

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900246** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.07.31

(51) Int. Cl. *A61K 31/08* (2006.01)
C07C 43/11 (2006.01)
C07C 41/03 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.10.31

(54) ИНГИБИТОР АТФ-ЗАВИСИМЫХ ОБРАТНЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ КЛЕТОК И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 2016143074

(32) 2016.11.02

(33) RU

(86) PCT/RU2017/000809

(87) WO 2018/084749 2018.05.11

(71) Заявитель:

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"ТАТХИМФАРМПРЕПАРАТЫ";
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КАЗАНСКИЙ
(ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Штырлин Юрий Григорьевич,
Иксанова Альфия Габдулахатовна,
Бадеев Юрий Владимирович,
Балакин Константин Валерьевич
(RU)**

(57) Изобретение относится к химии лекарственных соединений, а именно к группе хиральных конъюгатов (оптически активных гибридных молекул) олигоэфирполиольной природы, являющихся ингибиторами АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток (ОЭП-ингибитор). ОЭП-ингибитор представляет собой конъюгат с эквимольным соотношением оптически активного полиоксипропиленгексола и полиоксипропиленгликоля. Заявленный способ, по которому получается конъюгат, обеспечивает возможность получения препарата, увеличивающего эффективность действия лекарственных средств посредством ингибирования механизмов множественной лекарственной устойчивости клеток. Полученный препарат может быть использован в области биологии, фармакологии, фармацевтики, медицины, сельского хозяйства. ОЭП-ингибитор получают оксипропилированием смеси сорбита и бифункционального кислородсодержащего соединения в присутствии гидроксида щелочного или щелочноземельного металла. Бифункциональное кислородсодержащее соединение может быть водой, пропиленгликолем, дипропиленгликолем, трипропиленгликолем, тетрапропиленгликолем, пентапропиленгликолем, гексапропиленгликолем, гептапропиленгликолем или их смесью. Ингибитор представляет собой конъюгат полиоксипропиленгликоля с молекулярной массой от 300 до 500 Да и полиоксипропиленгексола с молекулярной массой от 1000 до 1500 Да в эквимольном соотношении, с гидроксильным числом в пределах 215-240 мг КОН/г.

A1

201900246

201900246

A1

Ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров

клеток и способ его получения

Изобретение относится к области разработки физиологически активных веществ, а именно, к группе хиральных конъюгатов (оптически активных гибридных молекул) олигоэфирполиольной природы (ОЭП), являющихся ингибиторами АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток, сокращенно называемых АВС-транспортерами (от англ. ATP-binding cassette transporters). Изобретение может быть использовано в области биологии, фармакологии, фармацевтики, медицины, сельском хозяйстве и экологии для существенного усиления эффективности действия физиологически активных веществ, в том числе лекарственных средств – противоопухолевых, сердечно-сосудистых, противоаллергических, противовоспалительных и других, за счет подавления механизмов множественной лекарственной устойчивости клеток под действием заявленных ингибиторов АВС-транспортеров.

Одной из наиболее актуальных проблем современной фармакотерапии является множественная лекарственная устойчивость патологических клеток – врожденная или приобретенная невосприимчивость клеток к лекарственным препаратам, различающимся по механизму действия и структуре. Одним из основных механизмов возникновения лекарственной устойчивости патологических клеток является способность к обратному захвату и выбросу проникающих в клетку молекул ксенобиотиков АТФ-зависимыми насосами семейства АВС-транспортеров [1].

В семейство АВС-транспортеров входят гликопротеин Р-гр (P-glycoprotein), белки множественной лекарственной устойчивости семейства MRP (multidrug resistance-associated protein) и белок устойчивости рака молочной железы BCRP (breast cancer resistance protein). Активность указанных АВС-транспортеров, экспрессия которых существенно возрастает при возникновении патологических процессов в клетке, приводит к значительному снижению эффективности фармакотерапии. Подобные эффекты детально показаны и исследованы на примере большинства лекарственных средств для химиотерапии опухолей [2], в том числе таргетных, но и при многих других патологиях АВС-транспортеры существенно снижают эффективность лекарств. АВС-транспортеры обладают широкой субстратной специфичностью, осуществляя обратный захват и выброс из клетки многих лекарств из различных терапевтических групп.

В качестве примеров, не носящих исчерпывающий характер, субстратами ABC-транспортёров являются [3]: анальгетики (асимадолин, фентанил, морфин, пентазоцин); антибиотики (ампициллин, азитромицин, цефоперазон, цефтриаксон, кларитромицин, доксициклин, эритромицин, грамицидин А, грамицидин D, грепафлоксацин, итраконазол, кетоконазол, левофлоксацин, рифампицин, спарфлоксацин, тетрациклин, валяномицин и другие); противовирусные препараты (делагирдин, лопинавир, ламивудин, нелфинавир, зидовудин); антиаритмические препараты (амиодарон, дигоксин, лидокаин, пропafenон, хинидин, верапамил); противоопухолевые препараты (5-фторурацил, актиномицин D, бисантрон, хлорамбуцил, колхицин, цисплатин, цитарабин, даунорубин, доцетаксел, доксорубин, эпирубин, этопозид, гефитиниб, иринотекан, метотрексат, митомицин С, митоксантрон, паклитаксел, тамоксифен, тенипозид, топотекан, винбластин, винкристин и другие); антигистаминные препараты (циметидин, фексофенадин, ранитидин, терфенадин); гиполипидемические препараты (ловастатин, симваостатин, правастатин, розувастатин); блокаторы кальциевых каналов (азидопин, бепридил, дилтиазем, фелодипин, нифедипин, низолдипин, нитрендипин, тиапамил, верапамил); анти-ВИЧ препараты (ампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, саквинавир, ритонавир); иммуносуппрессоры (циклоспорин А, сиролимус, такролимус), антидепрессанты (хлорпромазин, фенотиазин) и многие другие лекарственные соединения природного, синтетического или полусинтетического происхождения.

Таким образом, создание эффективных и безопасных ингибиторов АТФ-зависимых обратных транспортёров клеток является перспективным подходом к увеличению эффективности действия широкого ряда физиологически активных веществ, в том числе лекарственных средств. Создание подобных препаратов позволило бы значительно уменьшить терапевтическую дозу активных веществ, и как следствие, их побочные эффекты, и тем самым совершить качественный скачок в фармакологии и медицине.

Из исследованного уровня техники известен широкий ряд соединений, в том числе разрешенных к применению лекарственных препаратов, способных ингибировать ABC-транспортёры. Так, была проведена масштабная исследовательская работа по созданию ингибиторов ABC-транспортёров в качестве препаратов, увеличивающих чувствительность раковых клеток к действию противоопухолевых препаратов [3]. В частности, в качестве ингибиторов Р-гр проявили активность и исследовались для комбинированной противоопухолевой химиотерапии аторвастатин, амлодипин, циклоспорин А, дисульфирам, нифедипин, верапамил, препараты GF120918, LY475776, LY335979, MS-209, OC144-093, pluronic L61, PSC-833, R101933, S9788, VX-710, XR-9576, V-104. В качестве ингибиторов MRP2 исследовались азитромицин, циклоспорин А,

фуросемид, глибенкламид, пробенецид, МК-571. В качестве ингибиторов BCRP исследовались циклоспорин А, дипиридамол, элакридар, фумитреморгин С, новобиоцин, ортатаксел, резерпин, ритонавир, тариквидар, GF120918, VX-710, XR-9576.

Как известно из уровня техники, различают три поколения ингибиторов ABC-транспортёров:

Поколение 1: циклоспорин А, верапамил (примеры). Эти соединения являются эффективными ингибиторами обратного транспорта, но сами обладают высокой токсичностью. Их применение с химиотерапевтическими препаратами не привело к существенным клиническим результатам.

