



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **79903**

(13) **U**

(51) МПК

**A61K 31/185** (2006.01)

**C07C 39/23** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	<b>u 2012 10872</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Алексов Джуліан (SE), Локот Ігор (SE)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>18.09.2012</b>	(73) Власник(и):	<b>АРДЕНІЯ ІНВЕСТМЕНТС, ЛТД., First Floor, 45 Welbeck Street, London W1G8DZ (GB)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>13.05.2013</b>	(74) Представник:	<b>Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр. №177</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>13.05.2013, Бюл.№ 9</b>		

## (54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

### (57) Реферат:

Фармацевтична композиція містить фармацевтично прийнятний носій і систему доставки лікарських засобів (СДЛЗ) для введення розчинної у воді, катіонної й амфіфільної фармацевтично активної речовини (АФІ, активного фармацевтичного інгредієнта). СДЛЗ містить малорозчинні у воді наночастинки, утворені АФІ разом з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й/або натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти.

UA 79903 U



Дана корисна модель належить до фармацевтичної композиції, яка містить систему доставки лікарських засобів для введення амфіфільних катіонних фармацевтично активних речовин.

Два важливі параметри, пов'язаних з ефективністю лікарських засобів, являють собою "терапевтичний індекс" (також відомий як "терапевтичне відношення") і "терапевтичне вікно". Терапевтичний індекс являє собою порівняння кількості терапевтичного агента, що викликає терапевтичний ефект, з кількістю, яка викликає токсичні ефекти. Кількісно терапевтичний індекс дорівнює відношенню, отриманому при діленні дози, необхідної для надання токсичного ефекту, на терапевтичну дозу. Широко застосовуваним заходом терапевтичного індексу є відношення середньої смертельної дози, що викликає загибель 50 % піддослідних суб'єктів, ( $LD_{50}$ ) до середньої ефективної дози, що викликає терапевтичний ефект в 50 % піддослідних суб'єктів, ( $ED_{50}$ ). Терапевтичне вікно являє собою параметр для оцінки дозування лікарського засобу, що може ефективно лікувати захворювання, залишаючись при цьому всередині безпечного діапазону. Терапевтичне вікно є діапазоном між  $ED_{50}$  і початковою точкою кривої "доза-ефект" за показником "летальність". Як вважається, коректування цього параметру може допомогти уникнути більшості можливих побічних ефектів.

Лікарські препарати з вузькими терапевтичними вікнами добре відомі й часто належать до таких груп, як, наприклад, антиаритмічні засоби, протисудомні засоби, серцеві глікозиди, аміноглікозиди, цитотоксичні засоби й імунодепресанти.

Переважає більшість протипухлинних агентів мають дуже вузьке терапевтичне вікно. Одним зі шляхів поліпшення терапевтичного індексу таких агентів є застосування підходящих режимів інфузії. В ідеалі, концентрацію лікарського засобу підтримують всередині терапевтичного вікна протягом бажаного тимчасового діапазону, після якого засіб швидко виводиться з організму. Тривалі інфузії в загальному випадку показали хорошу ефективність із нечисленними побічними ефектами. Наприклад, тривала інфузія являє собою найбільш ефективний шлях зменшення кардіотоксичності доксорубіцину, одного з найбільш широко застосовуваних протипухлинних лікарських засобів. Однак тривалі інфузії (іноді триваючи аж до 72 годин) є дорогими й незручними. Відповідно, було вжито великих зусиль в напрямку імітації таких інфузій шляхом застосування систем доставки лікарських засобів, які можуть забезпечувати повільне вивільнення активного інгредієнта з різних видів депо лікарських засобів. Системи доставки лікарських засобів, що містять такі депо, зазвичай одержують за допомогою інкапсулювання лікарських засобів у наночастинки різних полімерів, полімеросом, ліпосом або мікроемульсій.

Однак з метою самозахисту від чужорідних організмів різних видів (таких як віруси, бактерії й спори грибів) організми людини й тварин виробили механізми для видалення або подрібнення частинок, розмір яких перевищує приблизно 50 нм. Ретикулоендотеліальна система (РЕС), частина імунної системи, є найбільш ефективним руйнівником таких частинок. Ймовірність того, що частинка стане мішенню РЕС, значно зростає із збільшенням розміру частинки.

Багато лікарських засобів одержують у катіонній амфіфільній формі, такі як, наприклад, лікарські засоби, що містять одну або більше аміногруп у своїй структурі. У кислому середовищі ці лікарські речовини перетворюються в солі, наприклад, гідрохлориди, сульфати, лактати або тартрати, і перебувають переважно у протонованій формі. Ці перетворення збільшують розчинність лікарських засобів у водяних розчинах і уможливають застосування цих розчинів для в/в інфузій. Після інфузії середовище змінюється на слабкоосновне, тому що рН крові приблизно дорівнює 7,4, у результаті чого відбувається депротонування лікарських засобів. Це, у свою чергу, зменшує розчинність речовин, що поліпшує ФК/ФД (фармакокінетичні/фармакодинамічні) властивості лікарського засобу за рахунок збільшення ступеня сполучення з білками, прискорення проникнення речовин у клітини, а також зниження ниркового кліренсу. Безліч протипухлинних лікарських засобів одержують у катіонній амфіфільній формі, і описаний шлях введення застосовують для таких лікарських засобів, як, наприклад, доксорубіцин і його аналоги (епірубіцин, даунорубіцин, ідарубіцин), алкалоїди барвінку (вінбластин, вінкрисдин, вінорелбін), амсакрин, мітоксантрон, топотекан і іринотекан.

У публікації US 2004048923 описана група ретиноїдів, що включає, серед безлічі інших речовин, натрієву сіль метилового ефіру N-(повністю-транс-ретиноїл)-L-цистеїнової кислоти й натрієву сіль метилового ефіру N-(13-цис-ретиноїл)-L-цистеїнової кислоти. Стверджується, що зазначені речовини дозволяють одержати нові мицелярні склади малорозчинних фармацевтичних сполук, таких як паклітаксел і доцетаксел. У публікації US 2004048923 не розглядають завдання забезпечення утворення наночастинок меншого розміру зі зниженою розчинністю у воді й поліпшеною здатністю до інкапсулювання.

Було б бажаним створення фармацевтичної композиції, яка містить систему доставки лікарських засобів для введення розчинних у воді амфіфільних катіонних фармацевтично

активних речовин, що передбачало б утворення менших наночастинок зі зниженою розчинністю у воді й поліпшеною здатністю до інкапсулювання. Це забезпечило б кращі ФК/ФД властивості й поліпшило б терапевтичні індекси лікарських засобів, що вводяться.

Однією задачею даної корисної моделі є забезпечення такої фармацевтичної композиції.

