



(51) МПК
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61J 3/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2012100222/15**, **10.01.2012**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **10.01.2012**

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2013** Бюл. № 20

(45) Опубликовано: **27.12.2013** Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **RU 2357724 C1**, **10.06.2009**. **RU 2411935**
C1, **20.02.2011**. **ИПАТОВА О.М.**

**«Фосфоглив: механизм действия и
 применение в клинике» Москва, 2005**
[онлайн]. МАШКОВСКИЙ М.Д.
Лекарственные средства, т.2. - М., 2001.

Адрес для переписки:

**634050, г.Томск, пр. Ленина, 2а, ФТИ,
 ОПОРИД**

(72) Автор(ы):

**Антипов Сергей Анатольевич (RU),
 Федущак Таисия Александровна (RU),
 Хлусов Игорь Альбертович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной
 ответственностью "СибПрофСтандарт" (RU)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЛИПИДНОГО КОМПОЗИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения магнито чувствительного липидного композита. Заявленный способ включает приготовление лекарственного средства, состоящего из цисплатина, источника фосфолипидов и носителя магнитных свойств, представляющего собой наночастицы железа в пироуглеродной оболочке, с последующим воздействием ультразвука. В качестве

источника фосфолипидов используют фармакопейный препарат «Фосфоглив», при этом композит получают в мицеллярной форме. Технический результат заявленного изобретения заключается в обеспечении однородности и термодинамической устойчивости композита, получаемого за оптимально короткое время без применения органических растворителей. 1 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)*A61K 9/51* (2006.01)*A61K 33/26* (2006.01)*A61J 3/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012100222/15, 10.01.2012**(24) Effective date for property rights:
10.01.2012

Priority:

(22) Date of filing: **10.01.2012**(43) Application published: **20.07.2013 Bull. 20**(45) Date of publication: **27.12.2013 Bull. 36**

Mail address:

634050, g.Tomsk, pr. Lenina, 2a, FTI, OPORID

(72) Inventor(s):

**Antipov Sergej Anatol'evich (RU),
Fedushchak Taisija Aleksandrovna (RU),
Khlusov Igor' Al'bertovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvenost'ju
"SibProfStandart" (RU)****(54) METHOD FOR PREPARING MAGNET-SENSITIVE LIPID COMPOSITE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to a method for preparing a magnet-sensitive lipid composition. The declared method involves preparing a therapeutic agent containing cisplatin, a source of phospholipids and a magnetism carrier representing pirocarbon-coated ferric nanoparticles to be exposed to UV

radiation. The above phospholipid source is the pharmacopeial drug 'Phosphogliv' with the composite prepared in the micellar form.

EFFECT: providing the uniformity and thermodynamic stability of the composite prepared over a short optimum period of time with using no organic solvents.

1 dwg, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности онкологии, генной инженерии, биохимии и касается способов получения магниточувствительных липидных композитов, содержащих лекарственное средство и наноразмерный порошок металла, которые характеризуются пролонгированным высвобождением компонентов.