Поколение 2: PSC-833 и VX-710 (примеры). Эти соединения также являются эффективными ингибиторами обратного транспорта. Однако их применение с химиотерапевтическими препаратами также не привело к существенным клиническим результатам; кроме того, наблюдались существенные побочные эффекты терапии, связанные с лекарство-лекарственными взаимодействиями.

Поколение 3: GF120918, LY335979, R101933 и XR9576 (примеры). Эти соединения являются еще более эффективными ингибиторами обратного транспорта на *in vitro* моделях, чем ингибиторы поколений 1 и 2. Однако их применение с химиотерапевтическими препаратами также не привело к существенным клиническим результатам по причинам низкой безопасности (наличия нежелательных побочных эффектов) и недостаточной терапевтической эффективности.

В целом современное состояние исследований в этой области характеризуется локальными успехами на уровне *in vitro*, однако переход к *in vivo*, а тем более к клиническим исследованиям, как правило, не приносит желаемого эффекта, в основном, в силу наличия нежелательных побочных эффектов композиций, неоптимальной фармакокинетики, а также недостаточной эффективности ингибирующего действия [3]. При этом во всех современных исследованиях отмечается перспективность дальнейших поисков в этом направлении.

Исходя из указанного, становится очевидным, что для полноценной реализации перспектив данного подхода требуются более активные и безопасные ингибиторы ABC-транспортёров.

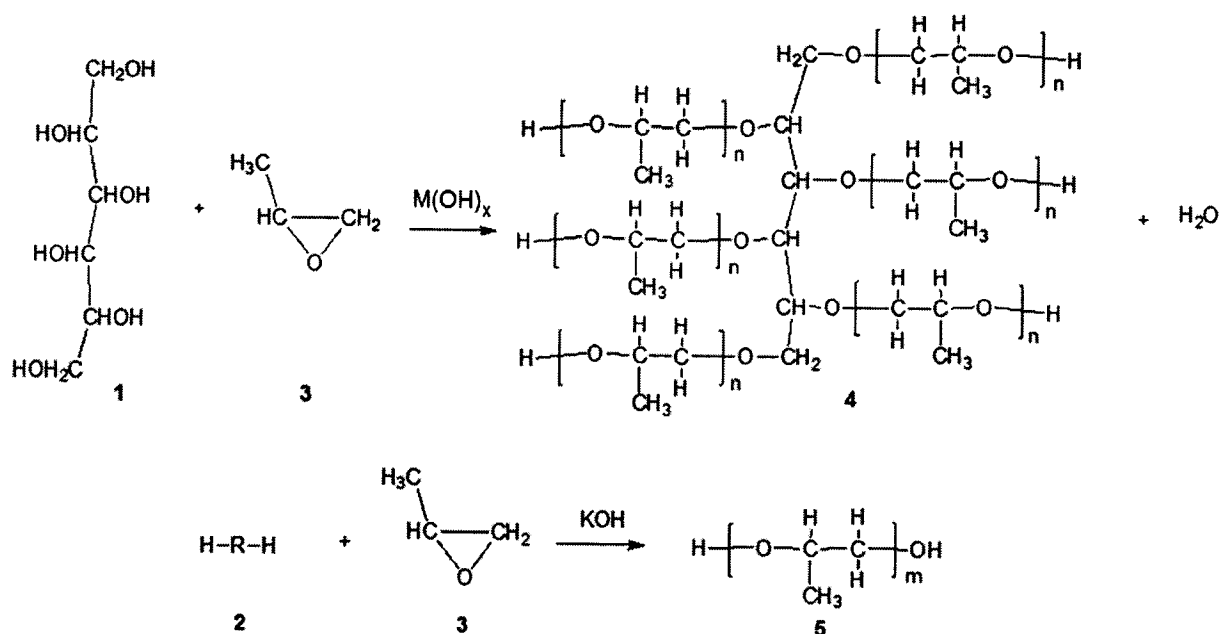
Аналогов или прототипов у заявленного технического решения по совпадающим признакам на дату предоставления заявочных материалов не выявлено, однако заявителем выявлено большое количество средств для решения поставленной задачи по назначению.

В заявленном техническом решении применен творческий подход, который позволяет одновременно значительно увеличить терапевтическую эффективность,

повысить безопасность, а также существенно снизить стоимость активной фармацевтической субстанции, повысить технологичность производственного процесса получения субстанции. При этом заявленное техническое решение обеспечивает возможность выхода на международный рынок с продуктом, ранее не известным в мире.

Целью заявленного технического решения является получение ингибитора обратных АВС-транспортеров клеток олигоэфирполиольной природы (ОЭП-ингибитор), состоящего из полиоксипропиленгликоля с молекулярной массой от 300 до 500 Да и полиоксипропиленгексола с молекулярной массой от 1000 до 1500 Да.

Цели заявленного технического решения достигаются путем осуществления следующего химического процесса по схеме:



где:

1 – сорбит ((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-гексан-1,2,3,4,5,6-гексол);

2 – бифункциональное кислородсодержащее соединение, в котором $R = -O-; [-OCH_2CH(CH_3)]_k-O-$, $k=1-7$;

3 – окись пропилена;

$M(OH)_x$, – гидроокись металла, где М – щелочной или щелочноземельный металл, $x=1$ или 2;

$n=2-6$, преимущественно $n=4$;

$m=5-9$, преимущественно $m=7$.

Таким образом, заявленное техническое решение в отношении способа реализуется одновременно, в одном реакторе, в один этап, с применением доступных реагентов,

взятых в пропорциях, обеспечивающих получение целевого конъюгата с эквимольным соотношением оптически активного соединения 4 и соединения 5.

Процесс в целом реализуется в соответствии с представленной выше схемой, в соответствии с приведенным далее описанием.

В реактор-полимеризатор загружают исходные реагенты 1 и 2, добавляют щелочной катализатор, включают перемешивание и в атмосфере азота выдерживают реакционную смесь при температуре 90-100 °С в течение 30 минут до получения гомогенной массы. Затем подается расчетное количество соединения 3 со скоростью, обеспечивающей давление в реакторе-полимеризаторе не выше 0,39 МПа (4 кгс/см²), и при температуре не выше 115 °С. После этого проводится выдержка реакционной массы при температуре не выше 115 °С в течение 1-1,5 часов до остановки падения давления.

При этом соотношение реагентов 1, 2 и $M(OH)_x$ рассчитывается таким образом, чтобы в результате их реакции с окисью пропилена получилась эквимольная смесь соединений 4 и 5. Соединение 4 с $n=4$ и соединение 5 с $m=7$ представляют собой основные олигомерные компоненты, образующиеся в описанной реакции анионной олигомеризации. Количество соединения 3 рассчитывается таким образом, чтобы полученная эквимольная смесь соединений 4 и 5 обладала гидроксильным числом в пределах 215-240 мг КОН/г.

В качестве бифункционального кислородсодержащего соединения 2 могут выступать пропиленгликоль, дипропиленгликоль, трипропиленгликоль, тетрапропиленгликоль, пентапропиленгликоль, гексапропиленгликоль, гептапропиленгликоль, или вода, или их смесь. При взаимодействии гидроокиси щелочного или щелочноземельного металла с кислородсодержащим соединением или сорбитом выделяется вода, которая также должна учитываться при расчете эквимольного соотношения образующихся целевых продуктов 4 и 5.

