме кон'югатів металоценів (металів групи заліза) та фолієвої кислоти, загальної формули:

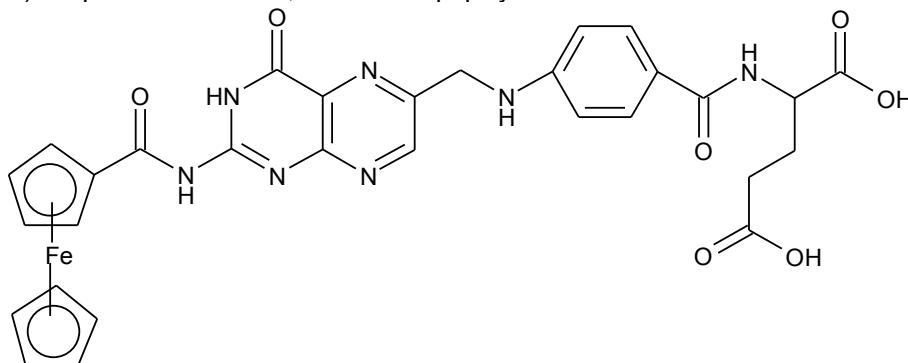
UA 103450 C2



як біологічно активна сполука медичного призначення.



Винахід стосується нової хімічної сполуки, а саме кон'югатів металоценів (металів групи заліза) та фолієвої кислоти, загальної формули:

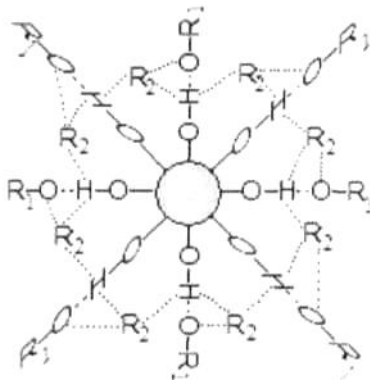


як біологічно активної сполуки медичного призначення.

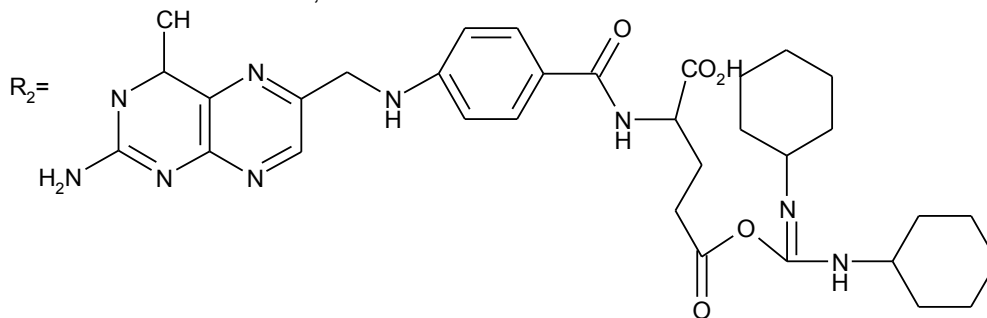
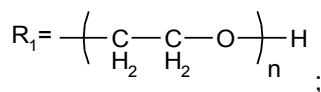
- 5 Фолат-кон'югований фероцен може бути використаний у медичній практиці для ефективного селективного транспорту лікарської речовини у місце патології, а також може бути використаний при розробці нових полімерних імплантаційних матеріалів.

- Відомо [1] фолат-кон'юговане біоскло як носій лікарських речовин і генів призначений для застосування у магнітній індукованій гіпертермії. Біоскло являє собою композицію, на основі оксидів феруму (III), натрію, кальцію, силіцію (IV) та фосфору (V). Кон'югацію фолієвої кислоти здійснюють через карбоксильну групу фолієвої кислоти, шляхом утворення комплексу поліетилен-біс-амін-фолієва кислота у присутності N, N'-дициклогексилкарбодііміду та піридину, як каталізатора реакції, з наступною його іммобілізацією на поверхні біоскла з використанням аміносилану, як поєднуючого агента. Позитивними властивостями біоскла є його біоактивність, біодеградабельність і гідрофільність. Проте, спосіб його одержання характеризується використанням високої температури при синтезі біоскла та довготривалістю процесу, а саме: біоскло отримують за температури 1400 °C протягом 2-х годин з подальшим подрібненням протягом двох днів.

