



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104426** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 36/73 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 15971**

(22) Дата подання заявки: **04.06.2009**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.02.2014**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **0810195.8**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **04.06.2008**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **GB**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.06.2011, Бюл.№ 11**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **РСТ/GB2009/050621,
04.06.2009**

(72) Винахідник(и):

**Веласко Дієс Гільєрмо (ES),
Гусман Пастор Мануель (ES),
Лоренте Мар (ES),
Торрес Софія (ES),
Родрігес Фатіма (ES)**

(73) Власник(и):

ДЖИДАБЛЮ ФАРМА ЛІМІТЕД,
Porton Down Science Park, Salisbury,
Wiltshire SP4 0JR, United Kingdom (GB),
ОЦУКА ФАРМАСЬЮТІКАЛ КО ЛІМІТЕД,
9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-
ku, Tokyo 101-8535, Japan (JP)

(74) Представник:

**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

GB 2418612 A, 05.04.2006
RUSSO ET AL. / A tale of two cannabinoids:
The therapeutic rationale for combining
tetrahydrocannabinol and cannabidiol //
MEDICAL HYPOTHESES, EDEN PRESS,
PENRITH, US. - vol. 66, no. 2. - 01.01.2006. -
P.234-246
WO 02/069993 A1, 12.09.2002
LIGRESTI A. ET AL. / Antitumor activity of
plant cannabinoids with emphasis on the effect
of cannabidiol on human breast carcinoma //
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND
EXPERIMENTAL THERAPEUTICS 2006 US. -
vol. 318, no. 3. - 2006. - P.1375-1387
EP 1177790 A1, 06.02.2002
VACCANI A. ET AL. / Cannabidiol inhibits
human glioma cell migration through a
cannabinoid receptor-independent mechanism
// BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY
200504 GB. - vol. 144, no. 8. - April 2005
(2005-04). - P.1032-1036
VELASCO GUILLERMO ET AL. /
Cannabinoids and gliomas // MOLECULAR
NEUROBIOLOGY. - vol. 36, no. 1. - August
2007 (2007-08). - P.60-67

(54) ПРОТИПУХЛИННІ ЕФЕКТИ КОМБІНАЦІЙ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК

UA 104426 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини та фармацевтики і стосується комбінації канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) в співвідношенні від 5:1 до 1:5 для застосування в лікуванні пухлини головного мозку, більш конкретно гліоми, ще більш конкретно мультиморфної гліобластоми (МТБ).