Для соединения 4 оптимальной молекулярной массой является 1200 Да, при этом оно проявляет эффективность также в диапазоне от 1000 до 1500 Да. Для соединения 5 оптимальной молекулярной массой является 400 Да, при этом в диапазоне от 300 до 500 Да оно также обладают эффективностью. Выход за указанные диапазоны молекулярных масс также возможен, но сопровождается некоторым снижением активности получаемого ингибитора ABC-транспортёров.

Ингибитор ABC-транспортёров может быть получен альтернативным способом, который не приводится заявителем в силу его известности как такового, и заключается в раздельном получении соединений 4 и 5 путем взаимодействия соответственно

соединений 1 и 2 с окисью пропилена 3 в условиях щелочного катализа, с дальнейшим их механическим смешением в эквимольных количествах.

Изобретение проиллюстрировано следующими материалами:

Фиг. 1 – График зависимости вязкости ОЭП-ингибитора от температуры.

Фиг. 2 – ВЭЖХ-МС спектр ОЭП-ингибитора.

Фиг. 3 – Концентрации полумаксимального ингибирования роста (CC_{50} и IC_{50} , мкМ) соединений для условно-нормальных и опухолевых клеток человека.

Фиг. 4 – Содержание ОЭП-ингибитора в анализируемых клеточных лизатах по данным ВЭЖХ-МС.

Фиг. 5 – Поляризация флуоресценции ДФГТ (1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен) в клеточной суспензии после добавления эффекторов: ОЭП-ингибитора, композиции доксорубина и ОЭП-ингибитора, холестерина и Тритон X-100. (А) клетки MCF-7; (В) клетки с МЛУ MCF-7/Vin. Плотность суспензии 2×10^6 клеток/мл, температура 25 °С, в следующих концентрациях: ОЭП-ингибитор – 8,7, 87 и 870 мкг/мл, доксорубин – 1 мкМ, холестерол – 100 мкг/мл, Triton X-100 – 0,05%.

Фиг. 6 – Гистограмма трансэпителиального транспорта доксорубина в поляризованных CaCo-2 клетках. Сокращения: апикально-базолатеральный транспорт (А-В), базолатерально-апикальный транспорт (В-А).

Фиг. 7 – Фотография результатов иммуноблоттинга исходных и генно-модифицированных клеток MCF-7, после обработки доксорубином, ОЭП-ингибитором или их комбинацией в течение 48 часов.

Фиг. 8 – Влияние эффекторов на АТФ-азную активность Р-гликопротеина человека изолированных мембран клеток Sf9 (0,2 мг/мл по белку). Контроль: базовая активность мембран в присутствии 5 мМ АТФ и 0,1 мМ винбластин.

Фиг. 9 – Содержание АТФ в лизатах клеток MCF-7 (А) и MCF-7/Vin (В), обработанных ОЭП-ингибитором (87, 430, 2175 мкг/мл), доксорубином (10 мкМ) и их композицией (ОЭП-ингибитор 87 мкг/мл + DOX 10 мкМ).

Далее заявителем представлены примеры способов получения ОЭП-ингибитора.

Пример 1. Способ получения ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-вода.

В стальной реактор-полимеризатор, снабженный механической мешалкой, холодильником, термопарой, трубкой для ввода окиси, загружают 27,3 г (0,15 моль) сорбита и добавляют 0,6 г (0,01 моль) гидроксида калия в 2,51 г (0,139 моль) воды. Реактор трижды продувают азотом. Включают перемешивание и в атмосфере азота выдерживают при температуре 90-100 °С в течение 30 минут до получения гомогенной

массы. Поднимают температуру до 115 °С и порционно подают 270 г (4,65 моль) окиси пропилена со скоростью, обеспечивающей давление в реакторе-полимеризаторе не выше 0,39 мПа (4 кгс/см²) и температуру не выше 115 °С. После подачи расчетного количества окиси пропилена выдерживают реакционную массу при температуре не выше 120 °С в течение 1-1,5 часов до остановки падения давления.

Полученный ОЭП-ингибитор нейтрализуют 50% водным раствором ортофосфорной кислоты до pH 6,5-7,5, удаляют воду в вакууме при температуре 80-90 °С и отфильтровывают с монтмориллонитом через бельтинг. После всех операций получают 270 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 645 мПа*с, плотность 1,038 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 220 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 2. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-пропиленгликоль.

В стальной реактор-полимеризатор, снабженный механической мешалкой, холодильником, термопарой и трубкой для ввода окиси, загружают 28,7 г (0,157 моль) сорбита и добавляют 0,63 г (0,01 моль) гидроксида калия в 10,98 г (0,145 моль) пропиленгликоля. Реактор трижды продувают азотом. Включают перемешивание и в атмосфере азота выдерживают при температуре 90-100 °С в течение 30 минут до получения гомогенной массы. Поднимают температуру до 115 °С и порционно подают 274 г (4,73 моль) окиси пропилена со скоростью, обеспечивающей давление в реакторе-полимеризаторе не выше 0,39 мПа (4 кгс/см²) и температуру не выше 115 °С. После подачи расчетного количества окиси пропилена выдерживают реакционную массу при температуре не выше 120 °С в течение 1-1,5 часов до остановки падения давления.

Полученный ОЭП-ингибитор нейтрализуют 50% водным раствором ортофосфорной кислоты до pH 6,5-7,5, удаляют воду в вакууме при температуре бани 80-90 °С и отфильтровывают с монтмориллонитом через бельтинг. После всех операций получают 285 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 618 мПа*с, плотность 1,035 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 231 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 3. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-дипропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,3 г (0,15 моль), КОН – 0,6 г (0,011 моль), дипропиленгликоль – 18,5 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 255 г (4,4 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 308 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 623 мПа*с, плотность 1,036 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 227 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 4. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-трипропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,3 г (0,15 моль), КОН – 0,61 г (0,011 моль), трипропиленгликоль – 26,7 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 246 г (4,24 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 280 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 629 мПа*с, плотность 1,036 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 229 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 5. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-тетрапропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,29 г (0,15 моль), КОН – 0,6 г (0,011 моль), тетрапропиленгликоль – 34,75 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 246 г (4,24 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 285 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 620 мПа*с, плотность 1,034 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 233 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пента-, гекса- и гептапропиленгликоли были получены при взаимодействии пропиленгликоля с окисью пропилена в условиях щелочного катализа. Для каждого из образцов определялось гидроксильное число.

Пример 6. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-пентапропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,3 г (0,15 моль), КОН – 0,61 г (0,011 моль), пентапропиленгликоль – 42,8 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 230 г (3,95 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 285 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 627 мПа*с, плотность 1,033 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 231 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 7. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-гексапропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,31 г (0,15 моль), КОН – 0,6 г (0,011 моль), гексапропиленгликоль – 50,87 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 222 г (3,83 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 283 г слегка желтоватого

продукта. Вязкость 615 мПа*с, плотность 1,037 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 225 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п. 3.1).

Пример 8. Получение ОЭП-ингибитора из стартовой системы сорбит-гептапропиленгликоль.

Реакцию проводили по методике, представленной в примере 2. Количество стартовых веществ: сорбит – 27,3 г (0,15 моль), КОН – 0,61 г (0,011 моль), гептапропиленгликоль – 58,9 г (0,14 моль). Количество окиси пропилена – 214 г (3,83 моль). После нейтрализации и фильтрования получают 283 г слегка желтоватого продукта. Вязкость 623 мПа*с, плотность 1,036 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 224 мг КОН/г (ГОСТ 25261-82 п.3.1).

Полученный ОЭП-ингибитор представляет собой бесцветную или слегка желтоватую жидкость с вязкостью при комнатной температуре 575-715 МПа*с (на Фиг. 1 представлена зависимость вязкости ОЭП-ингибитора от температуры), с плотностью в пределах 1,01- 1,05 г/см³ (20 °С). Гидроксильное число – 215-240 мг КОН/г, pH 10% раствора (этанол/вода – 70/30) составляет 5,5-7,5.