Прототипом винаходу є фолат-кон'югований магнетит, загальної формули:



де



синтезований у три стадії. На першій стадії одержують магнетит (Fe_3O_4) за допомогою високотемпературного декомпозиційного процесу з розчину ферум (III) ацетилацетонату у біфеніловому етері за температури 200-260 °C [2]. Одержані часточки магнетиту виділяють з етанолу, двічі центрифугують і висушують при 50 °C протягом 24 годин. На другій стадії

5 проводять функціоналізацію магнетиту поліетиленгліколем шляхом взаємодії аміно-поліетиленгліколь-карбоксилу і магнетиту за мольного співвідношення 2:1 при перемішуванні за температури 20-22 °C протягом 12 годин. Третя стадія - кон'югація фолієвої кислоти до поліетиленгліколь-функціоналізованого магнетиту через карбоксильну групу фолієвої кислоти. Фолієву кислоту розчиняють у диметилсульфоксиді і додають N, N'-дициклогексилкарбодіамід

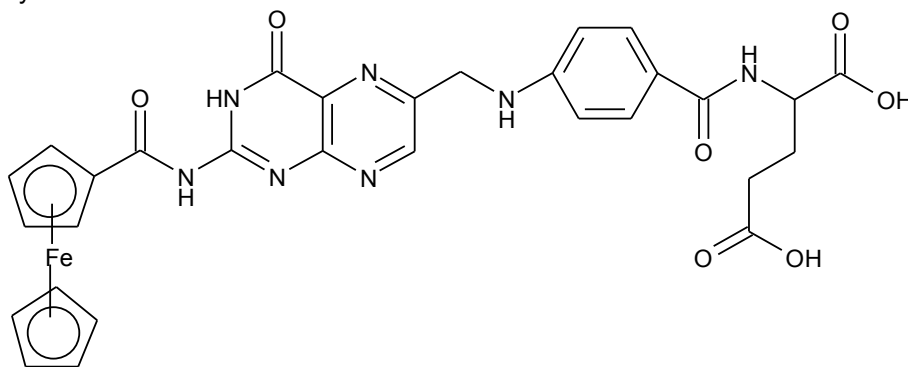
10 за мольного співвідношення 1:1 при перемішуванні в атмосфері азоту протягом 2-х годин для утворення ізосечовини. Після цього до розчину додають поліетиленгліколь-функціоналізований магнетит і перемішують впродовж 2-х годин. Одержаний фолат-кон'югований магнетит двічі промивають водою і висушують заморозкою. Позитивним аспектом є можливість використання фолат-кон'югованого магнетиту як системи адресної доставки терапевтичних препаратів з

15 контролем виділенням лікарської речовини у місці патології. Проте, синтез характеризується довготривалістю та високою складністю, потребує використання високотехнологічного обладнання і застосування високих температур.

Задачею винаходу, що пропонується, є одержання кон'югату залізовмісної сполуки з фолієвою кислотою, що має власну біологічну активність, з метою можливого використання у

20 медичній практиці для ефективного селективного транспорту лікарської речовини у місце патології, а також при розробці нових полімерних імплантаційних матеріалів.

Поставлена задача вирішується синтезом фолат-кон'югованого фероцену, загальної формули:



25 як біологічно активної сполуки медичного призначення.

Згідно з запропонованим винаходом, карбоксильні групи фолієвої кислоти блокують триетиламіном, а кон'югацію фолієвої кислоти здійснюють через аміногрупу, у присутності N, N'-дициклогексилкарбодіаміду, за мольного співвідношення фолієва кислота: фероценкарбонова кислота: N, N'-дициклогексилкарбодіамід = 1:2:2.