Одним из наиболее старых методов лечения злокачественных опухолей является биотерапия - метод лечения рака путем активизации естественных защитных механизмов или введения естественных полимерных молекул и антигенов [Моисеенко В.М. Биотерапия солидных опухолей // Вопросы онкологии. - 1998. - Т.44. - №1. - С.120-127], который включает, главным образом, иммунотерапию [Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Хансон К.И. Вакциноterapia злокачественных опухолей // Вопросы онкологии. - 1999. - Т.45. - №3. - С.327-332]. В настоящее время интерес к наполовину забытому способу [Моисеенко В.М. Биотерапия солидных опухолей // Вопросы онкологии. - 1998. - Т.44. - №1. - С.120-127] снова возрос по причине недостаточной эффективности существующих методов терапии при запущенных формах онкологических заболеваний. Другим объяснением является вторичный иммунодефицит, характерный для онкологических пациентов [Aloysius M.M., Takhar A., Robins A., Eremin O. Dendritic cell biology, dysfunction and immunotherapy in gastrointestinal cancers // Surgeon. - 2006. - Vol.4. - N 4. - P.195-210], и проявляющийся в снижении морфофункциональной активности Т-лимфоцитов, НК-клеток, системы мононуклеарных фагоцитов, лимфокинактивированных киллерных (ЛЯК) клеток и других элементов, отвечающих за развитие противоопухолевой защиты. Большинство существующих в настоящее время методов лечения онкологических заболеваний (облучение, химиотерапия, массивные оперативные вмешательства) также индуцируют клеточную иммуносупрессию [Aloysius M.M., Takhar A., Robins A., Eremin O. Dendritic cell biology, dysfunction and immunotherapy in gastrointestinal cancers // Surgeon. - 2006. - Vol.4. - N 4. - P.195-210]. Одним из сложных и нерешенных вопросов противоопухолевой терапии является создание терапевтически эффективных локальных концентраций препаратов, регуляторных молекул и активированных иммунокомпетентных клеток непосредственно в опухолевой ткани. Современные биотерапевтические подходы к системному и регионарному лечению онкологических заболеваний предполагают реализацию "адресной" доставки фармацевтических веществ за счет привлечения наноразмерных носителей - полимерных и металлических наночастиц, липосом, ниосом, мицеллий, квантовых точек, дендримеров, микрокапсул, клеток, микрочастиц твердых жиров, липопротеинов и различных наносборок [V.P. Torchilin. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging // The AAPS Journal 2007; 9 (2) Article 15].

Значительное распространение получили липосомальные системы доставки лекарств и биологических молекул, которые разрабатываются с 80-х годов XX века [Биологические методы лечения онкологических заболеваний: Пер. с англ. / Под ред. В.Т. Де Вита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. -М.: Медицина, 2002. - 936 с.], содержащие цитостатические препараты, которые перспективны с точки зрения понижения системной токсичности и так называемого "пассивного нацеливания" в опухолевую ткань [Е.Е. Толчева, Н.А. Оборотова. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. №1. Т.5. 2006. с.54-61].

Описан способ изготовления липосомальных систем на основе высокоочищенного яичного лецитина, фосфолипидов растительного и животного происхождения

[Бабицкая С.В., Жукова М.В., Кисель М.А. и др. Инкапсулирование доксорубина в липосомы, содержащие фосфатидилэтанол. Влияние на токсичность и накопление антибиотика в миокарде. Химико-фарм. журнал, 2006, №3, с.36-38.]

5 Включение в состав липосом наноразмерных ферромагнетиков позволяет получить их магнитоуправляемые формы [Исмаилова Г.К., Ефременко Е.И., Курегян А.Г. Биотехнология получения магнитоуправляемых липосом. // Химико-фармацевтический журнал. Т.39. №7. 2005. С.47-49; Niroo Nobuto etc. Evolutions of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin a dipole external electromagnet. Int. J. Cancer. 109. 2004. P.627-635].

10 Известны липосомальные системы, в которых носителями магнитных свойств служат наноразмерные порошки железа или его оксиды [Галанов А.И., Юрмазова Т.А., Савельев Г.Г., Булдаков М.А., Ю.В. Рудык, Н.В. Литвяков, К.А. Нечаев, С.А. Тузиков, Н.В. Чердынцева, Н.А. Яворовский. Разработка магнитоуправляемой системы для доставки химиопрепаратов на основе наноразмерных частиц железа // Сибирский онкологический журнал. - 2008. - №3. - С.50-57; Babincova M, Cicmanec P, Altanerova V, Altaner C, Babinec P. AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. Bioelectrochemistry. 2002; V.55; Issue 1-2; p.17-19].

20 Однако установлено, что наночастицы и нанопорошки металлов характеризуются высокой реакционной способностью и каталитической активностью [Сергеев Г.Б. Нанохимия. М, МГУ. 2003. с.287].