Таким чином, один аспект корисної моделі належить до фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій; і системи доставки лікарських засобів для введення фармацевтично активної речовини, самої по собі, що є катіонною амфіфільною речовиною, що й має розчинність *per se* у воді принаймні 4 мг/мл, при цьому система доставки лікарських засобів містить наночастинок, що мають розчинність у воді менше 0,1 мг/мл, причому, зазначені наночастинок утворені зазначеною речовиною в комбінації з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією; при цьому фармацевтичну композицію можна одержувати за допомогою способу, згідно з яким зазначену систему доставки лікарських засобів поєднують із кількістю, рівною приблизно 0,5-5 еквівалентів, з розрахунку на заряд катіона амфіфільної речовини, що міститься в системі доставки лікарських засобів, метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації.

Фармацевтична композиція згідно з корисною моделлю передбачає наночастинок, менші аніж приблизно 50 нм за розміром, і здатність допоміжної речовини на основі метилового ефіру до інкапсулювання (виражену як відношення маси допоміжної речовини до маси інкапсулювання лікарського засобу), що складає приблизно 1,2.

Дана корисна модель буде описана більш докладно в наступних описі, прикладах і на доданих кресленнях, де

Фіг. 1 являє собою схему, що ілюструє утворення практично нерозчинних у воді наночастинок шляхом асоціації катіонної амфіфільної речовини з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією.

Фіг. 2 ілюструє залежність розміру частинок, утворених натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти й гідрохлоридом доксорубіцину (співвідношення мас./мас. = 2,3:1), від концентрації доксорубіцину. Розчинник: водний розчин NaCl (130 ммоль), CaCl<sub>2</sub> (2 ммоль) і MgCl<sub>2</sub> (0,8 ммоль).

Фіг. 3 ілюструє кінетику розчинення частинок після розведення складу з натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й гідрохлориду доксорубіцину у співвідношенні мас./мас., що становить 2,1:1. Розчинник: водний розчин NaCl (5,9 мг/мл), KCl (0,3 мг/мл), CaCl<sub>2</sub> (0,295 мг/мл), гексагідрат MgCl<sub>2</sub> (0,2 мг/мл), ацетату натрію (4,1 мг/мл). Розведення від 2 до 0,04 мг/мл доксорубіцину.

Фіг. 4. ілюструє розподіл обсягу частинок за розмірами для складу, що отримується шляхом відновлення висушеною сублімацією суміші доксорубіцину, натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти (мас./мас./мас. = 1:1,05:1,05) у розчині NaCl (9 мг/мл) до концентрації доксорубіцину, що становить 0,5 мг/мл.

Перш ніж дана корисна модель буде розкрита й описана, слід розуміти, що дана корисна модель не обмежується конкретними формами, стадіями процесів і речовинами, запропонованими в даній заявці, тому що такі форми, стадії процесів і речовини можуть дещо змінюватись. Також слід розуміти, що застосовувана в даній заявці термінологія, використовується для цілей опису лише конкретних варіантів реалізації й не є обмежуючою, оскільки дана корисна модель обмежена винятково доданими пунктами формули корисної моделі та їх еквівалентами.

Слід зазначити, що в даному описі й формулі корисної моделі невизначена й визначена форми однини включають визначувані об'єкти в множині, якщо контекст ясно не пропонує інше.

У даному описі, якщо не зазначене інше, термін "приблизно", що змінює кількість інгредієнтів в системах доставки лікарських засобів або композиціях згідно з корисною моделлю або застосовуваний у способах згідно з корисною моделлю, належить до варіювання чисельної величини, яке може зустрічатися, наприклад, при виконанні типових процедур виміру й поводження з рідинами, що використовуються для одержання концентратів, або у застосуванні розчинів на практиці; внаслідок неминучої помилки в цих процедурах; внаслідок відмінностей в одержанні, джерелі або чистоті інгредієнтів, застосовуваних для одержання систем доставки лікарських засобів або композицій, або виконанні способів; і т.п. Термін "приблизно" також охоплює кількості, що відрізняються через різні рівноважні стани для композиції, яка утворюється в результаті із конкретної первісної суміші. Незалежно від того, чи модифікована

формула корисної моделі, терміном "приблизно", вона включає еквіваленти зазначеним кількостям.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "фармацевтично прийнятний носій" означає нетоксичний інертний твердий, напівтвердий або рідкий наповнювач, розріджувач, інкапсулююча речовина або допоміжна речовина будь-якого типу.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "система доставки лікарських засобів" належить до складу або пристрою, що доставляє терапевтичний агент(и) у бажану ділянку (ділянки) тіла й/або забезпечує своєчасне вивільнення терапевтичного агента (агентів).

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "фармацевтично активна речовина" включає будь-яку речовину, яка буде викликати терапевтично корисну фармакологічну відповідь при введенні в організм суб'єкта, включаючи і людей, і тварин.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "розмір частинки" належить до Z-середнього діаметра, вимірюваному за допомогою динамічного розсіювання світла із застосуванням червоного лазера довжиною хвилі 633 нм.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "наночастинка" належить до мікроскопічної частинки, розмір якої вимірюється в нанометрах.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "розчинність" речовини належить до здатності цієї речовини бути розчиненою у зазначеному розчиннику при приблизно кімнатній температурі, під якою розуміють температуру від приблизно 15 °C до приблизно 38 °C.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "цитотоксична сполука" належить до сполуки, яка має здатність пригнічувати ріст клітин або вбивати клітини.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "цитостатична сполука" належить до сполуки, яка має здатність приводити клітини, хоча й необов'язково лізовані або вбиті, у перманентний непроліферативний стан.

У даному описі, якщо не зазначено інше, термін "похідне" належить до сполуки, утвореної з вихідної структури або прямо, шляхом піддавання вихідної структури хімічної реакції, або шляхом "модифікації", яка являє собою часткове заміщення вихідної структури, або за допомогою дизайну й синтезу *de novo*. Похідні можуть бути синтетичними або можуть бути продуктами метаболізму клітини або ферментативної реакції *in vitro*.

В одному варіанті реалізації наночастинки фармацевтичної композиції згідно з корисною моделлю мають розчинність у воді менше 0,01 мг/мол.

В іншому варіанті реалізації фармацевтично активна речовина нековалентно асоційована з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією.

Катіонна фармацевтично активна речовина може, наприклад, містити одну або більше аміногруп; протианіон може, наприклад, являти собою хлорид, сульфат, лактат або тартрат. Речовина може бути природним, синтетичним або мати напівсинтетичну природу.