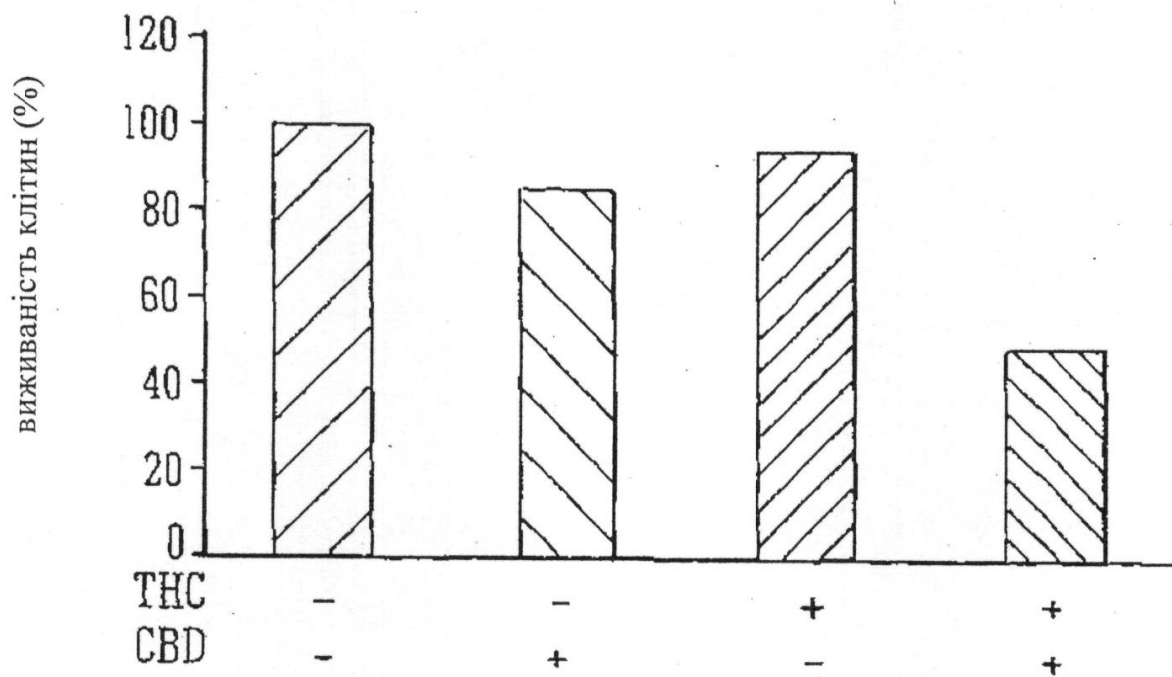


Fig.1

Даний винахід належить до використання комбінації канабіноїдів у виробництві лікарського препарату для застосування в лікуванні раку. Зокрема, підлягаючий лікуванню рак є пухлиною головного мозку, більш конкретно гліомою, ще більш конкретно мультиморфною гліобластою (МГБ) і переважна комбінація канабіноїдів містить тетрагідроканабінол (ТГК) і канабідіол (КБД).

5 Передумови створення винаходу

Рак являє собою захворювання, при якому група клітин виявляє ознаки неконтрольованого росту. Це означає, що клітини ростуть і діляться вище рівнів нормальних меж. Клітини також здатні проникати і руйнувати оточуючі тканини. Крім того, ракові клітини також іноді метастазують, тобто розповсюджуються в інші ділянки організму через кров або лімфу.

10 Більшість злоякісних новоутворень (раку) викликана порушеннями в генетичному апараті клітин. Ці порушення можуть бути наслідком дії канцерогенів. Інші генетичні порушення, що сприяють злоякісним новоутворенням, можуть з'являтися внаслідок помилок при реплікації ДНК, або є природженими, і таким чином присутні у всіх клітинах з народження.

15 Генетичні порушення, виявлені при злоякісних новоутвореннях, зазвичай стосуються двох основних класів генів. У злоякісних клітинах часто активовані сприяючі злоякісним новоутворенням онкогени, що наділяють ці клітини новими здібностями, такими як гіперактивний ріст і поділ, захист від програмованої загибелі клітин, втрата зв'язку з межами своєї тканини і здатність до розвитку в різних тканинних оточеннях.

20 Гени пухлинних супресорів часто інактивовані в злоякісних клітинах, що призводить до порушення нормальних клітинних функцій, таких як правильна реплікація ДНК, контроль за клітинним циклом, орієнтація і адгезія всередині тканин, і взаємодія із захисними клітинами імунної системи.

Існують різні типи злоякісних новоутворень і зазвичай злоякісні новоутворення класифікують згідно з типом тканини, з якої вони розвиваються.

25 Рак зазвичай лікують за допомогою одного або декількох наступних способів: хірургічне лікування, хіміотерапія, променева терапія, імунотерапія і терапія моноклональними антитілами. Спосіб лікування залежить від локалізації і стану пухлини і стадії захворювання.

Метою лікування є повне видалення злоякісного утворення без пошкодження іншого організму. Іноді цього можна досягти за допомогою хірургічного лікування, однак схильність 30 злоякісних новоутворень проникати в прилеглу або розповсюджуватися у віддалені ділянки за допомогою мікроскопічних метастазів часто обмежує його ефективність. Ефективність хіміотерапії часто обмежується токсичністю відносно інших тканин організму. Радіація також може ушкоджувати нормальну тканину.

Відомо, що злоякісні новоутворення ушкоджують різні ділянки тіла, і основні типи злоякісних 35 новоутворень включають: рак жовчного протоку, рак сечового міхура, рак кістки, рак кишечника (включаючи рак товстої кишки і рак прямої кишки), рак головного мозку, рак молочної залози, рак нейроендокринної системи (зазвичай відомий як карциноїд), рак шийки матки, рак ока, рак стравоходу, рак голови і шиї (ця група включає карциноми, що з'являються з клітин, які утворюють вистілку рота, носа, глотки, вуха або поверхневого шару язика), саркому Капоші, рак 40 нирки, рак гортані, лейкемію, рак печінки, рак легень, рак в лімфовузлах, лімфому Ходжкіна, неходжкінські лімфоми, меланому, мезотеліому, мієлому, рак яєчника, рак підшлункової залози, рак статевих членів, рак передстатевої залози, рак шкіри, саркоми м'яких тканин, рак спинного мозку, рак шлунку, рак яєчок, рак щитоподібної залози, рак піхви, рак вульви і рак матки.