30 Фероценкарбонову кислоту синтезують за відомою методикою [3] при взаємодії фероцену і 2-хлоробензоїлхлоридом за мольного співвідношення 1:1 у присутності алюміній хлориду у середовищі дихлорометану в атмосфері сухого аргону протягом 3 годин (1 год. -0-5 °C, 2 год. - за температури 20-22 °C). 2-хлоробензолфероцен перекисталізують з н-гептану. 2-хлоробензолфероцен являє собою голчасті кристали червоного кольору, розчинні в органічних

35 розчинниках (ДМСО, ДМФА, ДМАА) з $T_{пл}$ (91-95) °C.

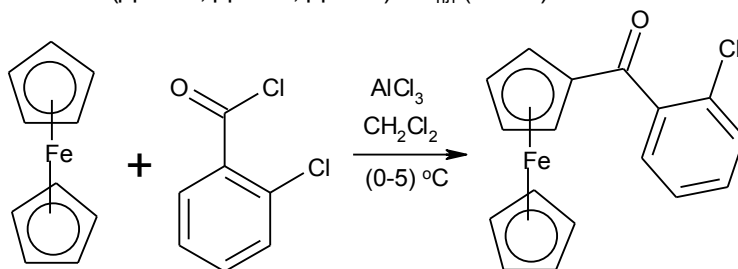


Схема 1. Синтез 2-хлоробензолфероцену

Синтез відбувається з отриманням проміжної сполуки, 2-хлоробензолфероцену, та її наступною реакцією з калій третбутилатом при додаванні води за мольного співвідношення 2-хлоробензолфероцен:вода=1:3,5, за температури 20-22 °C у середовищі 1,2-диметоксиетану

40 (схема 2).

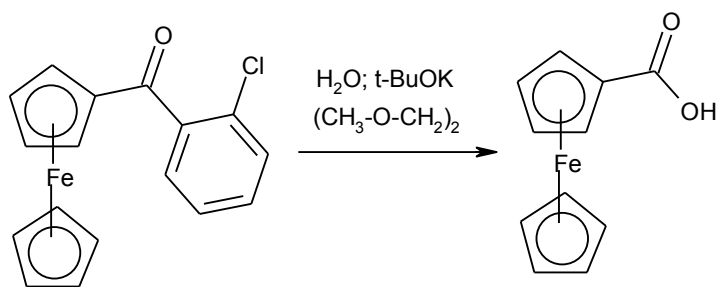


Схема 2. Синтез фероценкарбонової кислоти

Будову фероценкарбонової кислоти підтверджено методом ^1H ЯМР-спектроскопії. На ^1H ЯМР-спектрі фероценкарбонової кислоти (рис. 1) наявні смуги, які характеризуються наступними хімічними зсувами: 4,6 м. ч. (т, 2H, Cr_1), 4,7 м. ч. (т, 2H, Cr_1); 4,3 м. ч. (с, 5H, Cr_2), 12,1 м. ч. (с, 1H, $-\text{COOH}$). Фероценкарбонову кислоту застосовують безпосередньо для взаємодії з фолієвою кислотою.

Синтез фолат-кон'югованого фероцену відбувається одностадійно (схема 3).

