



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78473** (13) **U**
(51) МПК
H01F 1/28 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
C01G 49/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 08757</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.07.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2013, Бюл.№ 6</p>	<p>(72) Винахідник(и): Патон Борис Євгенович (UA), Горбик Петро Петрович (UA), Петрановська Алла Леонідівна (UA), Турелик Маргарита Петрівна (UA), Абрамов Микола Віталійович (UA), Васильєва Олександра Анатоліївна (UA), Чехун Василь Федорович (UA), Лук'янова Наталія Юріївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕЛЕКТРОЗВАРЮВАННЯ ІМ Є.О. ПАТОНА НАН УКРАЇНИ (ІЕ ім. Є.О. Патона НАНУ), вул. Боженка, 11, м. Київ-650, 03650 (UA), ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМ. О.О. ЧУЙКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ (ІХП ІМ. О.О. ЧУЙКА НАНУ), вул. Генерала Наумова, 17, м. Київ, 03164 (UA), ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ (ІЕПОР ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАНУ), вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)</p>
---	---

(54) МАГНІТНА ПРОТИПУХЛИННА РІДИНА

(57) Реферат:

Магнітна протипухлинна рідина містить магнетит, стабілізатор, розчинник, модифікатор та протипухлинний агент.

UA 78473 U

Корисна модель належить до магнітних рідин, які можуть бути використані у медицині як протипухлинні лікарські засоби для терапії онкозахворювань.

Відома магнітна рідина (див. патент України № 87177, МПК⁷ B82 В 3\00, 2009 р.), яка містить наночастинки магнетиту та розчинник.

5 Сукупними суттєвими ознаками корисної моделі, яка заявляється, та описаного вище аналога є магнетит та розчинник.

Причиною, що перешкоджає аналогу одержання технічного результату корисної моделі, яка заявляється, є недостатні медико-біологічні властивості магнітної рідини, тобто відсутній протипухлинний ефект.

10 Відома магнітна рідина (див. авт. свід. СРСР № 1764087, МПК⁷ H01F 01/28, 1990 р.), яка містить магнетит, стабілізатор та розчинник. Одержували її шляхом співосадження дво- та тривалентних солей заліза та стабілізували амонійною сіллю монододецилового ефіру двоосновної кислоти.

15 Сукупними суттєвими ознаками корисної моделі, яка заявляється, та описаного вище аналога є магнетит та стабілізатор, розчинник.

Причини, що перешкоджають одержанню за аналогом технічного результату корисної моделі, яка заявляється, є недостатня колоїдна стабільність та намагніченість, відсутність протипухлинного ефекту.

20 Відома магнітна рідина (див. патент Росії № 2056067, МПК⁷ H01F 01/28, 20, 1996 р.) найбільш близька за технічним результатом, який досягається, та сукупністю суттєвих ознак, яка включає магнетит, стабілізатор, розчинник.

Сукупними суттєвими ознаками корисної моделі, яка заявляється, та найближчого аналога є магнетит, стабілізатор, розчинник.

25 Причинами, що перешкоджають одержанню технічного результату корисної моделі, яка заявляється, є недостатні медико-біологічні властивості магнітної рідини за аналогом, тобто недостатня біосумісність та недостатня цитотоксична дія магнітної рідини.

30 В основу корисної моделі, яка заявляється, поставлено задачу одержати таку магнітну рідину, яка б у результаті додавання протипухлинного агента мала можливість поліпшити медико-біологічні властивості, а саме підвищити цитотоксичну дію цитостатика та біосумісність магнітної протипухлинної рідини, перешкодити сорбції білків, агрегації наночастинок магнетиту при збереженні магнітних властивостей рідини.

Поставлена задача вирішується тим, що магнітна протипухлинна рідина, яка містить магнетит, стабілізатор та розчинник, згідно з корисною моделлю, додатково містить модифікатор та протипухлинний агент, при наступному співвідношенні компонентів, в мас. %:

магнетит	10-15
стабілізатор	1,0-1,5
модифікатор	1,0-1,5
протипухлинний агент	20-55
розчинник	решта.

35 При цьому як модифікатор беруть поліетиленгліколь і/або гідроксиапатит, як протипухлинний агент беруть цисплатин або доксорубіцин, як стабілізатор беруть олеат натрію, а як розчинник беруть дистильовану воду або фізіологічний розчин.

Наявність у складі магнітної рідини протипухлинного агента, наприклад, цисплатину або доксорубіцину, дозволяє забезпечити цитостатичну дію магнітної рідини.

40 Наявність модифікатора у складі магнітної рідини забезпечує біосумісність та виключає можливість сорбції білків плазми крові.

45 Таким чином, сукупність суттєвих ознак магнітної протипухлинної рідини, яка заявляється, дозволяє поліпшити її медико-біологічні властивості при збереженні магнітних властивостей та спрямовано доставляти її у пухлину живого організму та депонувати за допомогою магнітного поля.