Пухлини, які розвиваються у головному мозку, здатні руйнувати або ушкоджувати клітини 45 головного мозку за допомогою стимуляції запалення, здавлювання інших ділянок головного мозку, індукування церебрального набряку (набухання головного мозку) і можуть спричинити підвищення внутрішньочерепного тиску (тиску всередині черепа).

У Великобританії пухлину головного мозку щорічно діагностують приблизно у 4300 людей. Первинна пухлина головного мозку являє собою утворення, що з'явилося внаслідок 50 неконтрольованого росту або поділу клітин головного мозку. Первинні злоякісні пухлини головного мозку, ймовірно, викликають проблеми за рахунок поширення в оточуючу нормальну тканину головного мозку, і здавлювання і пошкодження прилеглих ділянок головного мозку. Ці пухлини рідко розповсюджуються за межі головного мозку в інші частини тіла. Однак вторинні пухлини головного мозку виникають у випадках, коли злоякісні клітини їх інших частин тіла, 55 таких як легені або молочна залоза, проникають в головний мозок.

Хірургічне лікування є способом вибору для багатьох пухлин мозку. Деякі можна повністю вирізати, однак для тих пухлин, які розташовуються глибоко або інфільтрують тканину 60 головного мозку, більш вірогідне зменшення їх маси, ніж видалення.

Залежно від типу пухлини, що розглядається, можна рекомендувати променеву терапію і хіміотерапію.

Гліальні пухлини часто бувають летальними. Характерне поширене інфільтративного пухлинного росту гліом часто унеможлиблює хірургічне видалення, і це значною мірою ускладнює клінічне ведення таких пацієнтів.

Мультиморфна гліобластома (МТБ) є найбільш поширеним і найбільш агресивним типом первинної пухлини головного мозку і становить 52% від всіх випадків первинних пухлин головного мозку і 20% від всіх внутрішньочерепних пухлин.

Для зниження смертності пацієнтів з діагностованою гліомою робляться різні підходи. Вони включають способи терапії, направлені на клітини гліоми, але зберігаючи нормальні клітини непошкодженими, способи, що обмежують поширення злоякісних клітин і лікування, що блокує молекули, які підтримують життєздатність пухлин.

Один з напрямів дослідження включає застосування канабіноїдів як протипухлинних засобів.

Канабіноїди являють собою активні компоненти рослини конопель і було виявлено, що вони демонструють численні фармакологічні ефекти.

Наприклад, EPI 177790 (Guzman et al.) описує лікування церебральних пухлин за допомогою введення природних або синтетичних канабіноїдів, зокрема ТГК. Заявлено, що активація специфічних рецепторів призводить до вибіркової загибелі трансформованих клітин.

Нещодавно було показано, що канабіноїд КБД має протипухлинні ефекти (Massi et al. 2004). У даній роботі описане пригнічення проліферації як *in vitro*, на клітинних лініях гліоми людини U87 і U373, так і *in vivo*, на підшкірно імплантованих голим мишам клітинах гліоми людини U87.

Злоякісні гліоми є пухлинами, що інтенсивно діляться і інфільтративними, які розвиваються згідно з характерними особливостями росту. Клітини гліоми проникають в прилеглі нормальні структури головного мозку і оточуючі великі кровоносні судини.

Крім того, патент EP 1802274 описує використання канабіноїду КБД для гальмування розвитку злоякісних клітин, мігруючих зі свого первинного пухлинного вогнища у вторинну ділянку.

Крім того, в Medical hypothesis (2006), том 66, стор. 234-246 обговорюються фізіологічні і клінічні ефекти ТГК і КБД і представлено логічне обґрунтування для їх поєднання. Визнано, що ТГК виявляє цитотоксичний вплив відносно "неопластичного захворювання" (сторінка 242), і що КБД також має доведений цитостатичний/цитотоксичний ефект. Приймаючи до уваги знеболюючий ефект сполуки КБД:ТГК при лікуванні злоякісних пухлин, додатковий корисний вплив ТГК і КБД на викликану хіміотерапією нудоту і описані первинні ефекти на ріст і поширення пухлини, додаткові клінічні випробування вважаються надто доцільними. Однак застосовність даної ідеї не може передбачити корисні властивості, які можна одержати від поєднання компонентів, які в іншому випадку окремо повинні вважатися недостатніми (або неефективними кількостями).

Суть винаходу

За даним винаходом забезпечується використання сполуки канабіноїдів у виробництві лікарського препарату для застосування в лікуванні раку.