В одному варіанті реалізації фармацевтично активна речовина являє собою цитотоксичну або цитостатичну сполуку; в одному аспекті цього варіанта реалізації цитотоксична або цитостатична сполука являє собою протоновану форму доксорубіцину, мітоксантрону, епірубіцину, даунорубіцину, ідарубіцину, топотекану, іринотекану, вінбластину, вінкристину, вінорелбіну, амсакрину, прокарбазину, мехлоретаміну або їх комбінації; у конкретному аспекті зазначена сполука являє собою протоновану форму доксорубіцину; в іншому аспекті зазначена сполука являє собою протоновану форму мітоксантрону.

Згідно з одним варіантом реалізації даної корисної моделі, фармацевтична композиція може бути отримана у формі водного розчину, гелю, крему, мазі, таблетки, капсули або гелевої капсули.

В одному варіанті реалізації даної корисної моделі фармацевтичну композицію одержують шляхом змішування водного розчину фармацевтично активної речовини, яка містить одну або більш протоновану аміногрупу (аміногрупи), наприклад, у вигляді гідрохлориду, сульфату, лактату або тартрату, з більш ніж одним еквівалентом натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації на кожну аміногрупу. Це проілюстровано за допомогою нижченаведеної формули на прикладі гідрохлориду:

$(\text{LC-NH}_3)^{n+}\text{Cl}^{-n} + n \text{ АнСурфакт-O-Na}^+ \rightarrow (\text{LC-NH}_3)^{n+}\text{АнСурфакт-O-n} + n \text{ NaCl}$

де

термін "АнСурфакт-O" означає аніон метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, або метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти, або їх комбінації;

i

термін "( $\text{LC-NH}_3$ )<sup>n+</sup>" означає фармацевтично активну речовину із протонованою аміногрупою (аміногрупами).

Як видно,  $n$  еквівалентів АнСурфакт-О<sup>-</sup> сполучаються з ( $\text{LC-NH}_3$ )<sup>n+</sup>, утворюючи практично нерозчинний у воді комплекс відповідно до формули, а решта кількості АнСурфакт-О<sup>-</sup> застосовують для забезпечення розчинності отриманого комплексу.

Надлишок аніонів АнСурфакт-О<sup>-</sup> перебуває в діапазоні, що становить приблизно 0,2-10 еквівалентів. Чиста вода або різні водні розчини можуть бути застосовані як розчинники в даному процесі. Ці нові композиції, отримані шляхом змішування амонієвих солей лікарського засобу з АнСурфакт-О<sup>-</sup>, можуть бути застосовані прямо або висушені сублімацією для подальшого застосування.

Система доставки лікарських засобів на основі фармацевтичної композиції згідно даної корисної моделі може бути отримана за допомогою способу, відповідно до якого принаймні одну фармацевтично активну речовину, яка сама по собі є катіонною амфифільною речовиною, що має розчинність  $\text{per se}$  у воді принаймні 4 мг/мл, поєднують із натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією з утворенням наночастинок, що мають розчинність у воді менше 0,1 мг/мл; натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінація можуть бути нековалентно пов'язані із зазначеною речовиною. Фармацевтично активна речовина може бути об'єднана із надлишком, що дорівнює приблизно 0,2-10 еквівалентів, зазначеної натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації. Наночастинки, наприклад, мають розчинність у воді менше 0,01 мг/мл.

Натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінація можуть бути змішані у співвідношенні моль/моль, що становить 1:1, з гідрохлоридом, сульфатом, лактатом або тартратом доксорубіцину або його аналога, такого як епірубіцин, даунорубіцин або ідарубіцин; топотекану; іринотекану; або амсакрину з одержанням наночастинок, практично нерозчинних у воді.

У випадку фармацевтично активних речовин, що містять більш ніж одну аміногрупу, таких як, наприклад, мітоксантрон і алкалоїди барвінку, кількість метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації повинно відповідати числу протонованих аміногруп.

Фармацевтична композиція згідно з даною корисною моделлю може бути отримана за допомогою способу, відповідно до якого систему доставки лікарських засобів поєднують із кількістю, рівною приблизно 0,2-10 еквівалентів, з розрахунку на заряд катіона амфифільної речовини, що міститься у системі доставки лікарських засобів метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації.

Наночастинки системи доставки лікарських засобів згідно з корисною моделлю передбачають меншу полярність і знижену розчинність у воді, які, у свою чергу, призводять до поліпшеного проникнення через клітинні мембрани й більш сильному сполученню з білками, що викликають підвищену активність.

Корисна модель буде проілюстрована більш докладно в наступних необмежуваних прикладах.

#### ПРИКЛАДИ

#### МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Застосовувані склади були або свіжоприготовленими, або отриманими шляхом відновлення висушених сублімацією сумішей фармацевтично активних речовин з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією спеціалізованим розчином для відновлення.

Доксорубіцин був придбаний в Mercian Corporation, Japan. Мітоксантрон, Топотекан і Іринотекан були придбані в Chemtronica KB, Sweden. Адріаміцин і Доксил були придбані в аптеках і відновлені відповідно до вказівок виробників по застосуванню препаратів.

Розмір частинок складів вимірювали за допомогою методу динамічного розсіювання світла із застосуванням червоного лазера (633 нм, аналізатор Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd). Обчислювали середні значення із трьох незалежних вимірів для нанесення розмірів частинок на графік. Планки похибки на осі Y отримані шляхом додавання й віднімання величини стандартного відхилення вимірів.

Для оцінки цитотоксичності *in vitro* клітини різних ліній клітин пухлин людини були придбані в American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA): лінія клітин MDA-MB-231 аденокарциноми молочної залози людини (ATCC-HTB-26, Lot 3576799), лінія клітин SKOV-3 аденокарциноми яєчників людини (ATCC-HTB-77, Lot 3038337) і лінія клітин A549 недрібноклітинного раку легенів людини (ATCC- CCL-185, Lot 3244171). Клітини MDA-MB-231 культивували в культуральному середовищі MEM (модифіковане середовище Ігла) з додаванням 2 мМ L-глутаміну, 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS) і антибіотиків. Клітини SKOV-3 культивували в культуральному середовищі McCoy's 5A (середовище Маккоя 5A) з додаванням 1,5 мМ L-глутаміну, 10 % FBS і антибіотиків. Усі середовища й добавки були придбані в Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mi., USA). Культивування клітин усіх ліній проводили в культуральних флаконах BD Falcon™ площею 25 або 75 см<sup>2</sup> (Becton Dickinson Labware). Клітини A549 культивували в культуральному середовищі Ham's F-12 (середовище Хема F-12) з додаванням 1 мМ L-глутаміну, 10 % FBS і антибіотиків. Культивування клітин усіх ліній проводили в культуральних флаконах BD Falcon™ площею 25 або 75 см<sup>2</sup>.