ОЭП-ингибитор характеризуется множеством m/z пиков в диапазоне как небольших (400-1200 Да), так и более тяжелых масс (1500-2000 Да) (Фиг. 2), что отражает наличие статистического набора продуктов реакции поликонденсации. Анализ проводился с использованием хроматографической колонки Agilent ZORBAX Extend-C18 (размер колонки 1×150 мм, размер частиц 3,5 мкм) с предколонкой Extend Guard (1×17 мм, размер частиц 5 мкм) на хроматографе Agilent 1260 Binary System (вакуумный дегазатор G1379B, бинарный градиентный насос G1312B, колоночный термостат G1316A, автоматический пробоотборник G1367E, термостат для автоматического пробоотборника G1330 B). Детектор – квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения AB Sciex 5600 с источником ионизации DuoSpray. Подвижная фаза: растворитель А – 10 mM раствор формиата аммония в смеси вода метанол (90 : 10 %); растворитель В – 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Наиболее интенсивные пики ОЭП-ингибитора использовались для его количественного анализа в биологических матрицах.

Техническим результатом заявленного технического решения является способ получения хиральных конъюгатов (оптически активных гибридных молекул) олигоэфирполиольной природы, являющихся ингибиторами АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток (ОЭП-ингибиторами), для существенного усиления эффективности действия физиологически активных веществ из числа противоопухолевых, сердечно-

сосудистых, противоаллергических, противовоспалительных и других лекарственных соединений.

Далее заявителем представлены обозначения и сокращения, которые использованы для реализации заявленного технического решения

ABC (от англ. ATP binding cassette) — АТФ-зависимый транспортер

APS – ammonium persulfate, персульфат аммония

ATP (от англ. adenosine triphosphate) — аденозин-3-фосфат, АТФ

C – цитозин

DOX – доксорубицин

EGTA (от англ. ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) – этиленгликоль бис(2-аминоэтиловый эфир) -*N,N,N',N'*- тетрауксусной кислоты

FAM (от англ. 6-carboxyfluorescein) — 6- карбоксифлуоресцеин

G – гуанин

HRP (от англ. horseradish peroxidase) – пероксидаза хрена

LC-MS – жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрией

m/z – соотношение массы к заряду

P-gr – Р-гликопротеин

pH – водородный показатель

P_i (от англ. inorganic phosphate) – неорганический фосфат

T – тимин

U/μL – единиц в микролитре

Vin – винбластин

A₂₆₀ – значение длины волны в ангстремах при 260 нм

A – аденин

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДФГТ – дифенилгексатриен

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

Мкг – микрограмм

Мл – миллилитр

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МТТ (от англ. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) – тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

Об/мин – оборотов в минуту

ОЭП – олигоэфирполиол

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Материалы и методы

Химические реагенты и материалы

Доксорубин (DOX) гидрохлорид, убаин октагидрат, пентаэтиленгликоль 98%, β -меркаптоэтанол, этиленгликоль тетрауксусной кислоты (EGTA), бериллия сульфат тетрагидрат, натрия фторид, аммония молибдат были приобретены в Sigma-Aldrich (США). Бромфеноловый синий, деоксихолат натрия, Трис-гидрохлорид (трис-(оксиметил)аминометан гидрохлорид), аммоний персульфат (APS), натрия додецилсульфат (SDS) приобретены в компании Amresco (США). МТТ 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) от Life technologies (США). L-глутамин, раствор Дульбекко, не содержащий ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , раствор трипсина-ЭДТА, раствор Хэнкса без фенолового красного, среды α -MEM и DMEM приобретены в компании ПанЭко (Россия). 1,6-Дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГТ), дитиотреитол (1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол), аскорбиновая кислота, холестерол, Triton® X-100, винбластин сульфат, АТФ динатриевая соль гидрат, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) от компании Acros Organics. В компании Helicon были приобретены лаурилсульфат натрия (SDS) и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Условия культивирования клеток:

Клетки MCF-7, MCF-7/Vin, HSF, CaCo-2, НСТ-15, НСТ-116, OVCAR-4, PC-3, A-498, NCI-H322M, M-14, SNB-19, SF-539 (табл.1) культивируют в среде α -MEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина в атмосфере 5%-го CO_2 при 37 °C до образования монослоя. Для получения клеточной суспензии монослой клеток трипсинизируют с последующей инактивацией трипсина добавлением среды α -MEM с сывороткой. Подсчёт клеток производится в камере Неубайера методом исключения трипанового синего. Клетки пересевают 2 раза в неделю в отношении 1:6.

Перечень используемых клеточных линий

Название клеточной линии	Описание	ID NCI-60 (коллекция опухолевых клеточных линий(US))
MCF-7	Аденокарцинома молочной железы человека	ATCC® HTB-22™
HSF	Условно нормальные фибробласты кожи человека	
CaCo-2	Колоректальная аденокарцинома человека	ATCC® HTB-37™
HCT-15	Колоректальная аденокарцинома человека	GSM136289
HCT-116	Колоректальная карцинома человека	GSM136288
OVCAR-4	Аденокарцинома яичников человека	GSM136312
PC-3	Аденокарцинома простаты человека	GSM136316
A-498	Карцинома почки человека	GSM136294
NCI-H322M	Немелкоклеточная карцинома легкого человека	GSM136307
M-14	Меланома кожи человека	GSM136320
SNB-19	Глиобластома человека	GSM136283
SF-539	Глиосаркома человека	GSM136282

Пример 9. Исследование цитотоксического эффекта ОЭП-ингибитора *in vitro*.

Исследовали влияние ОЭП-ингибитора на пролиферативный потенциал опухолевых и условно-нормальных клеток человека при 72 часовой инкубации с использованием МТТ-теста. В лунки 96-ти луночного планшета вносили 1000 клеток в 90 мкл культуральной среды и инкубировали 24 часа в CO₂ инкубаторе для адгезии клеток к субстрату. Далее вносили аликвоты приготовленных растворов исследуемых соединений (ОЭП-ингибитор) в объеме 10 мкл/лунку. Исследование проводили в трипликатах. В контрольные лунки планшета вместо анализируемых соединений вносили аналогичные объемы mQ. После внесения исследуемых веществ клетки культивировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях в течение 72 часов. Далее культуральную среду с исследуемыми веществами удаляли из планшета с помощью вакуумного аспиратора, добавляли питательную среду и МТТ-реагент 5 мг/мл, инкубировали в CO₂ инкубаторе 3-4 часа. По истечении времени инкубации культуральную среду с МТТ-реагентом удаляли вакуумным аспиратором, вносили по 100 мкл ДМСО и инкубировали 5-10 минут. Появившееся фиолетовое окрашивание детектировали на планшетном ридере Тесап при 555 нм (референтная длина волны – 650 нм). Строили графики зависимости доза-эффект и определяли концентрацию полумаксимального ингибирования роста клеток (IC₅₀). Результаты представлены в таблице 2 на Фиг. 3.

Таким образом, детальный анализ таблицы позволяет сделать однозначно трактуемые выводы о том, что для большей части исследованных клеток IC₅₀ ОЭП-ингибитор превышает 1,5 мг/мл, что свидетельствует о полной безопасности заявленного конъюгата. При этом можно констатировать специфичность ОЭП-ингибитора к клеткам глиобластомы SNB-19 и глиосаркомы SF-539 (IC₅₀ составляет $0,46 \pm 0,12$ мг/мл и $0,46 \pm 0,12$ мг/мл, соответственно), что свидетельствует о его некотором, хотя и незначительном собственном противоопухолевом действии на указанные виды клеток.