Переважно, канабіноїди містять щонайменше тетрагідроканабінол (ТГК) і канабідіол (КБД).

Переважно, ТГК і КБД знаходяться в співвідношенні від 20:1 до 1:20 (ТГК:КБД).

Більш переважно, ТГК і КБД знаходяться в співвідношенні від 5:1 до 1:5 (ТГК:КБД).

Ще більш переважно, ТГК і КБД знаходяться в співвідношенні від 2:1 до 1:2, ще більш переважно, приблизно 1:1.

Кожний канабіноїд міститься в терапевтично ефективній кількості. Діапазони доз ТГК і КБД відносно вмісту канабіноїдів можна встановити виходячи із вмісту канабіноїду, який, переважно, знаходиться в діапазоні від 5 до 100 мг.

Підданий лікуванню рак може являти собою пухлину головного мозку.

Пухлини головного мозку зазвичай класифікують згідно з локалізацією пухлини і типом клітин, з яких розвивається рак.

Наприклад, різні типи пухлин головного мозку включають: неврому слухового нерва, астроцитому, лімфому ЦНС, епендимому, гемангіобластому, медулобластому, менінгіому, гліому, змішану гліому, олігодендрогліому, епіфізарні пухлини і пухлини гіпофіза.

Гліоми є пухлинами з гліальних клітин; ці клітини підтримують і захищають нервові клітини мозку. Гліоми складають приблизно половину від всіх первинних пухлин головного мозку і п'яту частину всіх первинних пухлин спинного мозку.

Комбінація канабіноїдів за винаходом особливо корисна у випадку, коли пухлина головного мозку є гліомою, більш конкретно мультиморфною гліобластомою (МТБ).

Один або декілька канабіноїдів можуть бути представлені у вигляді рослинних екстрактів, у вигляді чистих сполук або їх комбінації.

Рослинний екстракт визначають як екстракт з рослинного матеріалу, як описано в «Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research».

Як рослинний матеріал визначають рослини або частини рослини (наприклад, кора, деревина, листя, бруньки, коріння, квітки, плоди, насіння, ягоди або їх фрагменти), а також витяжки рослини.

Більш переважно, рослинний екстракт знаходиться в формі рослинної лікарської речовини.

Рослинні лікарські речовини, які одержують з рослин конопель, включають первинні екстракти, що одержуються за допомогою таких процесів, як наприклад: вимочування, проціджування, екстракція розчинниками, такими як C1-C5 спирти (наприклад, етанол), Norflurane (HFA134a), HFA227, рідкий діоксид вуглецю під тиском, і екстракція з використанням гарячого газу. Надалі можна одержати первинний екстракт за допомогою надкритичної або субкритичної екстракції, випарювання і хроматографії. Якщо використовують перераховані вище розчинники, то кінцевий екстракт може містити неспецифічні жиророзчинні компоненти. Їх можна видалити за допомогою різних процесів, що включають фракціонування охолодженням, яке передбачає охолодження до -20°C з подальшою фільтрацією для видалення воскового баласту, екстракцію з рідким діоксидом вуглецю і за допомогою дистиляції.

Рослинні лікарські речовини визначені в «Botanical Drug Products which are defined in the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research» як: "рослинний продукт, призначений для застосування як лікарський засіб; лікарський продукт, приготований з рослинної лікарської речовини".

Один або декілька канабіноїдів можна застосовувати роздільно, послідовно або одночасно один з одним.

Деякі аспекти даного винаходу додатково описані тільки як приклад з посиланням на супроводжуючі креслення, на яких:

Фіг. 1 являє собою гістограму, що показує виживаність клітин астроцитом людини U87MG після лікування ТГК, КБД або поєднання ТГК і КБД в порівнянні з контролем;

Фіг. 2a і 2b являють собою гістограми, що показують дані виживаності in vivo клітин двох клітинних ліній - U87MG (Фіг. 2a) і T98G (фіг. 2b) при різних концентраціях; і

Фіг. 3a, 3b і 3c представляють відомості про передбачуваний механізм дії сполуки на клітини U87MG.

Детальний опис

Наступні приклади описують експерименти, проведені з метою виявлення ефекту сполук канабіноїдів як протипухлинних засобів.

Приклад 1: Ефект ТГК і КБД при пригніченні росту злоякісних клітин in vitro.

Тетрагідроканабінол (ТГК) і канабідіол (КБД) в формі рослинних екстрактів конопель розчиняли в етанолі до концентрації 100 мМ і зберігали на вимогу при -20°C,

Перед використанням рослинні екстракти конопель додатково розводили до необхідної концентрації з тим, щоб концентрація етанолу була менше 0,001 %.