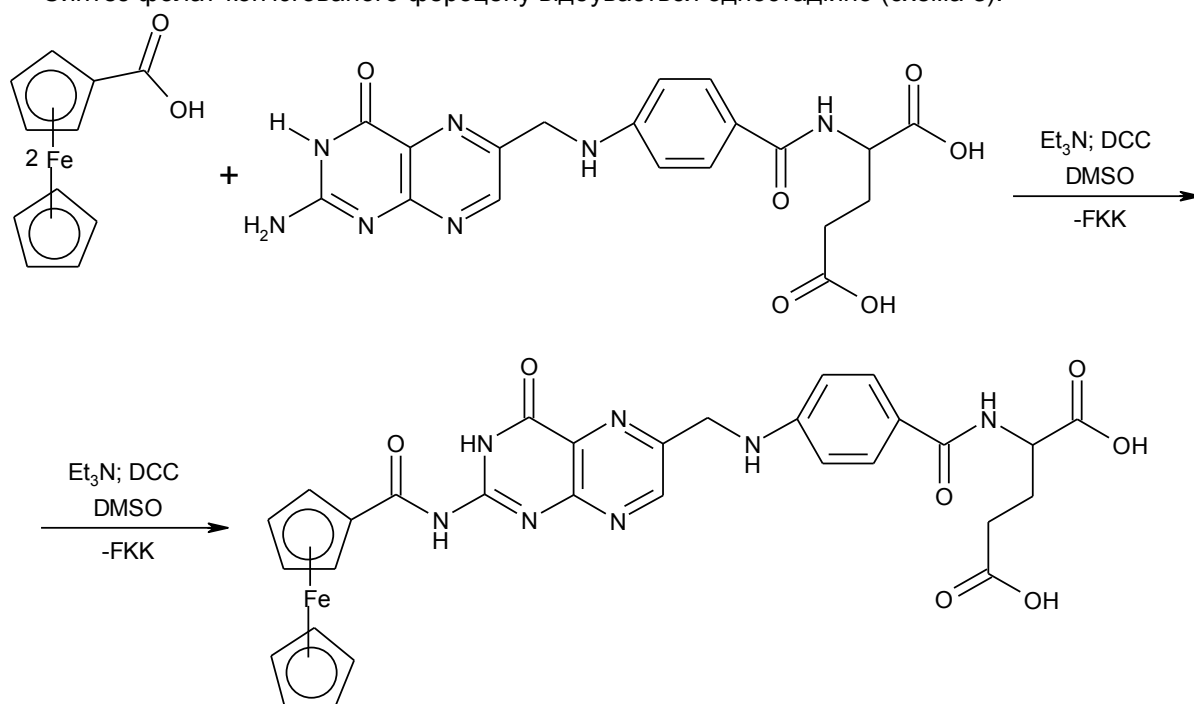


Схема 3. Синтез фолат-кон'югованого фероцену

Для проведення реакції фолієву кислоту при перемішуванні розчиняли у безводному диметилсульфоксиді за температури (65-70°) С. Для блокування карбоксильних груп фолієвої кислоти додавали триетиламін за співвідношення фолієва кислота: триетиламін = 1:2. Синтез проводили за мольного співвідношення фолієва кислота: фероценкарбонова кислота: N, N'-дициклогексилкарбодіїмід = 1:2:2 у середовищі диметилсульфоксиду при перемішуванні в атмосфері сухого аргону з додаванням N, N'-дициклогексилкарбодіїмиду, як ініціатора реакції [4]. Реакцію проводили протягом 24 годин за температури 20-22 °С, без використання каталізатора. В результаті реакції утворюється осад - побічний продукт (сечовина, залишки непрореагованої фероценкарбонової кислоти), від якого звільнялися шляхом фільтрації, а цільовий продукт, який залишається у розчині, виділяли у діетиловий етер та промивали дистильованою водою.

Приклад

В тригорлому реакторі, який забезпечений мішалкою, термометром, системою для подачі аргону, розчиняли при перемішуванні 0,5 г (0,00113 моль) фолієвої кислоти у 10 мл безводного диметилсульфоксиду за температури (65-70°) С. Після повного розчинення фолієвої кислоти, реакційну суміш охолоджували до температури 20-22 °С. Для блокування кислотних груп фолієвої кислоти додавали 0,229 г (0,00226 моль) триетиламіну. Перебіг реакції контролювали за допомогою ІЧ-спектроскопії. Через 30 хв, додавали 0,474 г (0,00226 моль) фероценкарбонової кислоти і 0,466 г (0,00226 моль) N, N'-дициклогексилкарбодіїмиду. Реакційну

суміш продовжували перемішувати за температури 20-22 °C протягом 24 годин. Осад (побічний продукт), який утворюється в результаті реакції, відфільтрували, а кон'югат виділяли з розчину, шляхом висаджування у діетилетер, промивали дистильованою водою і сушили у сушильній шафі при 70° C до сталої ваги.

5 Фолат-кон'югований фероцен було одержано у вигляді коричневого порошку з $T_{пл}$ (176-182)°C, з практичним виходом - 48 %.