Перевірку цитотоксичності лікарських препаратів виконували із застосуванням 96-лункових культуральних планшетів BD Falcon™ для адгезивних клітин (Becton Dickinson Labware). У ці планшети висівали клітини в концентрації  $8 \times 10^3$  клітин/лунка для клітин MDA-MB-231,  $10 \times 10^3$  клітин/лунка для клітин SKOV-3 або  $6 \times 10^3$  клітин/лунка для клітин A549 в об'ємі 200 мкл/лунка. І флакони, і культуральні планшети інкубували для росту клітин при 37 °C у зволоженій атмосфері, що складається на 95 % з повітря й на 5 % з CO<sub>2</sub>.

Клітинні культури в культуральних планшетах залишали прикріплюватись до поверхні протягом 24-годинної інкубації. На 1 день після посіву клітин 4 мкл розчинів складів, що підлягають перевірці, з різними концентраціями в підходящих розчинниках, додавали в лунки з культурами (експерименти по встановленню залежності між дозою й ефектом). У контрольні культури додавали 4 мкл розчинників як контролю ефекту розчинника. Клітини інкубували протягом 2-4 послідовних днів. Наприкінці періоду інкубації адгезивні клітини відокремлювали від поверхні обробкою трипсином, і число життєздатних клітин підраховували із застосуванням тесту, ґрунтованого на фарбуванні клітин барвником трипановим синім, і гемоцитометра. Усі експерименти проводили принаймні три рази, і дані одержували із середнього значення з трьох визначень, кожне з яких виконували в чотирьох повтореннях. Результати виражали як середнє число клітин  $\pm$  середньоквадратична помилка (SE), і відмінності між контрольними й дослідними серіями оцінювали за допомогою t-тесту Стюдента. Цитотоксичність лікарських препаратів оцінювали на підставі ступеню інгібування росту клітин. Інгібування росту клітин дослідними лікарськими препаратами розраховували із застосуванням наступної формули:

$$\text{інгібування росту клітин \%} = \frac{\text{Контроль} - \text{Дослідна серія}}{\text{Контроль}} \times 100$$

У контрольних серіях 4 мкл різних розчинників, застосовуваних для перевірки лікарських препаратів, додавали до культур як негативні контролю розчинників. Відмінності між цими контрольними серіями були незначними; таким чином, середню величину негативних контролів застосовували для розрахунків.

Розчини непатентованих сполук, таких як гідрохлорид доксорубіцину, дигідрохлорид мітоксантрона, гідрохлорид топотекана і т.д., а також їх комерційні препарати, застосовували як позитивні контролю. Відмінності в інгбуванні росту цими лікарськими засобами в різних розчинниках були незначними; таким чином, середню величину інгібування позитивними контролями застосовували для розрахунків.

Середні значення концентрацій препаратів, що викликає 50 %-е інгібування росту клітин, (IC<sub>50</sub>)  $\pm$  SE обчислювали на підставі результатів принаймні трьох незалежних експериментів.

Фактори посилення (EF) розраховували шляхом розподілу IC<sub>50</sub> контрольного лікарського препарату порівняння на IC<sub>50</sub> складу згідно з корисною моделлю.

#### Приклад 1

Перетворення гідрохлориду доксорубіцину у депротоновану форму  
20 мг гідрохлориду доксорубіцину (0,034 ммоль), який розчинний у воді в кількості, що перевищує 25 мг/мл, розчинили в 10 мл води. До розчину додали при перемішуванні 3,4 мл розчину гідроксида натрію (0,01 М). Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, й осад перемішали з 10 мл води із ще одним наступним центрифугуванням. Після трьох додаткових процедур промивання, описаних вище, супернатант профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність доксорубіцину у формі аміну, виміряна за допомогою методу

спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 495 нм, дорівнювала 0,015 мг/мл.

#### Приклад 2

Перетворення дигідрохлориду мітоксантрону в депротоновану форму

- 5 26 мг дигідрохлориду мітоксантрону (0,05 ммоль) розчинили в 10 мл води. До розчину додали при перемішуванні 10 мл розчину гідроксиду натрію (0,01 М). Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, і осад перемішали за допомогою струшування з 10 мл води із ще одним наступним центрифугуванням. Після трьох додаткових
- 10 процедур промивання, описаних вище, супернатант профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність мітоксантрону у формі аміну, обмірювана за допомогою методу спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 660 нм, дорівнювала 0,03 мг/мл.

#### Приклад 3

- 15 Перетворення гідрохлориду топотекану в депротоновану форму

23 мг гідрохлориду топотекану (0,05 ммоль) розчинили в 10 мл води. До розчину додали при перемішуванні 5 мл розчину гідроксиду натрію (0,01 М). Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, і осад перемішали з 10 мл води із ще одним наступним центрифугуванням. Після трьох додаткових процедур промивання, описаних вище, супернатант профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність топотекану у формі аміну, виміряна за допомогою методу спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 385 нм, дорівнювала 0,09 мг/мл.

- 25 Приклад 4

Утворення частинок, що складаються із доксорубіцину в протонованій формі й метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти в депротонованій формі

- Водні розчини натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (2 мл, 5 мг/мл) і гідрохлориду доксорубіцину (6 мл, 2 мг/мл) змішали в пробірці об'ємом
- 30 10 мл. Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, і осад перемішали за допомогою струшування з 10 мл води із ще одним наступним центрифугуванням. Після трьох додаткових процедур промивання, описаних вище, супернатант профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність отриманих частинок, обмірювана за допомогою методу
- 35 спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 350 нм, дорівнювала 0,0002 мг/мл.

#### Приклад 5

- 40 Утворення частинок, що складаються із мітоксантрону в дипротонованій формі й двох еквівалентів метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти в депротонованій формі

- Водні розчини натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (2 мл, 5 мг/мл) і дигідрохлориду мітоксантрону (5,2 мл, 1 мг/мл) змішали в пробірці об'ємом 10 мл. Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за
- 45 допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, і осад перемішали за допомогою струшування з 10 мл води із ще одним наступним центрифугуванням. Після трьох додаткових процедур промивання, описаних вище, супернатант профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність отриманих частинок, обмірювана за допомогою методу
- 50 спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 660 нм, дорівнювала 0,002 мг/мл.

#### Приклад 6

Утворення частинок, що складаються з топотекану в протонованій формі й метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти в депротонованій формі

- Водні розчини натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (2 мл, 5 мг/мл) і гідрохлориду топотекану (4,7 мл, 2 мг/мл) змішали в пробірці об'ємом 10 мл. Під час перемішування з'явився дрібнодисперсний осад. Осад відокремили за допомогою центрифугування пробірки при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант вилучили, і осад перемішали за допомогою струшування з 10 мл води із ще одним наступним
- 60 центрифугуванням. Після трьох додаткових процедур промивання, описаних вище, супернатант



профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм для видалення можливих великих агрегатів продукту. Розчинність отриманих частинок, обмірювана за допомогою методу спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях при довжині хвилі 364 нм, дорівнювала 0,024 мг/мл.