Протягом всього даного експерименту використовували клітини гліоми людини U87. Клітини культивували при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂ і 95% повітря.

Клітини культивували в 75 см² культуральному флаконі в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), яке доповнювали 4 мМ L-глутаміну, 100 Од/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину, 1% пірувату натрію, 1% незамінних амінокислот і 10% інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки.

Вживаність клітин астроцитом людини U87MG вивчали при різних концентраціях канабіноїдів. Порівнювали екстракти ТГК і КБД з чистими ТГК і КБД.

Результати:

Таблица 1

Вживаність клітин астроцитом людини U87MG в культурі

	IK50 мкМ (чисті канабіноїди)	IK50 мкМ (рослинний екстракт конопель)	IK50 мкМ (чистий еквівалент в рослинному екстракті конопель)
ТГК	0,37	0,64	0,43
КБД	0,47	0.72	0,47

Як можна бачити з таблиці 1 вище, екстракти ТГК і КБД мають більшу активність в порівнянні з відповідними чистими компонентами за умови, що кількість канабіноїду в екстракті відповідає еквівалентній кількості чистого компонента.

Це показує, що ТГК і КБД і їх екстракти ефективні відносно пригнічення росту клітин гліом.

5 Приклад 2: Ефект поєднання екстрактів ТГК і КБД при пригніченні росту злоякісних клітин *in vitro*.

Цей експеримент проводився з метою перевірки того, чи були поєднання екстрактів ТГК і КБД настільки ж ефективними відносно пригнічення клітинного росту як екстракти окремо.

Використовували способи, описані в прикладі 1 вище.

10 Результати:

Фіг. 1 містить гістограму, що показує порівняльну виживаність клітин астроцитоми людини U87MG у відповідь на екстракти ТГК і КБД окремо і в поєднанні один з одним.

Як можна бачити, якщо використовують поєднання ТГК і КБД, то виживаність клітин значно знижена в порівнянні з виживаністю клітин після обробки окремими ТГК або КБД.

15 Ці дані дозволяють передбачити, що канабіноїди ТГК і КБД будуть більш ефективними при лікуванні пухлин, якщо використовуються в поєднанні.

Приклад 3: Ефект комбінації ТГК і КБД при пригніченні росту злоякісних клітин *in vivo*.

Цей експеримент проводився з метою перевірки того, чи були ефективні поєднання екстрактів ТГК і КБД також і *in vivo*.

20 Клітини астроцитоми людини U87MG ксенотрансплантували голим мишам, і навколо пухлини за допомогою ін'єкцій вводили тестовані сполуки з концентрацією 15 мг/кг на добу.

Результати:

Таблиця 2

Об'єм пухлини через 15 діб лікування відносно вихідного моменту часу

	Об'єм пухлини
Наповнювач	9,2±0,6
Чистий ТГК	5,1±0,4
Екстракт ТГК	6,6±0,3
Екстракт ТГК:КБД (1:1)	4,8±0,3

25 Як можна бачити в таблиці 2 вище, об'єм пухлини після лікування поєднанням 1:1 екстрактів ТГК і КБД значно сприятливіше, ніж у випадку лікування окремими чистими екстрактами ТГК або ТГК.

Ці дані дозволяють передбачити, що канабіноїди ТГК і КБД будуть більш ефективними при лікуванні пухлин, якщо використовуються в поєднанні.

30 Приклад 4: Ефект концентрації канабіноїду на виживаність клітин двох різних клітинних ліній. Вивчали дію різних концентрацій ТГК, КБД і суміші ТГК і КБД в співвідношенні 1:1 на дві клітинні лінії: U87MG і T98G. Результати виживаності клітин показані на мал. 2a і 2b.

3 фіг. 2a буде видно, що неефективні/недостатні для ТГК і КБД дози 0,1 мкг/мл і 0,25 мкг/мл (виживаність клітин більше 90%) дозволяли призводити до статистично достовірного зниження виживаності клітин у випадку їх поєднання (SAT), результати якого демонстрували дозозалежний ефект при підвищенні концентрації (більша цитотоксичність при 0,25 мкг/мл).

35 Схожі результати одержували на клітинній лінії T98G (альтернативна клітинна лінія гліоми людини), як показано на фіг. 2b.

Приклад 5: Вивчення механізму дії.