Структура одержаного фолат-кон'югованого фероцену доведена методом протонного магнітного резонансу. На 1H ЯМР-спектрі (рис. 2) присутні наступні сигнали: 6,5-6,6 м. ч. (д, 2H, -Ar-); 7,5-7,6 м. ч. (д, 2H, -Ar-), 8,1-8,2 м. ч. (д, 1H, -NH-C(O)-), 6,9-7,0 м. ч. (т, 1H, -NH-CH₂-), 4,4-4,5 м. ч. (д, 2H, -NH-CH₂-), 4,3-4,4 м. ч. (м, 1H, -CH-), 1,91-2,03 м. ч. (дм, 2H, -CH₂-), 2,2-2,4 м. ч. (т, 2H, -CH₂-), 8,6-8,7 м. ч. (с, 1H, птеройловий залишок), 6,8-7,0 м. ч. (с, 1H, -NH₂), 4,6 м. ч. (т, 2H, Cr₁), 4,7 м. ч. (т, 2H, Cr₁); 4,3 м. ч. (с, 5H, Cr₂).

Біологічну активність фолат-кон'югованого фероцену досліджували методом культури тканин згідно [5]. Як головний спосіб культивування було використано метод експлантації у згустку плазми (тверда фаза) у флаконах Карреля з додаванням поживної суміші (рідка фаза). Об'єкт дослідження - фолат-кон'югований фероцен у вигляді порошку, який вносили до рідкої фази культорального середовища при експлантації на початку культивування у кількості 0,1 %. Експлантаційним матеріалом слугувала підшкірна клітковина білих безпородних щурів обох статей 3-місячного віку, яку використовували і як контроль. Культури інкубували за температури 37 °C. Заміну рідкої фази поживного середовища проводили кожні 3 доби.

Спостереження за тканинними культурами з фолат-кон'югованим фероценом показали, що міграція фібробластичних елементів, як і у контролі, розпочинається третьої доби у вигляді тяжів та поодиноких клітин. На 5-7 добу культивування у флаконах Карреля з фолат-кон'югованим фероценом відбувається формування трьох зон росту: компактної, сіткоподібної та зони одиничних мігруючих клітин, які є значно ширшими, у порівнянні з контролем, і відзначаються більшою варіабельністю клітинних форм. Наявний так званий тканиноподібний ріст. На 10 добу дослідження у флаконах Карреля з фолат-кон'югованим фероценом відбувається значне збільшення площі тканиноподібного росту клітин полігональної форми, в той час, як у контролі в усіх трьох зонах росту спостерігалися ознаки дегенеративних змін фібробластичних елементів. На 14 добу культивування зони росту клітинних елементів у флаконах з фолат-кон'югованим фероценом значно відрізняється від контрольних культур. Зони росту представлені широкими полями клітин полігональної форми, в основному макрофагальними елементами. Відмічається зона росту одиничних мігруючих клітин у вигляді фібробластів веретеноподібної форми. На 21 добу у контролі повна деградація зон росту, у той самий час, як у дослідних флаконах лише настає фаза деградації у компактній зоні росту, поряд з продовженням міграції фібробластичних елементів у зоні росту одиничних мігруючих клітин.

Таким чином, дослідження біологічної активності свідчать про те, що фолат-кон'югований фероцен, внесений у тканинну культуру, стимулює ріст фібробластичних і гістіоцитарних елементів на усіх етапах культивування, що підтверджує його біологічну активність і обумовлює можливість його використання у медичній практиці.

Деякі параметри синтезу та властивості залізовмісних сполук згідно винаходу і прототипу наведені у таблиці.