5      Приклад 7

Одержання складу на основі доксорубіцину з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й натрієвою сіллю метилового ефіру 13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти

10      50 мл розчину гідрохлориду доксорубіцину (8,6 мг/мл) додали краплями при перемішуванні до 200 мл розчину, що містить натрієву сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (3 мг/мл) і натрієву сіль метилового ефіру 13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти (3 мг/мл) у круглодонній колбі об'ємом 500 мл. Перемішування продовжували протягом додаткових 20 хв. Концентрація доксорубіцину в отриманому складі дорівнювала 1,6 мг/мл. Отриманий розчин профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм і висушили сублімацією. Фільтрування не призвело до зменшення концентрації доксорубіцину.

15      Приклад 8

Одержання складу на основі топотекану з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти

20      Метанольні стокові розчини гідрохлориду топотекану (120 мл, 1,09 мг/мл) і натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (32 мл, 15 мг/мл) змішали в круглодонній колбі об'ємом 500 мл і упарили під вакуумом. До залишку, отриманого після розпарювання, додали 120 мл розчину хлориду натрію (9 мг/мл), і суміш перемішували, доки вона не стала чистою й прозорою (приблизно 20 хв.). Концентрація топотекану в отриманому розчині дорівнювала 1 мг/мл, що відповідало концентрації гідрохлориду топотекану 1,09 мг/мл. Отриманий розчин профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм. Фільтрування не призвело до зменшення концентрації топотекану.

25      Приклад 9

Одержання складу на основі іринотекану з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти

30      Метанольні стокові розчини тригідрату гідрохлориду іринотекану (100 мл, 1,15 мг/мл) і натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти (27 мл, 15 мг/мл) змішали в круглодонній колбі об'ємом 500 мл і упарили під вакуумом. До залишку, отриманого після розпарювання, додали 100 мл води, і суміш перемішували, доки вона не стала чистою й прозорою (приблизно 30 хв.). Концентрація іринотекану в отриманому розчині дорівнювала 1 мг/мл, що відповідало концентрації тригідрату гідрохлориду іринотекану 1,15 мг/мл. Отриманий розчин профільтрували через фільтр із діаметром пор 0,2 мм і висушили сублімацією. Фільтрування не призвело до зменшення концентрації іринотекану.

35      Приклад 10

40      Дослідження залежності розміру частинок, утворених натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти й гідрохлоридом доксорубіцину (співвідношення мас./мас. = 2,3:1), від концентрації доксорубіцину

45      Розчини були отримані шляхом відновлення висушених сублімацією зразків, що складаються із суміші натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти й доксорубіцину в співвідношенні мас./мас., що становить 2,3:1, у водному розчині, що містить NaCl (130 ммоль), CaCl<sub>2</sub> (2 ммоль) і MgCl<sub>2</sub> (0,8 ммоль).

Таблиця 1

Концентрація доксорубіцину, мг/мл	Середній розмір частинки, нм	Станд. відх.
0,004	31,7	1,2
0,1	31,3	1,7
0,3	40,7	1,2
1	55,7	1,7
3	69,0	4,3

50      Як показано в Таблиці 1 і на Фіг. 2, зниження концентрації призводить до зменшення розміру частинок у діапазоні концентрацій, що становить 0,1-3 мг/мл. Подальше розведення не впливає на розмір частинок.

Приклад 11

## Дослідження кінетики розчинення частинок

Вихідний розчин одержували шляхом розчинення висушеного сублімацією зразка суміші натрієвої солі метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й гідрохлориду доксорубіцину в співвідношенні мас./мас., що становить 2,1:1, у водному розчині NaCl (5,9 мг/мл), KCl (0,3 мг/мл), CaCl<sub>2</sub> (0,295 мг/мл), гексагідрату MgCl<sub>2</sub> (0,2 мг/мл) і ацетату натрію (4,1 мг/мл) з одержанням концентрації доксорубіцину, рівної 2 мг/мл. Вихідний розчин розбавили у 50 разів до концентрації доксорубіцину, що становить 0,04 мг/мл, отриманий розчин інтенсивно перемішали за допомогою пристрою для перемішування Вортекс протягом 10 секунд і застосовували напряму для вимірів середнього розміру частинок.

Таблиця 2

Час після розведення, хв.	Середній розмір частинки, нм	Станд. відх.
1,5	61,1	5,9
2	50,0	3,3
3	42,7	2,6
7	40,3	3,3
20	40,7	2,5
60	34,6	2,1
120	31,3	0,9
300	30,9	1,6

Як показано в Таблиці 2 і на Фіг. 3, швидкість зменшення розміру частинок знижується згодом, доки не утворюються майже нерозчинні частинки.

## Оцінка біологічної активності - Приклади 12-15

Експерименти *in vitro* із застосуванням різних ліній злоякісних клітин, таких як клітини аденокарциноми молочної залози, аденокарциноми яєчників і недрібноклітинного раку легенів, показали, що активність складів на основі катіонних амфіфільних сполук значно залежить від природи протионів, а також морфології наночастинок. Застосування метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацій зменшує розчинність катіонних амфіфільних сполук, що полегшує транспорт сполучення через клітинні мембрани, і в результаті активність таких складів збільшується.

Наступні комерційні препарати були застосовані як еталонні у нижченаведених Прикладах: Доксил (DOXIL®) (гідрохлорид доксорубіцину, введений до складу пегільованих ліпосом), Новантрон (NOVANTRONE®) (гідрохлорид мітоксантрону), Адріаміцин (ADRIAMYCIN®) (гідрохлорид доксорубіцину), Гикамтін (HYCAMTIN®) (гідрохлорид топотекану) і Кампто (CAMPTO®) (гідрохлорид іринотекану).