40 Відомо, що ТГК викликає загибель клітин за допомогою сигнального каскаду, що включає ген ATG1 і загальну каспазу. Результати вивчення з урахуванням S6 фосфоритування, LC3 ліпідизації і ефекту ATG1 і інгібітора загальної каспази показані на фіг. 3a, 3b і 3c відповідно.

Як можна бачити з фіг. 3a, поєднання ТГК:КБД (в порівнянні з контролем C):

- Пригнічує активність mTORC1 (встановлено за рівнями S6 фосфорилювання); і
- 45 - Стимулює накопичення ліпідної форми LC3 (ознака аутофагії).

Фіг. 3b показує, що вимкнення суттєвого гена аутофагії ATG1 за допомогою вибіркового інгібітора (siATG10) siRNA знижує рівень індукованої клітинної загибелі в порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольною siC.

50 Нарешті, фіг. 3c демонструє, що клітини, оброблені інгібітором загальної каспази Z-VAD, також уникають індукованої клітинної загибелі.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) в співвідношенні від 5:1 до 1:5 для виготовлення лікарського засобу для лікування пухлини головного мозку, де вміст канабіноїду складає від 5 до 100 мг від загального вмісту канабіноїдів.
2. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за п. 1, де лікування пухлини головного мозку полягає в зниженні виживаності клітин, пригніченні клітинного росту або об'єму пухлини.
3. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за будь-яким з попередніх пунктів, де ТГК і КБД знаходяться в співвідношенні приблизно 1:1.
4. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за будь-яким з попередніх пунктів, де пухлина головного мозку являє собою гліому.
5. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за п. 4, де пухлина головного мозку являє собою поліморфну гліобластому (ПГБ).
6. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за будь-яким з попередніх пунктів, де ТГК і КБД присутні як рослинні екстракти, як чисті компоненти або їх комбінації.
7. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за п. 6, де рослинний екстракт знаходиться в формі рослинної лікарської речовини.
8. Комбінація канабіноїдів тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБД) за будь-яким з попередніх пунктів, де один або декілька канабіноїдів вводять окремо, послідовно або одночасно один з одним.