Кон'югат	Склад кон'югату	Спосіб кон'югації	Кількість стадій синтезу кінцевого продукту	Тривалість процесу синтезу кінцевого продукту, години	Умови зберігання вихідної речовини	Температура процесу, °C	Біологічна активність
За прототипом	Fe ₃ O ₄ , поліетиленгліколь, фолієва кислота	через карбоксильну групу ФК	3	76	4 °C	50-260	-
Згідно винаходу	фероценкарбонова кислота, фолієва кислота	через аміногрупу ФК	1	24	стандартні умови	20-22	+

45 За даними таблиці, для одержання кон'югату згідно винаходу необхідно у 3 рази менше часу, ніж за прототипом, спосіб виділення спрощений і одержана залізовмісна функціоналізована речовина не потребує особливих умов зберігання. Згідно даних таблиці, процес кон'югації фолієвої кислоти до фероцену, на відміну від прототипу, відбувається через аміногрупу фолієвої кислоти в одну стадію, не потребує використання високих температур і

відбувається за температури 20-22 °С. Одержаний фолат-кон'югований фероцен має власну біологічну активність.

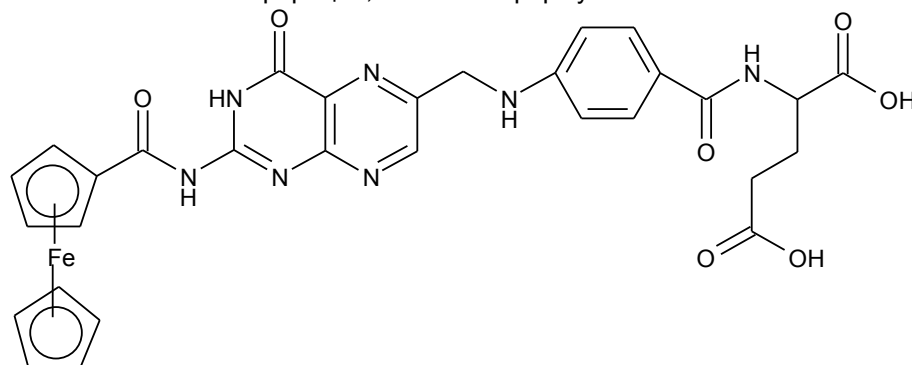
¹H ЯМР-спектри реєстрували на спектрометрі "Varian VXR-300" у розчині повністю дейтерованого ДМСО-d₆, внутрішній стандарт - тетраметилсилан. Ідентифікацію смуг поглинання зроблено згідно з даними роботи [6].

Перелік посилань:

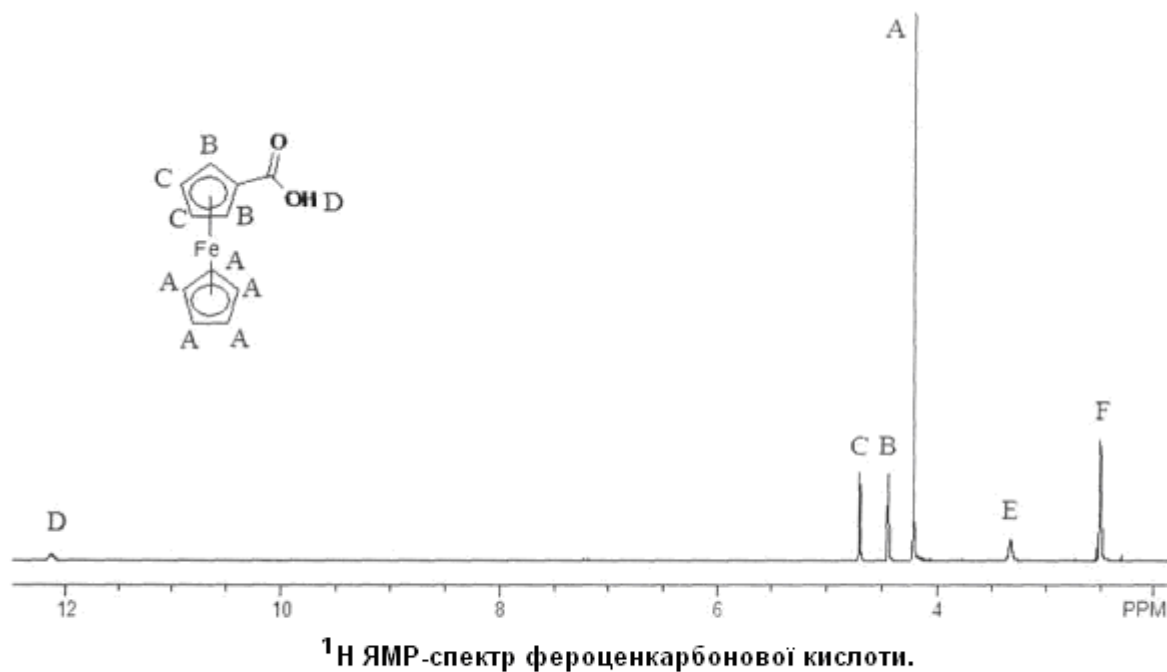
1. Min-Hua Chen, Chung-King Hsu, Feng-Huei Lin, Stobinski L., Peszke J. Folic acid immobilized ferrimagnetic DP-bioglass to target tumor cell for cancer hyperthermia treatment // *Advances in Science and Technology*-2006. - Vol. 53. -p. 50-57.
2. J. Zhang, S. Rana, R.S. Srivastava, R.D.K. Misra On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles // *Acta Biomaterialia*.-2008. - Vol. 4. - p. 40-48 - прототип.
3. Reeves P. C. Carboxylation of aromatic compounds: ferrocenecarboxylic acid // *Organic syntheses*.-1988. - Vol. 6. - p. 625-628.
4. Бочаров Б.В. Достижения в химии карбодиимидов // *Успехи химии*.-1965.-34, № 3. - С. 488-502.
5. Лаппо В.Г. Некоторые результаты и перспективы использования метода тканевых культур в токсикологии медицинских полимеров / В.Г. Лаппо, В.И. Тимохина, В.П. Яценко, Н.А. Галатенко // *Гигиена и санитария*.-1081. - № 10. - С. 54-56.
6. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффолер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных: Пер. с англ. -Москва: Мир; БИНОМ. Лаб. знаний, 2006.-438 с.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

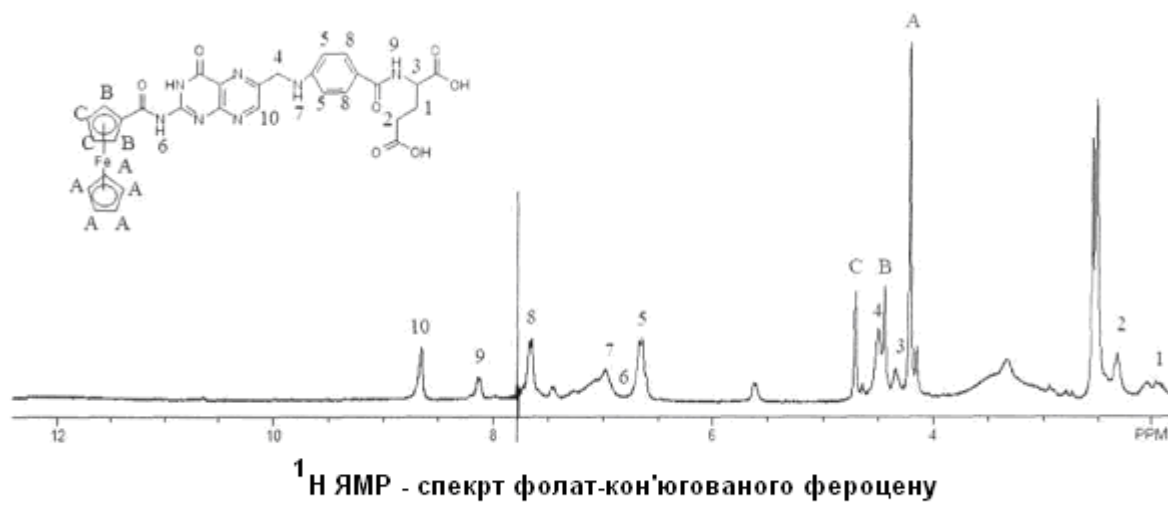
Фолат-кон'югований фероцен, загальної формули:



як біологічно активна сполука медичного призначення.



Фіг.1



Фіг.2

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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