Для одержання магнітної протипухлинної рідини використовували наступні реагенти:

Солі заліза:

Сульфат заліза (II) ГОСТ 4148-78

Хлорид заліза (III) ГОСТ 4147-74

Гідроксид амонію ГОСТ 9-92

Олеат натрію (ол-
Na) Merck Schuchardtohg
(Германія)

Поліетиленгліколь Merck Schuchardtohg
(ПЕГ - 2000) (Германія)

Вода дистильована ГОСТ 6709-72

Фізіологічний розчин	тов. Новофарм-Біосинтез (Україна)
Цисплатин (ЦП)	ЕБЕВЕ Фарма Гес. м. б. х Нфг. КГ(Австрія)
Доксорубіцин (ДР)	ЕБЕВЕ Фарма Гес. м. б. х Нфг. КГ(Австрія).

Магнітну протипухлинну рідину готували наступним чином.

Спочатку синтезували магнетит рідинофазним способом, шляхом співосадження солей двота тривалентного заліза гідроксидом амонію. Для проведення синтезу необхідну кількість солей розчиняли у необхідній кількості дистильованої води. Профільтрований розчин додавали поступово до надлишку гідроксиду амонію. Одержані наночастинки магнетиту модифікували необхідною кількістю модифікатора. Далі проводили стабілізацію модифікованих наночастинок магнетиту необхідною кількістю олеату натрію при температурі 80 °С протягом години. Далі іммобілізували на поверхню наночастинок магнітної рідини у динамічному режимі необхідну кількість цисплатину або доксорубіцину протягом 2 годин за кімнатної температури.

Далі магнітну протипухлинну рідину досліджували наступним чином.

Розміри і форму частинок у зразках вивчали методом просвічувальної електронної мікроскопії на приладі Transmission Electron Microscope JEOL 2010.

Намагніченість зразків вимірювали за допомогою вібраційного магнітометра при частоті 228 Гц за кімнатної температури.

Седиментаційну стабільність за температур 10-25 °С та стійкість до розведення водою у 10-20 разів магнітної рідини досліджували методами фотодинамічної спектроскопії при зберіганні у скляному посуді протягом 7-12 місяців.

Кількість іммобілізованого цисплатину на поверхні наночастинок визначали вимірюванням концентрації Pt^{2+} контактних розчинів до і після іммобілізації. Вимірювання концентрації Pt^{2+} -іонів здійснювали атомно-адсорбційним методом за допомогою однопроменевого двоканального спектрофотометра С-115 МІ з полум'яним атомізатором, дейтерієвим коректором фону, цифровою реєстрацією. Використовували лампу з порожнистим катодом на платину, аналітична лінія - 265,9, паливно-окисна система: ацетилен-повітря.

Кількість іммобілізованого доксорубіцину на поверхні наночастинок визначали спектрофотометрично вимірюванням концентрації ДР контактних розчинів до і після іммобілізації.

Цитостатичну активність одержаної магнітної протипухлинної рідини досліджували в системі *in vitro* спільно з ІЕПОР ім. Р.Є. Кравецького на клітинних лініях MCF-7 (карцинома молочної залози людини) та A2780 (карцинома яєчника людини). Клітини ліній MCF-7 та A2780 культивували у культуральному модифікованому середовищі Dulbecco ISCOV (Sigma, Germany) з додаванням ембріональної телячої сироватки ("Сангва", Україна) за температури 37 °С. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю посіву $2-4 \cdot 10^4$ клітин на cm^2 поверхні. Пересів клітин робили, коли 50 % поверхні було зайнято клітинами. Клітини ліній MCF-7 та A2780 (концентрація складала 1-10 клітин/мл в об'ємі 100 мкл) висаджували в 96-лункові пластикові планшети. Клітини культивувались на модифікованому середовищі Dulbecco-ISCOV (Sigma, Germany) із додаванням ембріональної телячої сироватки та антибіотика - гентаміцину в концентрації 40 мкг/мл в стандартних умовах при 37 °С. Після 24-годинної адаптації клітин до умов культивування додавали досліджувані проби для тестування (кожен у 3 паралелях, у 100 мкл) та інкубували за таких самих умов. Визначення цитотоксичності проводили через 24 години. Ефективність оцінювали за МТТ-колориметричним тестом. В основу методу покладено здатність мітохондріальних ферментів живої клітини перетворювати 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразол бромід (МТТ) - сіль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазан лілового кольору. Для цього у лунки 96-лункового планшета додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували протягом 3-х годин. Після центрифугування планшета (1500 об/хв., 5 хв.) за допомогою напіваавтоматичного відсмоктувача видаляли супернатант. Для розчинення кристалів формазану у кожну лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду. Величину оптичного поглинання розчину вимірювали за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвилі 540 нм.