25 В соответствии с выводами целого ряда авторов, такого рода наноферромагнетики обладают собственной токсичностью относительно клеток, тканей и компонентов биологических жидкостей [Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // Environ Health Perspect. 2005. 113(7): 823-839], обусловленной их участием в свободнорадикальных процессах [Лысцов В.Н., Мурзин Н.В. Проблемы безопасности нанотехнологий. -М.: МИФИ, 2007. - 70 с.].

30 Наряду с липосомальными транспортными системами, описаны не менее эффективные и более простые в приготовлении, магнитные жидкости на основе мицеллярных растворов биополимеров, лекарственных веществ и наноферромагнетиков, фармакологическая активность которых также является предметом пристального внимания исследователей [Wang J, Mongayt D, Torchilin VP. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. // J Drug Target. 2005; 13: 73-80].

40 Мицеллярные растворы - это коллоидные дисперсии водно-липидного или иного состава с размером частиц от 5 нм до 100 нм. Важным их свойством является способность повышать растворимость и биодоступность низко растворимых фармацевтических препаратов. Вследствие малой величины, мицеллии, как и липосомы, 45 демонстрируют спонтанное проникновение в интерстициум участков тела в протекающей сосудистой сети (опухоли и инфаркты). Для мицеллярных систем, также, как и для липосом, реализуется эффект повышенной проницаемости и удержания, за счет которого реализуется селективная доставка по механизму «пассивного нацеливания» [Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Control Release. 2000; 65: с.271-284]. Неоднократно было показано, что противораковые лекарства, инкорпорированные в мицеллии, такие как адриамицин [Kwon GS, Kataoka K. Block copolymer micelles as long-

circulating drag vehicles. Adv Drug Deliv Rev. 1995; 16: с.295-309] лучше накапливается в опухолях, чем нецелевых тканях, минимизируя, таким образом, токсичность лекарства в отношении нормальной ткани.

5 Для разработки лекарственных препаратов наряду с фосфолипидами животного происхождения признана высокая эффективность и растительных фосфолипидов, содержащих в большом количестве ненасыщенные жирные кислоты [Фассати П., Фассати М., 1971; Lieber C.S. et al., 1985, 1990-1994].

10 Наиболее близким к заявляемому изобретению по составу используемых компонентов является способ получения магниточувствительных липосом, содержащих лекарственное средство [RU 2357724, публ. 10.06.2009 г.], включающий растворение фосфолипидов в хлороформе, добавление носителя магнитных свойств и воздействие ультразвуком, при этом в качестве источника фосфолипидов используют барсучий жир, в качестве носителя магнитных свойств используют ферромагнитный
15 нанопорошок металла, полученный газозольным способом, с размером частиц 2-5 нм, заключенный в углеродную оболочку. Наличие внешней углеродной оболочки, характеризующейся сплошностью и устойчивостью на воздухе до 100°C, позволяет изолировать химически реакционное металлическое ядро от взаимодействия с
20 компонентами биологических жидкостей.

Существенными недостатками известного способа-прототипа являются - трудоемкость и многостадийность приготовления собственно липосомальных систем, необходимость предварительного выделения фосфолипидного концентрата из барсучьего жира, сложность в обеспечении термодинамической устойчивости
25 нанодисперсии, необходимость использования ПАВ и органических растворителей.

Задачей данного изобретения является разработка простого, экспрессного и технологичного способа получения нетоксичных магниточувствительных липидных композитов, обладающих фармакологической активностью.

30 Технический результат заключается в обеспечении однородности и термодинамической устойчивости композита, получаемого за оптимально короткое время без применения органических растворителей, путем простого смешивания компонентов в ультразвуковом поле без дополнительной стерилизации, а так же в повышении терапевтического действия лекарственного средства при использовании
35 получаемого препарата.

Указанный технический результат достигается тем, что в способе получения магниточувствительного липидного композита, включающем, как и прототип, приготовление раствора лекарственного средства с источником фосфолипидов,
40 добавление носителя магнитных свойств, с последующим воздействием ультразвуком, в отличие от прототипа, в качестве источника фосфолипидов используют фармакопейный препарат «Фосфоглив», который растворяют в физрастворе.