Пример 10. Оценка влияния ОЭП-ингибитора на микровязкость плазматических мембран клеток MCF-7 и MCF-7/Vin

Ключевой физико-химической характеристикой клеточных мембран, влияющей на их физиологическую активность, является микровязкость – мера подвижности липидов в бислое, которая играет важную роль в проницаемости мембраны и функционировании мембранных белков. Для оценки микровязкости плазмалеммы применяют флуоресцентный метод, основанный на использовании липофильного индикатора дифенилгексатриена (ДФГТ), флуоресценция которого зависит от текучести клеточной мембраны.

Клеточную суспензию плотностью 2×10^6 клеток/мл инкубировали с ДФГТ в конечной концентрации 1 мкМ в течение 30 мин. Далее в суспензию клеток с помощью многоканального дозатора вносили аликвоты (по 10 мкл) растворов ОЭП-ингибитора до конечной концентрации 8,7; 87 и 870 мкг/мл, а также доксорубицин в концентрации 1 мкМ и его композиции с ОЭП-ингибитором (DOX 1 мкМ + ОЭП-ингибитор 8,7 мкг/мл; DOX 1 мкМ + ОЭП-ингибитор 87 мкг/мл). В качестве положительных контролей, значимо изменяющих микровязкость плазматических мембран клеток, тестировали холестерол в конечной концентрации 100 мкг/мл, а также липофильный детергент Triton X-100 в концентрации 0,05%. Непосредственно после внесения аликвот проб детектировали поляризацию флуоресценции ДФГТ в течение 1 часа с интервалом 10 минут.

Результаты влияния ОЭП-ингибитора на микровязкость плазматических мембран клеток MCF-7 и MCF-7/Vin представлены на Фиг. 5.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ОЭП-ингибитор в концентрациях 8,7, 87 и 870 мкг/мл, а также доксорубицин, как и его композиции ОЭП-ингибитором, значимо не изменял поляризацию флуоресценции ДФГТ в суспензиях клеток MCF-7 и MCF-7/Vin. Поскольку поляризация флуоресценции пропорциональна вязкости микроокружения флуорофора [4], из чего можно заключить, что исследуемый ОЭП-ингибитор не влиял на микровязкость плазматических мембран исследуемых клеток.

Холестерол, обладая большей вязкостью, чем фосфолипиды плазмалеммы, значительно увеличивал поляризацию флуоресценции ДФГТ и микровязкость мембраны. Triton X-100, являясь сильным детергентом, постепенно растворяет плазмалемму, о чем свидетельствует значительное уменьшение поляризации флуоресценции ДФГТ. Исследуемый ОЭП-ингибитор не оказал значимого эффекта на микровязкость цитоплазматических мембран клеток млекопитающих, что свидетельствует об его инертности в отношении липидного бислоя цитоплазматических мембран опухолевых клеток.

Пример 11. Оценка накопления ОЭП-ингибитора в резистентных опухолевых клетках.

Известно, что некоторые гидрофобные блоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида обладают способностью проникать через барьер плазматической мембраны клеток, накапливаться в цитоплазме и оказывать эффекты на внутриклеточные органеллы и ферменты. В частности, показано, что плуроник Р85 обладает свойством изменять микровязкость мембран митохондрий и разобщать окислительное фосфорилирование [5], [6]. В связи с этим, представляло интерес определить степень внутриклеточного накопления тестируемого ОЭП-ингибитора. Идентификацию и количественное определение содержания ингибитора в лизатах клеток осуществляли с использованием жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

Клетки MCF-7/RES рассеивали в 6-луночные планшеты в количестве 50 000 клеток в лунку планшета и культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24-х часов. К клеткам добавляли аликвоты ингибитора, конечные концентрации которого составляли 8,7, 87 и 870 мкг/мл и культивировали в течение 96 часов при 37 °C и 5% CO₂. К контрольным пробам вносили соответствующие объемы деионизированной воды. По истечении времени инкубации среду, содержащую ОЭП-ингибитор, отбирали аспиратором. Клетки отделяли от поверхности планшета при помощи суспендирования раствором Хенкса и переносили в 15 мл пробирки для отмывки не менее 5 раз (400 g, 4 минуты). К осадку клеток вносили 150 мкл деионизированной воды, содержащей внутренний стандарт – пентаэтиленгликоль концентрацией 10⁻⁵ М. Клетки лизировали двумя циклами замораживания и оттаивания (4 мин при -75 °C, с инкубацией на водяной бане при 37 °C в течение 2 мин) с последующей обработкой ультразвуком 4 мин. Аликвоты лизатов отбирали для последующего определения количества белка в пробах с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit производства «Life Technologies». К клеточным лизатам вносили 700 мкл охлажденного метанола, инкубировали в течение 15 минут при -

20 °C с последующим центрифугированием при 17400 g и 0 °C в течение 20 минут. Супернатант переносили в чистые пробирки и высушивали под вакуумом на лиофильной сушке. Непосредственно перед анализом высушенные клеточные лизаты растворяли в 200 мкл смеси метанол/вода 1:1 с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Все ВЭЖХ-МС эксперименты осуществляли с использованием хроматографической системы на хроматографе Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Inc., USA), сопряженном с масс-спектрометром AB Sciex 5600 (AB Sciex, USA).

Результаты оценки накопления ОЭП-ингибитора в резистентных опухолевых клетках представлены в Таблице 3 на Фиг. 4.

ВЭЖХ-МС анализ внутриклеточного накопления ОЭП-ингибитора показал наличие фемто- и пикомолярных количеств полимера в лизатах клеток, которые культивировались с ОЭП-ингибитором (концентрации ингибитора: 8,7, 87 и 870 мкг/мл, время культивирования 96 часов). Примечательно, что с увеличением концентрации ОЭП-ингибитора в культуральной среде с 8,7 до 870 мкг/мл увеличение внутриклеточного содержания не прослеживается. Отсутствие концентрационных зависимостей и низкое содержание ОЭП-ингибитора в лизатах позволяет заключить, что обнаруженные следы ОЭП-ингибитора связаны с его неспецифической адсорбцией на плазматической мембране и не обусловлены его проникновением в цитоплазму клеток, в силу указанного представляется возможным сделать вывод о высокой безопасности заявленного конъюгата.

Пример 12. Оценка влияния ОЭП-ингибитора на трансэпителиальный транспорт доксорубина через плазматическую мембрану клеток СаСо-2

В поляризованных клетках СаСо-2 обратный транспортер Р-гр располагается на апикальной стороне цитоплазматической мембраны и осуществляет обратный транспорт (В-А) большого количества субстратов, включая доксорубин.

Клетки СаСо-2 рассаживали в планшеты с двухкомпонентными ячейками Millicell 96 в количестве 10000 кл/лунку и инкубировали в течение 21 дня при 37 °C и 5% CO₂. Целостность монослоя проверяли путем измерения электрического сопротивления (TEER) с помощью прибора Millicell-ERS, при значении TEER не менее 3 КОм/лунку начинали эксперимент. Для определения скорости транспорта доксорубина из апикальной (А) в базолатеральную (В) область [А-В] добавляли по 90 мкл доксорубина либо доксорубина и ОЭП-ингибитора (0,087-870 мкг/мл) в 3 лунки с фильтрами и по 250 мкл буфера HBSS в акцепторные лунки нижней плашки. Для определения скорости транспорта из базолатеральной (В) области в апикальную (А) [В-А] добавляли по 90 мкл Буфера HBSS с 1% ДМСО в 3 лунки с фильтрами и по 250 мкл доксорубина либо

доксорубина и ОЭП-ингибитора (0,087 - 870 мкг/мл) в нижние лунки плашки. Инкубировали собранную Millicell 96 CaCo-2 систему в течение 2 ч при 37 °С на шейкере с перемешиванием при 300 об/мин. Затем отбирали 70 мкл аликвоты из каждой части вставки и подвергали ВЭЖХ-МС анализу с использованием системы QTRAP 5500 (Applied Biosystems) с хроматографом Agilent Infinity 1290 (Agilent Technologies).