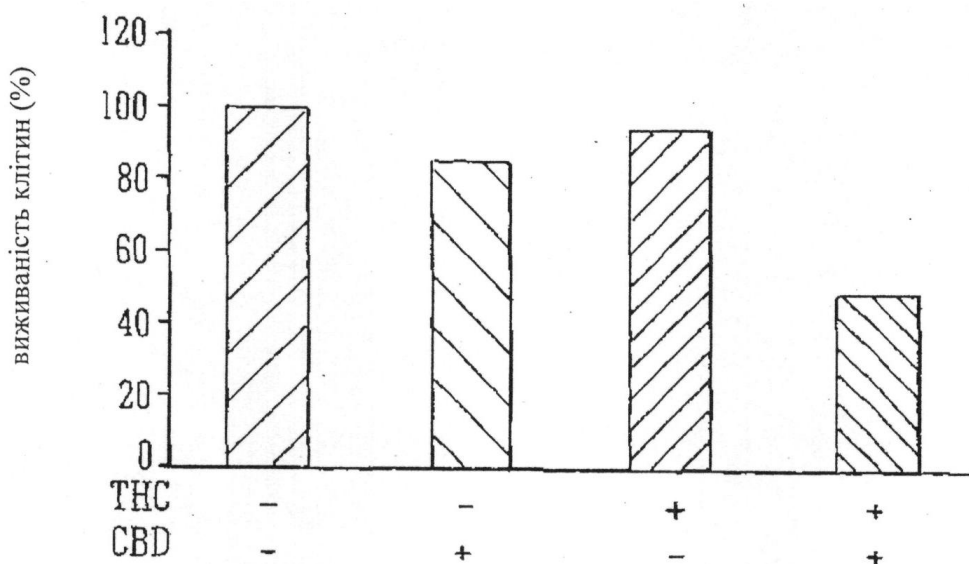
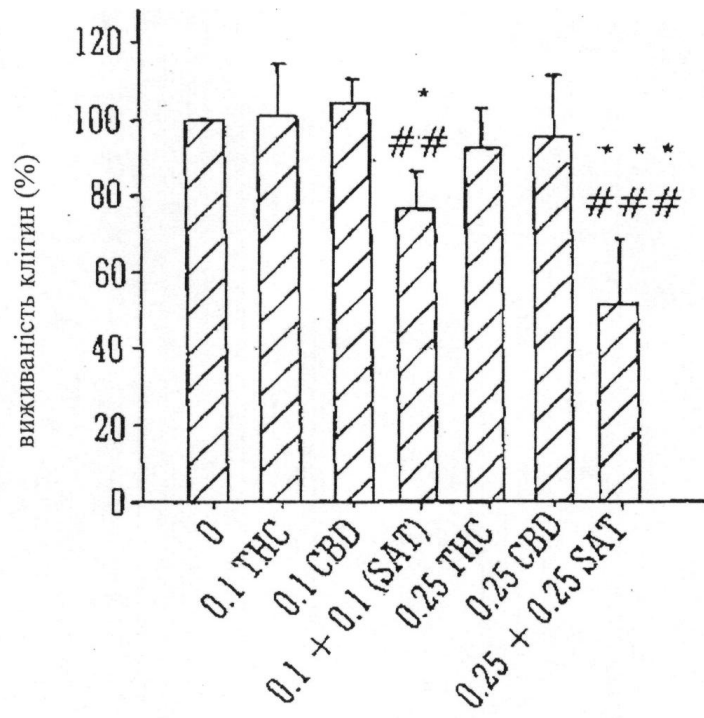
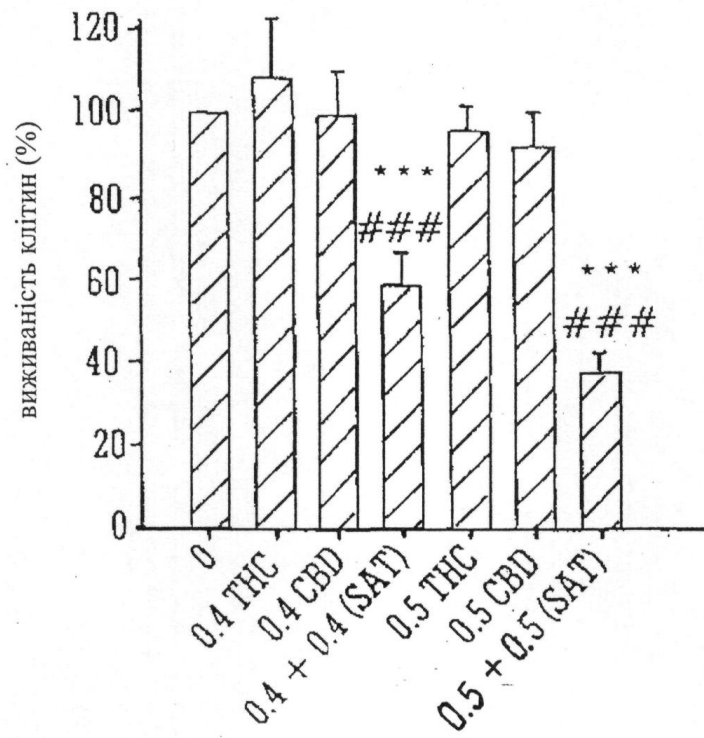