В настоящем изобретении представлен способ получения мицеллярного композита, содержащего магнитный носитель, лекарственное средство и фосфолипидный
45 концентрат, который выгодно отличается от известных систем адресной доставки тем, что в качестве источника фосфолипидов берут фармакопейный препарат «Фосфоглив», который содержит экстракт растительных фосфолипидов в сочетании с глицерризиновой кислотой. Глицерризиновая кислота, входящая в его состав является
50 детергентом-эмульгатором, что гарантирует однородность и устойчивость образующейся коллоидной системы.

Фармакопейный препарат "Фосфоглив" содержит в качестве основных биологически активных компонентов растительный фосфатидилхолин (0,50 г) и

тринатриевую соль глицирризиновой кислоты (0,30 г). Известно, что биологическая активность фосфатидилхолина определяется как его собственным действием, так и действием отдельных компонентов. Биологическая роль фосфатидилхолина состоит в том, что он является структурным элементом клеточных мембран, а также важным промотором-регулятором для протекания различных митотических реакций. в качестве субстрата для образования 1,2-диацилглицерола [Siddiqui R.A. et al., 1992; Berg F. et al, 1993]. Фосфатидилхолин лецитин состоит из следующих химических групп: холина, остатка фосфорной кислоты, глицерина и жирных кислот. Каждый из перечисленных компонентов имеет важное биологическое значение. Холин, являясь донором метильных групп, участвует во многих биохимических реакциях, таких как синтез и репарация ДНК, метаболизм витамина В12, фолиевой кислоты, метионина и глутатиона. Органическая фосфорная кислота стимулирует образование макро энергетических связей и необходима для синтеза эндогенных фосфолипидов. 70% жирных кислот в молекуле фосфатидилхолина являются ненасыщенными. Они, обладая большим количеством двойных связей, способствуют окислительному декарбоксилированию и участвуют в синтезе простагландинов.

Вторым компонентом препарата «Фосфоглив» является тринатриевая соль глицирризиновой кислоты, которая содержится в биологически активных веществах корня солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*), произрастающей на территории Средней Азии, и представляет собой тритерпеновый глюкозид, образованный одним остатком глицирретовой кислоты и двумя остатками глюкуроновой кислоты. Анализ литературы показал, что натриевая соль глицирризиновой кислоты, кроме выраженных детергентно-эмульгирующих свойств, обладает высокой биологической активностью, характеризуется антиоксидантным действием и ингибирует процесс образования супероксидного радикала и перекиси водорода.

Изобретение иллюстрируется фиг.1, на которой изображена реакция клеток аденокарциномы Эрлиха и спленоцитов мыши на 24-ч культивирование с липидными композитами, содержащими цисплатин и наночастицы железа в углеродной оболочке по сравнению с липосомальным композитом.

Осуществление способа рассмотрим на примерах конкретного выполнения. Липидный композит готовили на основе фармакопейного препарата "Фосфоглив" (стерильный лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения), который разработан в ИБМХ РАМН, как усовершенствованный аналог выпускаемого фирмой Nattermann International GmbH, Germany препарата «Эссенциале», используемого для лечения заболеваний печени. Стратегия разработки препарата "Фосфоглив" была направлена на снижение токсичности импортного гепатопротекторного препарата. В качестве носителя магнитных свойств были использованы ферромагнитные нанопорошки железа или никеля в пироуглеродной оболочке со среднечисловым размером 2-5 нм, как и по прототипу. В качестве лекарственного средства - цитостатика - был использован Цисплатин - фармакопейный препарат противоопухолевого действия, водный раствор для инъекций, содержащий цис-диаминодихлорплатину и хлористоводородную кислоту.

Пример 1. 8 мл стерильного физраствора для инъекций и 2 мл раствора цитостатика (10%-ный Цисплатин в физрастворе, препарат для инъекций) добавляли шприцом к лиофилизату «Фосфоглива», затем встряхивали. Полученный композит (без ферромагнитного нанопорошка, (3 на фиг.1) готов к немедленному применению или может храниться в течение недели при температуре 8-10°C в холодильнике.