Результаты оценки влияния ОЭП-ингибитора на трансэпителиальный транспорт доксорубина представлены на Фиг. 6 в виде скорости проницаемости доксорубина через плазматическую мембрану клеток CaCo-2.

Как видно, клетки CaCo-2 экспортируют доксорубин с базолатеральной на апикальную часть мембраны (В-А). ОЭП-ингибитор, воздействуя на Р-gr, располагающийся на апикальной части мембраны, **ингибирует обратный транспорт доксорубина, увеличивая его содержание в направлении А-В: в концентрации 8,7 мкг/мл в 1,9 раз, в концентрации 87 мкг/мл в 3,5 раза и в концентрации 870 мкг/мл в 3,8 раза.** Данные эксперимента представлены средним значением трех независимых опытов ± стандартное отклонение. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента для множественных сравнений с введением поправки Бонферрони, $P \leq 0,05$. **В силу указанного представляется возможным сделать вывод о высокой эффективности АТФ-зависимого ингибитора обратных АВС-транспортёров.**

Пример 13 Влияние ОЭП-ингибитора на экспрессию Р-gr (ABCB1)

ОЭП-ингибитор способен элиминировать активную гликозилированную изоформу 190 кДа ABCB1, при этом наблюдается накопление в клетках неактивной высокоманнозной изоформы 175 кДа транспортера.

Клетки MCF-7, MCF-7-ABCC1-DsRed (с гиперэкспрессией MRP-1), MCF-7-ABCC2-BFP (с гиперэкспрессией MRP-2), MCF-7-ABCB1-GFP (с гиперэкспрессией Р-gr) в концентрации 3×10^4 клеток/см² культивировали в полной питательной среде DMEM с добавлением или доксорубина до конечной концентрации 3 мкМ; или ОЭП-ингибитора до конечной концентрации 261 мкг/мл; или композиции доксорубина- ОЭП-ингибитор до конечной концентрации 3 мкМ: 261 мкг/мл в течение 48 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для исследования белков методом иммуноблоттинга (Western Blot) применялся адаптированный и модифицированный протокол ABCAM (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/wb-beginner.pdf>). Моноклональные антитела к ABCB1 (Кат. № sc-13131, Santa Cruz) были использованы при разведении 1:200. В качестве вторичных использовали антимишанные антитела, конъюгированные с HRP – (Кат. № ab6728, Abcam) в разведении 1:10000. Моноклональные антитела к β-актину (Кат.

№ mAbscam 8226, Abscam) были использованы при разведении 1:2000. Результаты проведенного анализа визуализировали на приборе ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad).

Результаты влияния ОЭП-ингибитора на экспрессию Р-gr (ABCB1) представлены на Фиг. 7.

Белок ABCB1 представлен 2 изоформами, с молекулярным весом в 190 кДа и 175 кДа (Фиг. 7, верхний и нижние банды). При этом изоформа 190 кДа представляет собой гликозилированную активную форму белка, а 175 кДа банд представляет высокоманнозный неактивный белок [7]. Результаты свидетельствуют о том, что контрольные клетки MCF-7 содержат эквивалентное количество активного и неактивного белков. Воздействие с доксорубицином увеличивает количество активной формы белка, в то время как ОЭП-ингибитор практически полностью элиминирует активную форму ABCB1. При этом наблюдается накопление в клетках неактивной формы транспортера. Клетки, подвергшиеся воздействию комбинированного препарата, экспрессируют как активную, так и высокоманнозную формы белка. Экспрессия неактивной формы доказывает, что ОЭП-ингибитор смог частично обратить доксорубицин-опосредованную активацию транспортеров. Аналогичную картину мы наблюдаем в клетках, гиперэкспрессирующих гены ABCC1 и ABCC2. В силу указанного возможно сделать вывод о том, что **ОЭП-ингибитор способен подавлять активность АТФ-зависимых ингибиторов обратных АВС-транспортеров.**

Пример 14. Влияние ОЭП-ингибитора на АТФ-азную активность мембран с гиперэкспрессией ABCB1

АТФ-азную активность мембранного Р-гликопротеина исследовали с использованием коммерческого препарата изолированных мембран клеток насекомых *Spodoptera frugiperda* (линия Sf9), гиперэкспрессирующих человеческий рекомбинантный Р-гликопротеин, согласно методике [8]. Гидролиз АТФ в процессе каталитической активности Р-гликопротеина сопровождается образованием неорганического фосфата (Pi), детектируемого посредством спектрофотометрической реакции. Показано, что ОЭП-ингибитор ингибирует АТФ-азную активность с прямой концентрационной зависимостью – с увеличением концентрации ингибирующий эффект увеличивается.

Тестируемый ОЭП-ингибитор в концентрации 8,7-870 мкг/мл инкубировали с рекомбинантными мембранами, гиперэкспрессирующими Р-гликопротеин и субстратами в 1,5 мл микропробирках в трипликатах. Измеряли оптическую плотность продукта реакции при 880 нм, пропорциональную активности обратного транспортера, и АТФ-

азной активности фермента. В качестве контролей применяли неспецифический ингибитор активности ферментов – фторид бериллия.

Полученные значения АТФ-азной активности Р-гликопротеина человека изолированных мембран клеток Sf9 в присутствие контрольных ингибиторов и исследуемых соединений представлены в виде гистограммы на Фиг. 8.

Установлено, что ОЭП-ингибитор значительно ингибирует АТФ-азную активность Р-гликопротеина. Ингибирующая активность ОЭП-ингибитора незначительно уменьшается с увеличением его концентрации с 8,7 до 87 мкг/мл, однако сильно увеличивается при концентрации 870 мкг/мл. В литературных источниках превалирует мнение, что амфифильные блоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида ингибируют АТФ-азную активность Р-гликопротеина вследствие встраивания в липидную мембрану и изменения микровязкости липидного микроокружения транспортера [9]-[11]. Исследуемый ОЭП-ингибитор значимо не изменяет микровязкость клеточных мембран, следовательно, механизм его действия не исключает возможности прямого ингибирующего влияния на Р-гликопротеин. В силу указанного возможно сделать вывод о том, что ОЭП-ингибитор значимо подавляет активность АТФ-зависимого обратного АВС-транспортера Р-gr.