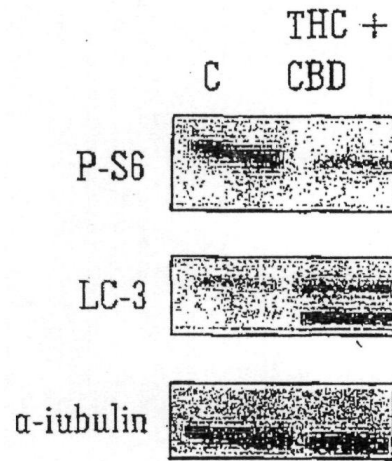
Fig. 1



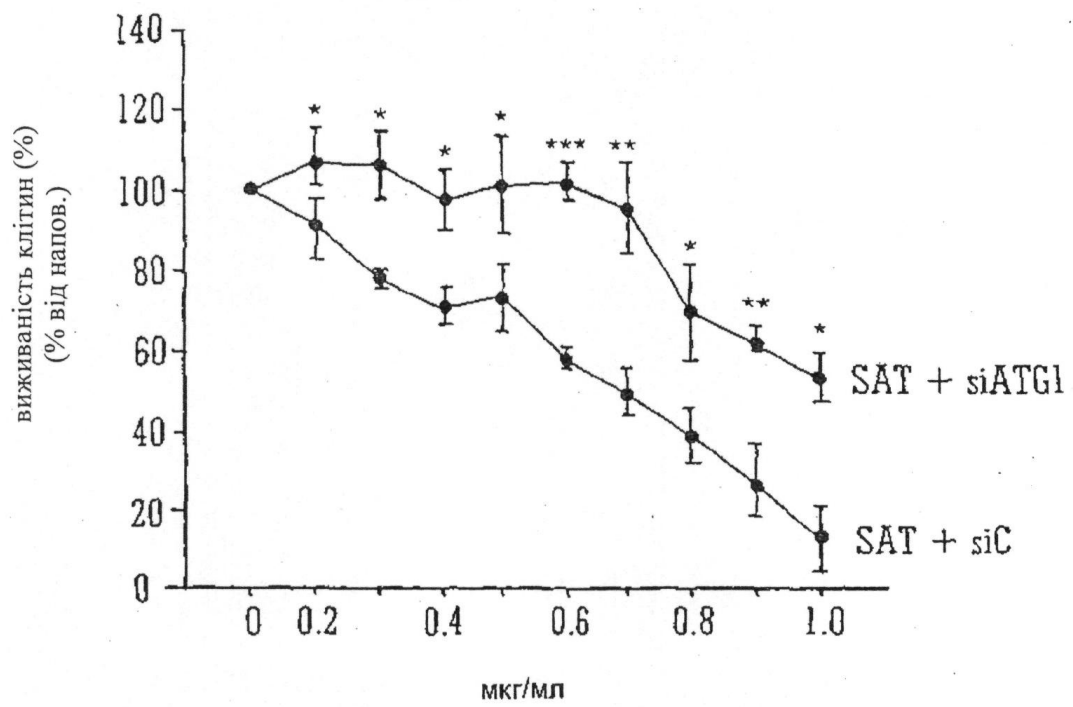
Фиг.2А



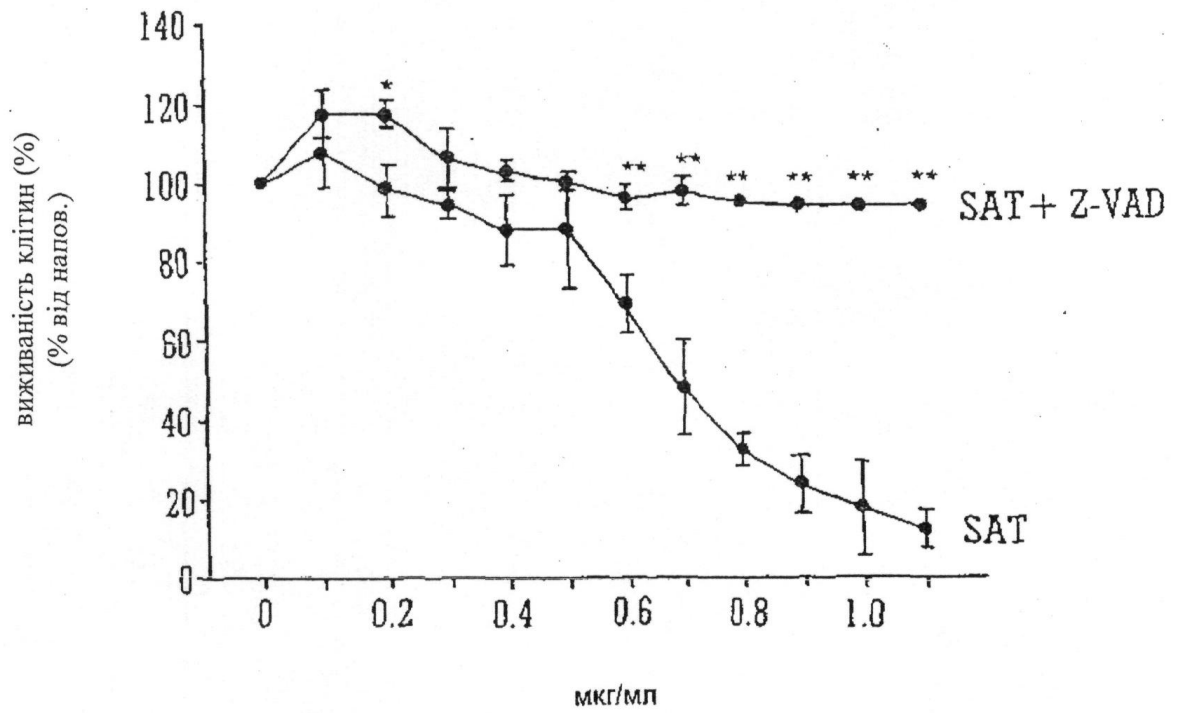
Фиг.2В



Фиг.3А



Фиг.3В



Фіг.3С

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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