## Приклад 12

Порівняльна оцінка цитотоксичності складів у культурах клітин лінії MDA-MB-231 аденокарциноми молочної залози людини

Склади, що містять суміші наночастинок метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти, були отримані шляхом розчинення висушеного сублімацією порошку в підходящих водних розчинах. Розведення комерційних препаратів були виконані відповідно до інструкцій виробників. Результати представлено в Таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Склад	Розчинник	Розмір частинки, нм	IC <sub>50</sub> день 3	EF день 3	IC <sub>50</sub> день 4	EF день 4
Адріаміцин (ADRIAMYCIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(1,9±0,13) 10 <sup>-7</sup>	-	(5,1±0,17) 10 <sup>-8</sup>	-
Доксил (DOXIL®)	50 мг/мл глюкози	100	(2,3±0,15) 10 <sup>-6</sup>	0,08 <sup>a</sup>	(2,8±0,10) 10 <sup>-7</sup>	0,18 <sup>a</sup>
Доксорубіцин - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:1,1:1,1 (мас./мас./мас.)	9 мг/мл NaCl	34	(2,0±0,17) 10 <sup>-8</sup>	9,5 <sup>a</sup>	(1,4±0,07) 10 <sup>-8</sup>	3,6 <sup>a</sup>
Новантрон (NOVANTRONE®)	50 мг/мл глюкози	-	(7,5±0,38) 10 <sup>-8</sup>	-	(5,1±0,21) 10 <sup>-9</sup>	-
Мітоксантрон - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	50 мг/мл глюкози	-	(8,1±0,29) 10 <sup>-9</sup>	9,3 <sup>b</sup>	(2,0±0,12) 10 <sup>-9</sup>	2,6 <sup>b</sup>
Гікамтін (HYCAMTIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(9,2±1,4) 10 <sup>-7</sup>	-	(4,4±0,33) 10 <sup>-8</sup>	-
Топотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрата CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактата натрію	14	(1,7±0,12) 10 <sup>-7</sup>	5,4 <sup>c</sup>	(1,4±0,19) 10 <sup>-8</sup>	3,1 <sup>c</sup>
Кампто (CAMPTO®)	9 мг/мл NaCl	-	(3,0±0,09) 10 <sup>-5</sup>	-	(3,2±0,10) 10 <sup>-6</sup>	-
Іринотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрату CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактату натрію	12	(8,1±0,19) 10 <sup>-6</sup>	3,7 <sup>d</sup>	(1,9±0,11) 10 <sup>-6</sup>	1,7 <sup>d</sup>

Фактори посилення були обчислені в порівнянні із препаратами: aadriamycin®, bnovantrone®, chycamtin® і dcampto®.

## Приклад 13

Порівняльна оцінка цитотоксичності складів у культурах клітин лінії SKOV-3 аденокарциноми яєчників людини

5 Склади, що містять суміші наночастинок метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти, були отримані шляхом розчинення висушеного сублімацією порошку в підходящих водних розчинах. Розведення комерційних препаратів були виконані відповідно до інструкцій виробників. Результати представлено в Таблиці 4 нижче.

Таблиця 4

Склад	Розчинник	Розмір частинки, нм	IC <sub>50</sub> день 3	EF день 3	IC <sub>50</sub> день 4	EF день 4
Адріаміцин (ADRIAMYCIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(8,5±0,27) 10-8	-	(4,8±0,16) 10-8	-
Доксил (DOXIL®)	50 мг/мл глюкози	100	(4,8±0,18) 10-6	0,02 <sup>a</sup>	(8,0±0,27) 10-7	0,06 <sup>a</sup>
Доксорубіцин - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:1,1:1,1 (мас./мас./мас.)	9 мг/мл NaCl	34	(5,2±0,25) 10-8	1,6 <sup>a</sup>	(2,8±0,1) 10-8	1,7 <sup>a</sup>
Новантрон (NOVANTRONE®)	50 мг/мл глюкози	-	(9,6±0,45) 10-8	-	(1,8±0,32) 10-9	-
Мітоксантрон - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	50 мг/мл глюкози	-	(2,0±0,09) 10-9	4,8 <sup>b</sup>	(9,2±0,12) 10-10	2,0 <sup>b</sup>
Гикамтін (HYCAMTIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(3,5±0,42) 10-5	-	(1,0±0,27) 10-6	-
Топотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрату CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактату натрію	14	(5,0±0,22) 10-7	70 <sup>c</sup>	(2,1±0,08) 10-8	48 <sup>c</sup>
Кампто (CAMPTO®)	9 мг/мл NaCl	-	(4,2±0,18) 10-5	-	(4,0±0,19) 10-5	-

10

Продовження таблиці 4

Склад	Розчинник	Розмір частинки, нм	IC <sub>50</sub> день 3	EF день 3	IC <sub>50</sub> день 4	EF день 4
Іринотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрату CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактату натрію	12	(1,2±0,09) 10-5	3,5 <sup>d</sup>	(4,2±0,27) 10-6	9,5 <sup>d</sup>

Фактори посилення були обчислені в порівнянні із препаратами: aadriamycin®, bnovantrone®, chycamtin® і dcampcto®.

## Приклад 14

Порівняльна оцінка цитотоксичності складів у культурах клітин лінії A549 недрібноклітинного раку легенів людини

Склади, що містять суміші наночастинок метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти й метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти були отримані шляхом розчинення висушеного сублімацією порошку в підходящих водних розчинах. Розведення комерційних препаратів були виконані відповідно до інструкцій виробників. Результати представлено в Таблиці 5 нижче.

Таблиця 5

Склад	Розчинник	Розмір частинки, нм	IC <sub>50</sub> день 3	EF день 3	IC <sub>50</sub> день 4	EF день 4
Адріаміцин (ADRIAMYCIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(1,2±0,09) 10-8	-	(2,7±0,21) 10-8	-
Доксил (DOXIL®)	50 мг/мл глюкози	100	(1,9±0,18) 10-7	0,06 <sup>a</sup>	(1,4±0,08) 10-7	0,19 <sup>a</sup>
Доксорубіцин - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:1,1:1,1 (мас./мас./мас.)	9 мг/мл NaCl	34	(2,6±0,15) 10-9	4,6 <sup>a</sup>	(6,2±0,15) 10-9	4,4 <sup>a</sup>
Новантрон (NOVANTRONE®)	50 мг/мл глюкози	-	(2,1±0,06) 10-9	-	(1,1±0,02) 10-9	-
Мітоксантрон - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	50 мг/мл глюкози	-	(9,0±0,34) 10-10	2,3 <sup>b</sup>	(3,7±0,09) 10-10	3,0 <sup>b</sup>
Гикамтін (HYCAMTIN®)	9 мг/мл NaCl	-	(2,6±0,21) 10-6	-	(7,3±0,33) 10-7	-

Продовження таблиці 5

Склад	Розчинник	Розмір частинки, нм	IC <sub>50</sub> день 3	EF день 3	IC <sub>50</sub> день 4	EF день 4
Топотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрату CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактату натрію	14	(7,2±0,22) 10 <sup>-7</sup>	3,6 <sup>c</sup>	(1,0±0,05) 10 <sup>-7</sup>	7,3 <sup>c</sup>
Кампто (CAMPTO®)	9 мг/мл NaCl	-	(2,5±0,26) 10 <sup>-5</sup>	-	(8,5±0,36) 10 <sup>-6</sup>	-
Іринотекан - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти 1:3,4:3,4 (мас./мас./мас.)	6 мг/мл NaCl, 0,3 мг/мл KCl, гексагідрат хлориду кальцію 0,4 мг/мл дигідрату CaCl <sub>2</sub> , 3,1 мг/мл лактату натрію	12	(7,8±0,53) 10 <sup>-6</sup>	3,2 <sup>d</sup>	(6,7±0,29) 10 <sup>-7</sup>	12,7 <sup>d</sup>

Фактори посилення були обчислені в порівнянні із препаратами: aadriamycin®, bnovantrone®, chycamtin® і dcampto®.