Пример 15. Влияние ОЭП-ингибитора на уровень АТФ в клетках MCF-7, MCF-7/Vin

Клеточную суспензию (MCF-7 или MCF-7/Vin) плотностью 2×10^6 клеток/мл инкубировали 2 часа при 25°C с ОЭП-носителем (конечные концентрации 87, 430 и 2175 мкг/мл) или доксорубицином (конечная концентрация 10 мкМ), или композицией доксорубицина с ОЭП-ингибитором в концентрациях 10 мкМ и 87 мкг/мл. Далее клетки осаждали центрифугированием (300g, 4 минуты) и промывали в буферном растворе, активирующем выработку АТФ в клетках. Состав буфера: NaCl (122 мМ), NaHCO₃ (25 мМ), глюкоза (10 мМ), KCl (3 мМ), MgSO₄ (1,2 мМ), K₂HPO₄ (0,4 мМ), CaCl₂ (1,4 мМ) и HEPES (10 мМ). Полученный клеточный осадок лизировали в течение 5 минут в охлажденном лизирующем буфере при интенсивном перемешивании. Состав лизирующего буфера: Tris-HCL (0,05 М), EDTA (2 мМ), TritonX100 (1%), NaF (10 мМ). Лизаты клеток немедленно замораживали и хранили до проведения анализа при -74 °C. Непосредственно перед анализом клеточные лизаты размораживали и центрифугировали от клеточного дебриса 7 минут при 20000g, супернатант отбирали для последующего анализа содержания АТФ. Содержание АТФ в клеточных лизатах определяли с помощью хемилюминесцентного метода в реакции с участием люциферазы, D-люциферина и АТФ с использованием высокочувствительного АТФ-реагента производства "Люмтек".

Интенсивность хемилюминесценции в реакции окисления люциферина, пропорциональную концентрации АТФ в пробе, определяли с помощью планшетного ридера Infinite 200 PRO (TECAN).

Результаты влияния ОЭП-ингибитора на уровень АТФ в клетках MCF-7, MCF-7/Vin представлены на Фиг. 9.

Установлено, что ОЭП-ингибитора при 2-часовом воздействии даже в высокой концентрации не вызывает уменьшения содержания АТФ в клетках MCF-7 и MCF-7/Vin. Из литературы известно, что гидрофобные блоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида вызывают уменьшение содержания АТФ в клетках млекопитающих в культуре в результате проникновения в цитоплазму и воздействия на функциональное состояние мембран митохондрий. В частности, показано, что плуроник P85 изменяет микровязкость мембран митохондрий и разобщает окислительное фосфорилирование [12], [6]. Сопоставляя полученные данные с литературными, можно заключить, что исследуемый ОЭП-ингибитор вследствие особенностей структуры не проникает в цитозоль клеток и не воздействует на функции митохондрий. Совместное применение доксорубина с ОЭП-ингибитором (ОЭП-ингибитор 87 мкг/мл + DOX 10 мкМ) также не оказало ингибирующего действия на биосинтез АТФ в клетках MCF-7 и MCF-7/Vin. В силу указанного возможно сделать вывод о том, что АТФ-зависимый ингибитор обратных АВС-транспортёров не влияет на процесс биосинтеза АТФ в опухолевых клетках.

Пример 16. Параметры токсичности ОЭП-ингибитора *in vivo*

Исследование острой токсичности ОЭП-ингибитора проводили на мышах линии CD-1 (6-8 недель), крысах линии Sprague Dawley (6-8 недель) и кроликах породы Советская шиншилла (2-2,5 кг) обоего пола при внутривенном и внутрижелудочном способах введения.

Внутрижелудочное введение осуществляли животным, лишенным корма (на промежуток времени не менее 8 часов), со свободным доступом к воде. Объем введения рассчитывали индивидуально для каждого животного, основываясь на массе тела, зарегистрированной непосредственно перед введением вещества. Доступ к корму возобновляли через час после введения.

Параметры острой токсичности (ЛД₅₀) ОЭП-ингибитора при разных путях введения указаны в таблице 4.

ЛД₅₀ ОЭП-ингибитора при разных путях введения

Вид животных	Способ введения	Пол животных	ОЭП-ингибитор, мг/кг
Мыши CD-1	per os	Самцы	>5000
		Самки	>5000
	в/в	Самцы	1059
		Самки	1384
Крысы SD	per os	Самцы	>5000
		Самки	>5000
	в/в	Самцы	1439
		Самки	1438
Кролики Советская шиншилла	per os	Самцы+самки	4167
	в/в	Самцы+самки	1183

* per os – внутрижелудочное введение
в/в - внутривенное введение

Согласно полученным результатам, ОЭП-ингибитор при введении внутрижелудочно по степени токсичности относится к нетоксичным веществам, при внутривенном введении – к малотоксичным веществам. При этом известно, что наиболее активный Плуроник L-61, входящий в состав препарата SP1049C, находящегося на 3 стадии клинических исследований, обладает более высокой токсичностью [13]. Так, ЛД₅₀ Плуроника L-61 при внутривенном способе введения мышам соответствует 800 мг/кг. В силу указанного возможно сделать вывод о том, что АТФ-зависимый ингибитор обратных АВС-транспортеров по классу токсичности может быть отнесен к классу малотоксичных и нетоксичных соединений, более безопасных в сравнении с Плуронином L-61.

Приведенные выше заявителем сведения позволяют сделать выводы о том, что заявленный ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток значительно увеличивает поглощение лекарственных средств живыми клетками и тканями. При этом ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток характеризуется высокой безопасностью и эффективностью.

Таким образом, в результате экспериментов достигнута поставленная цель – получен новый ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток.

Техническим результатом заявленного технического решения является то, что в результате проведенных исследований получен ОЭП-ингибитор способом, включающим

приготовление стартовой системы, оксипропилирование стартовой системы в присутствии щелочного катализатора, нейтрализацию полученного продукта, очистку с получением искомого ОЭП-ингибитора, характеризующимся тем, что соотношение сорбит : гидроокись щелочного или щелочноземельного металла : бифункциональное кислородсодержащее соединение в стартовой системе рассчитывается таким образом, чтобы в результате их реакции с окисью пропилена получалась эквимольная смесь полиоксипропиленгликоля и полиоксипропиленгексола.

Заявленный ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток:

- обладает низкой цитотоксичностью в отношении культур клеток человека по сравнению с большинством описанных в литературе ингибиторов ABC-транспортеров;
- не влияет на микровязкость цитоплазматических мембран опухолевых клеток линии MCF-7 и клеток MCF-7/RES с приобретенной лекарственной устойчивостью;
- не проникает через цитоплазматическую мембрану внутрь опухолевых клеток MCF-7;
- в диапазоне концентраций 8,7-870 мкг/мл вызывает специфическое ингибирование Р-gp-опосредованного обратного транспорта доксорубина, увеличивая его концентрации в акцепторных лунках в 1,9-3,8 раз соответственно;
- способен элиминировать активную гликозилированную изоформу 190 кДа ABCB1, при этом наблюдается накопление в клетках неактивной высокоманнозной изоформы 175 кДа транспортера;
- ингибирует АТФ-азную активность изолированных мембран клеток Sf9 с гиперэкспрессией Р-гликопротеина человека;
- не изменяет внутриклеточный уровень АТФ;
- при введении внутривенно по степени токсичности относится к нетоксичным веществам, при внутривенном введении – к малотоксичным веществам;
- характеризуется простотой получения, дешевизной исходного сырья, производство может быть осуществлено на существующих предприятиях химической отрасли промышленности.
- обеспечивает возможность выхода на международный рынок с продуктом, ранее не известным в мире.

В списке приведенной литературы представлены некоторые публикации, описывающие состояние области техники, к которой относится заявленное техническое решение.

При этом следует обратить внимание на то, что основываясь на заявленном техническом решении, представляется возможным проводить различного рода модификации и/или изменения, не выходя за объём патентных притязаний.

Заявленное техническое решение соответствует критерию «новизна», предъявляемому к изобретениям, по совокупности признаков, приведенных в независимом пункте формулы изобретения, т.к. указанная совокупность признаков не выявлена из исследованного заявителем уровня техники.

Заявленное техническое решение соответствует критерию «изобретательский уровень», предъявляемому к изобретениям, т.к. полученный ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток и способ его получения обеспечивают возможность решения неразрешимых ранее проблем, а именно, **при значительном увеличении терапевтической эффективности значительно повысить безопасность**, а также при этом существенно снизить стоимость готовой лекарственной формы.