Спектрофотометричними дослідженнями показано, що цитостатики у складі магнітних рідин еквівалентні вихідним лікарським препаратам.

Наприклад, активність цисплатину в зразку $Fe_3O_4/ол.Na/ПЕГ/ЦП$ на 8 % перевищує цитотоксичну активність вільної форми цисплатину в дозі IC_{25} та на 6 % перевищує цитотоксичну активність цисплатину в зразку $Fe_3O_4/ол.Na/ЦП$, що пояснюється синергічною дією цитостатика та наночастинок магнітної рідини на клітини ліній MCF-7.

Згідно з одержаними експериментальними даними, спостерігається збільшення намагніченості насичення (σ_s) і відносної залишкової намагніченості (M_r/M_s) зразків при іммобілізації (0,5 мг) $[Pt(NH_3)_2]^{2+}$ іонів. При збільшенні концентрації $[Pt(NH_3)_2]^{2+}$ -іонів (1,5 мг), значення σ_s композиту зменшуються.

5 Суть винаходу пояснюється конкретними прикладами виконання.

Приклад 1. У колбу об'ємом 100 мл додавали 0,05 М сульфату заліза та 0,1 М хлориду заліза, потім додавали 47 мл розчинника, наприклад дистильованої води та перемішували. Фільтрували одержаний розчин та додавали поступово до надлишку гідроксиду амонію. Одержану магнітну рідину модифікували 5,5 мг ПЕГ-2000 Після цього додавали до магнітної рідини 5,5 мг олеату натрію при температурі 80 °С, перемішували протягом години та доводили одержану суміш до заданого об'єму водою. Далі іммобілізували на поверхню наночастинок магнітної рідини у динамічному режимі або 5 мг/мл цисплатину або 5 мг/мл доксорубіцину протягом 2 годин за кімнатної температури. Поставлена задача вирішується (див. приклад 1 таблиці).

15 Приклади 2-3. Робили так, як описано у прикладі 1, змінюючи тільки вміст та кількість компонентів магнітної протипухлинної рідини. Поставлена задача вирішується (див. приклади 2-3 таблиці).

20 Приклад 4. Робили так, як описано у прикладі 1. Якщо вміст компонентів нижче меж, які нами заявляються, задача не вирішується, тому що магнітна протипухлинна рідина не цитостатична (зменшується кількість загиблених клітин)

Приклад 5. Робили так, як описано у прикладі 1. Вміст компонентів вище меж, які нами заявляються, не доцільно, задача не вирішується.

Приклад 6 – найближчий аналог. В таблиці наведені показники для найближчого аналога, який має наступний вміст компонентів у мас. %:

Магнетит	9-17
Олеїнова кислота	2,5-4,3
Олеат триетаноламін або олеат моноетанолдигліцериламін або олеат тригліцериламін	3,2-6,4
Вода дистильована	решта.

25 Таким чином, у магнітній протипухлинній рідині, яка заявляється, поліпшується біосумісність, знижується адсорбція білків на поверхні наночастинок, підвищуються медико-біологічні властивості за рахунок синергічної дії цитостатика та наночастинок магнітної рідини при збереженні її магнітних властивостей.

Таблиця

Склад магнітної протипухлинної рідини та її характеристики

№№ прикладу	Склад магнітної протипухлинної рідини, мас. %					Магнітні характеристики		
	Магнетит	Стабілізатор	Модифікатор	Протипухлинний агент	Розчинник	Середній розмір стабілізованих частинок, нм	Намагніченість насичення M_s , кА/м	Густина, г/см ³
1.	12,5	1,25	1,25	37,5	47,5	17,0	6,6	1,17
2.	10,0	1,0	1,0	20,0	68,0	16,9	6,5	1,17
3.	15,0	1,5	1,5	55,0	27,0	17,0	6,7	1,2
4.	7,0	0,5	0,5	10,0	72,0	10,5	0,8	1,15
5.	25,0	2,5	2,5	65,0	5,0	18,4	12,5	1,28
6. найближчий аналог	9,0-17,0	2,5-4,3; 3,2-6,4	-	-	78,3-82,1	-	3,0-12,0	1,06-1,20

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 1. Магнітна протипухлинна рідина, що містить магнетит, стабілізатор та розчинник, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить модифікатор та протипухлинний агент, при наступному співвідношенні компонентів в мас. %:
магнетит 10-15

стабілізатор	1,0-1,5
модифікатор	1,0-1,5
протипухлинний агент	20-55
розчинник	решта.

2. Магнітна протипухлинна рідина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як модифікатор беруть поліетиленгліколь і/або гідроксопатит, як протипухлинний агент беруть цисплатин або доксорубіцин, як стабілізатор беруть олеат натрію, а як розчинник беруть дистильовану воду або фізіологічний розчин.

5

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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