#### Приклад 15

Дослідження токсичності складу "Доксорубіцин - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти (мас./мас./мас. = 1:1,05:1,05)" на пацюках протягом одного місяця

Досліджуваний склад був отриманий шляхом відновлення в сольовому розчині висушеною сублімацією суміші доксорубіцин - натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти.

Експеримент проводили на 58 самцях і 58 самках безпатогенних пацюків лінії Wistar SPF виду Hantac:WH (GALAS). Тварини були розподілені по 4 групах: Групі 1 (0,9 %-ний сольовий розчин), Групі 2 (Доксорубіцин у дозі 6 мг/кг), Групі 3 (зазначений у заголовку склад у дозі 4 мг/кг) і Групі 4 (зазначений у заголовку склад у дозі 6 мг/кг). Пацюки із Групи 2 одержували таке ж дозування доксорубіцина, як і пацюка із Групи 4. і виступали як позитивний контроль для прямого зіставлення із Групою 4. Обробку пацюків препаратами здійснювали шляхом внутрішньовенної ін'єкції один раз на тиждень. Оскільки у пацюків із Груп 2 і 4 після введення 3 доз (після введення доз на дні 1, 8 і 15) були помічені несприятливі клінічні ознаки, пов'язані із жорсткою проведеною терапією, жодним тваринам не вводили препарати на день 22, але відновили введення доз на день 29. Після поновлення, введення дози на день 29 призвело до виникнення нестерпних клінічних ознак, і, оскільки дослідники дійшли висновку про необхідність евтаназії декількох тварин, було ухвалене рішення про передчасне припинення експерименту на день 33 для пацюків із Груп 2 і 4. Пацюки із Груп 1 і 3 отримали п'яту дозу на день 36, і експеримент був припинений на день 39. Клінічні ознаки, масу тіла, споживання їжі, результати

офтальмоскопічного обстеження, лабораторної діагностики, аналізу сечі, мікроскопічного дослідження сечі, показники кісткового мозку, дані по масі органів, результати макроскопічних і мікроскопічних досліджень застосовували як критерії для виявлення будь-яких несприятливих побічних ефектів. Крім того, збирали зразки крові для токсикокінетичного аналізу на день 1.

Внутрішньовенне введення зазначеного в заголовку складу в дозах 4 або 6 мг/кг/день один раз у тиждень для 5 і 4 повторних доз, відповідно, обумовило одержання пов'язаних із жорсткою проведеною терапією результатів клінічних спостережень, реєстрацій маси тіла, реєстрацій споживання їжі, гематологічного, клінічного й біохімічного аналізу, показників кісткового мозку, вимірів маси органів і гістопатологічних досліджень. Результати токсикологічного аналізу після повторних доз були очікуваними для досліджених цитостатичних препаратів, що містять доксорубіцин. Декілька тварин були піддані евтаназії в кожній із Груп 2, 3 і 4 внаслідок появи клінічних ознак, пов'язаних із жорсткою проведеною терапією. Крім того, було виявлено по одній загиблій тварині в кожній із Груп 2 і 4. Виразне зменшення маси тіла й менше збільшення в масі тіла спостерігали для пацюків із усіх груп, оброблюваних зазначеним у заголовку складом і доксорубіцином, у порівнянні з контрольними тваринами. Профіль токсичності зазначеного в заголовку складу був схожим на профіль Доксорубіцина за винятком того, що ознаки, такі як сильна сверблячка й почісування навколо шиї (включаючи рани, нанесені тваринами самим собі), проявлялися в більш важкій формі для позитивних контролів із Групи 2. Також серйозною ознакою токсичності була заповнена рідиною черевна порожнина, яку спостерігали тільки для позитивних контролів із Групи 2.

Цей приклад демонструє, що склад на основі наночастинок "Доксорубіцин-натрієва сіль метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти - натрієва сіль метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти (мас./мас./мас. = 1:1,05:1,05)" має меншу токсичність у порівнянні із ідентичними концентраціями традиційного препарату Доксорубіцин.

Незважаючи на те, що корисна модель була описана у відношенні деяких варіантів реалізації, включаючи переважний варіант, відомий у цей час винахідникам, слід розуміти, що різні зміни й модифікації, що повинно бути очевидним для середнього фахівця в даній галузі техніки, можуть бути зроблені без виходу за рамки корисної моделі, зазначені в доданій до даної заявки формулі корисної моделі.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Фармацевтична композиція, що містить

- фармацевтично прийнятний носій; і

- систему доставки лікарських засобів для введення фармацевтично активної речовини, яка сама по собі є катіонною амфіфільною речовиною й має розчинність *per se* у воді принаймні 4 мг/мл, при цьому система доставки лікарських засобів містить наночастинок, що мають розчинність у воді менше 0,1 мг/мл, причому зазначені наночастинок утворені зазначеною речовиною в комбінації з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією;

- при цьому зазначена фармацевтична композиція може бути отримана за способом, згідно з яким зазначену систему доставки лікарських засобів поєднують із кількістю, рівною приблизно 0,5-5 еквівалентів, з розрахунку на заряд катіона амфіфільної речовини, що міститься в системі доставки лікарських засобів, метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвої солі метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінації.

2. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначені наночастинок мають розчинність у воді менше 0,01 мг/мл.