Пример 2. 8 мл стерильного физраствора для инъекций шприцом добавляли к

лиофилизату «Фосфоглива», встряхивали и переливали в стерильный стаканчик, содержащий ферромагнитный нанопорошок в пироуглеродной оболочке и 2 мл раствора цитостатика (10%-ный Цисплатин в физрастворе, препарат для инъекций) и выдерживали в поле ультразвука в течение 3 секунд. Полученный композит (4 на 5 фиг.1) готов к немедленному применению или может храниться в течение недели при температуре 8-10°C в холодильнике.

Сравнительную активность липидного композита по данному изобретению и липосомального композита по прототипу исследовали в условиях *in vitro* в разовой 10 конечной дозе цисплатина, соответствующей по биологическому эффекту 1/10 ЛД50. В качестве клеток-мишеней применяли краткосрочную культуру клеток перевиваемой карциномы Эрлиха и спленоцитов (модель здоровых клеток). Для определения числа жизнеспособных клеток использовали краситель (0,4% раствор трипанового синего) и технику согласно международному стандарту ISO 10993-5.

15 На фиг.1 по оси абсцисс отобразены системы, исследованные *in vitro*: 1 - 0,9% раствор NaCl (физраствор, холостые опыты); 2 - 0,9% раствор NaCl + Цисплатин; 3 - липосомальный композит (по Прототипу) состава: фосфатный буфер + фосфолипидный концентрат из барсучьего жира + Цисплатин + Fe(C); 4 - липидный 20 композит состава: физраствор + «Фосфоглив» + Цисплатин + Fe(C).

Как следует из фиг.1, Цисплатин в дозе 1/10 ЛД50 оказывал *in vitro* примерно одинаковое цитотоксическое (некротическое) действие на здоровые и опухолевые клетки, зафиксированное по увеличению проницаемости их цитоплазматических мембран для красителя (2 на фиг.1.). Использование в аналогичных условиях 25 липосомального композита по прототипу (3 на фиг.1) статистически значимо повышало (более чем на 20%) относительное количество погибших клеток аденокарциномы в сравнении со спленоцитами. В присутствии липидного композита «Фосфоглив» уровень выживаемости клеток аденокарциномы по сравнению с 30 прототипом дополнительно понижается еще на 20%, что свидетельствует о его более высоком цитостатическом эффекте. При этом уровень спленоцитов остается в допустимом диапазоне.

Таким образом, подтверждается более высокая эффективность заявляемого композита по сравнению с прототипом относительно моделей опухолевых и здоровых 35 клеток.

Заявляемый способ получения липидного магниточувствительного композита имеет следующие преимущества.

- Способ отличается простотой технологии приготовления, является 40 одностадийным, предполагает простое смешивание компонентов в ультразвуковом поле с возможностью дальнейшего непосредственного использования липидного композита.

- Роль липидного концентрата выполняет фармакопейный препарат «Фосфоглив», содержащий необходимый набор липидных компонентов.

45 - Не требуется дополнительного использования поверхностно-активного вещества для получения устойчивой нанодисперсии (ПАВ).

- В составе «Фосфоглива» присутствует глицерризиновая кислота, которая выполняет в составе композита функцию детергента-эмульгатора и обеспечивает его 50 термодинамическую устойчивость.

- Предварительная стерилизация нанопорошков, обеспечивающих магнитную чувствительность композита, осуществляется на бетатроне, так что стерилизация собственно композита не требуется.

- Заявляемый способ не требует использования органических растворителей.

Формула изобретения

5 Способ получения магниточувствительного липидного композита, включающий
приготовление лекарственного средства, состоящего из цисплатина, источника
фосфолипидов и носителя магнитных свойств, представляющего собой наночастицы
железа в пироуглеродной оболочке, с последующим воздействием ультразвука,
отличающийся тем, что в качестве источника фосфолипидов используют
10 фармакопейный препарат «Фосфоглив» и композит получают в мицеллярной форме.

15

20

25

30

35

40

45

50



Фиг.1