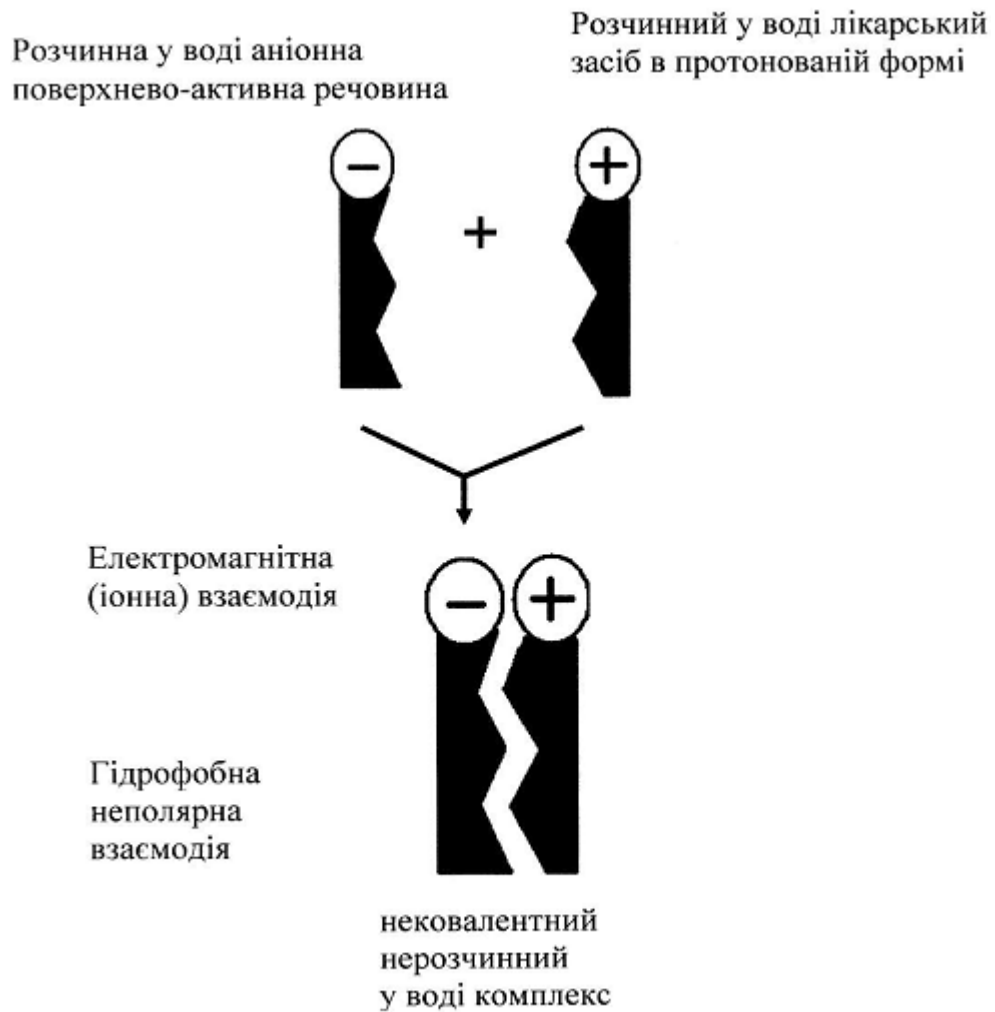
3. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена речовина нековалентно пов'язана з натрієвою сіллю метилового ефіру N-повністю-транс-ретиноїлцистеїнової кислоти, натрієвою сіллю метилового ефіру N-13-цис-ретиноїлцистеїнової кислоти або їх комбінацією.

4. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена речовина являє собою цитотоксичну або цитостатичну сполуку.

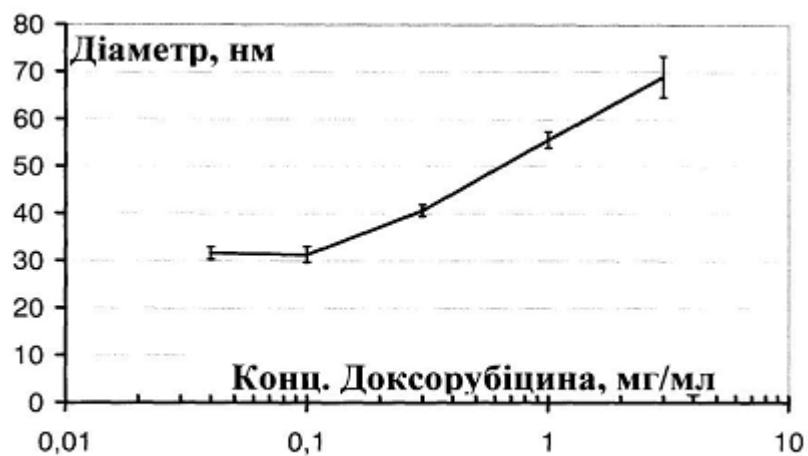
5. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена цитотоксична або цитостатична сполука являє собою протоновану форму доксорубіцину, мітоксантрону, епірубіцину, даунорубіцину, ідарубіцину, топотекану, іринотекану, вінбластину, вінкрістину, вінорелбіну, амсакрину, прокарбазину, мехлоретаміну або їх комбінації.

6. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена сполука являє собою протоновану форму доксорубіцину.

7. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначена сполука являє собою протоновану форму мітоксантрону.

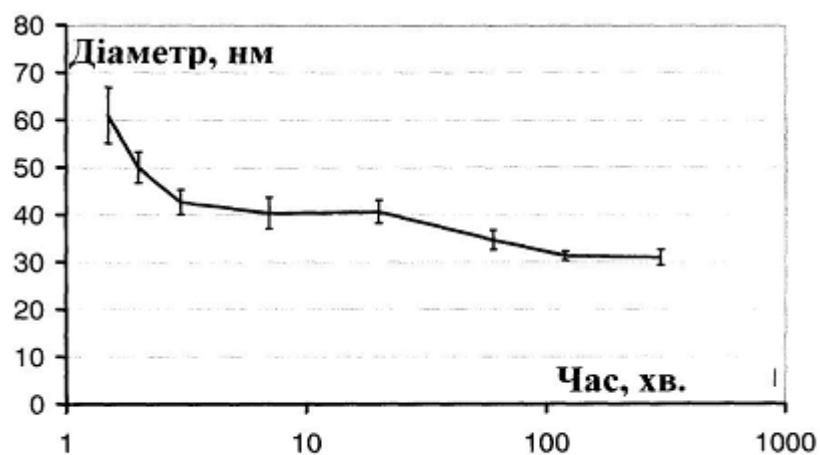


Фіг. 1

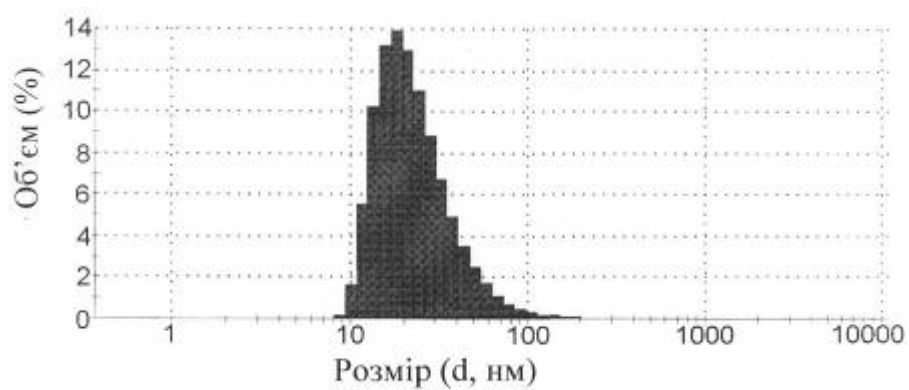


Фіг. 2





Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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