Заявленное техническое решение соответствует критерию «промышленная применимость», предъявляемому к изобретениям, так как может быть использовано в производстве на специализированных предприятиях, с использованием известных материалов, оборудования и технологий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Choi Y.H., ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development / Y.H. Choi, A.M. Yu // *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014), P. 793–807
2. Tiwari A.K. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy/ A.K. Tiwari, K. Sodani, C.L. Dai, C.R. Ashby Jr., Z.S. Chen // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (2011), P. 570–594
3. Chen Z., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade./ Z. Chen, T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, M. Deng, C. Huang, T. Hu et al. // *Cancer Letters*, 370 (2016), P.153–164
4. Кантор, Ч. Биофизическая химия. Том 2. Методы исследования структуры и функции биополимеров / Ч. Кантор, П. Шиммел, - Москва: МИР, 1985.
5. Batrakova, E.V. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion / E.V. Batrakova, S. Li, W.F. Elmquist et al. // *Br J Cancer*. -2001. -V. 85, N. 12.-P. 1987-1997.
6. Kabanov A.V. An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic block copolymers / A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov // *J Control Release*. 2003. - V. 91, N. 1-2. - P. 7583.
7. Gautherot, J. Effects of Cellular, Chemical, and Pharmacological Chaperones on the Rescue of a Trafficking-defective Mutant of the ATP-binding Cassette Transporter Proteins ABCB1/ABCB4 / J. Gautherot, A-M. Durand-Schneider, D. Delautier, J-L. Delaunay, A. Rada, J. Gabillet, C. Housset, M. Maurice, T. Aït-Slimane // *HEJOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. – 2012. – Vol. 287. – № 7. – P.5070–5078.
8. Takahashi, K. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1 / K. Takahashi, Y. Kimura, N. Kioka, M. Matsuo, K. Ueda // *The Journal of biological chemistry*. – 2006. – Vol. 281, № 16. P. 10760-10768.
9. Batrakova, E.V. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters / E.V. Batrakova, S. Li, Y. Li, V.Y. Alakhov, A.V. Kabanov // *Pharm Res*. – 2004. – V. 21, N. 12. – P. 2226-2233.
10. Regev, R Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells / R. Regev, Y.G. Assaraf, G.D. Eytan // *Eur J Biochem*. – 1999. – Vol. 259. – P. 18-24

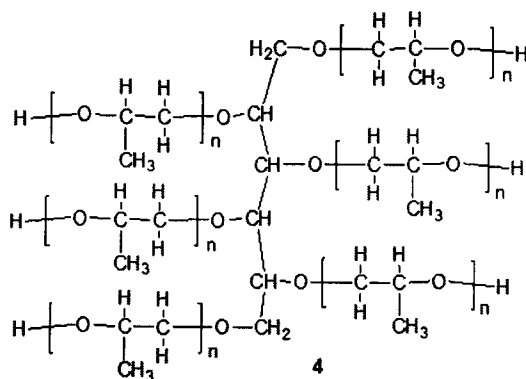
11. Womack, M.D. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes / M.D. Womack, D.A. Kendall, R.C. MacDonald // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1983. – Vol. 733. – № 2. – P. 210–215.

12. Batrakova, E.V. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization / E.V. Batrakova, S. Li, S.V. Vinogradov et al. // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2001. – Vol. 299. – № 2. – P. 483-493.

13. SP1049C [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа: <http://www.supratek.com/pipeline/products>

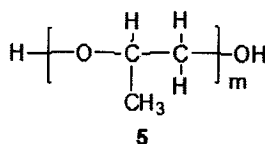
Формула изобретения

1. Ингибитор АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток, относящийся к группе хиральных конъюгатов (оптически активных гибридных молекул) олигоэфирполиольной природы, представляющий собой смесь полиоксипропиленгексола формулы 4



где $n=2-6$, преимущественно $n=4$,

и полиоксипропиленгликоля формулы 5

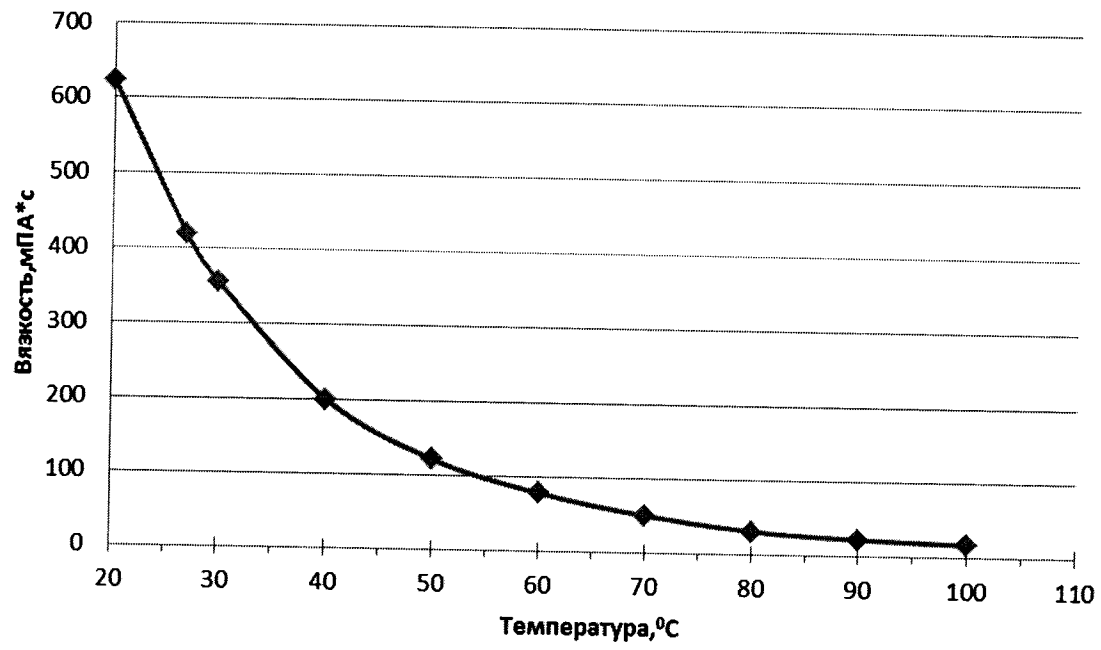


где $m=5-9$, преимущественно $m=7$.

2. Способ получения ингибитора АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток по п. 1, заключающийся в приготовлении смеси сорбита ((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-гексан-1,2,3,4,5,6-гексола) и бифункционального кислородсодержащего соединения $H-R-H$, где $R=-O-$; $[-OCH_2CH(CH_3)]_k-O-$, а $k=1-7$, с дальнейшим взаимодействием этой смеси с окисью пропилена в присутствии гидроокиси щелочного или щелочноземельного металла, дальнейшей нейтрализацией полученного продукта кислотой, последующей очисткой полученного продукта, с получением целевого ингибитора АТФ-зависимых обратных транспортеров клеток по п. 1, при этом образующийся ингибитор по п. 1 имеет гидроксильное число 215-240 мг КОН/г, соединение 4 имеет молекулярную массу 1000-1500 Да, соединение 5 имеет молекулярную массу от 300 до 500 Да, а мольное соотношение соединений 4 и 5 составляет 0,9-1,1.

3. Ингибитор по п. 1, характеризующийся тем, что соединение 4 имеет предпочтительную молекулярную массу 1200 Да, а соединение 5 имеет предпочтительную молекулярную массу 400 Да.

4. Ингибитор по п. 1, характеризующийся тем, что предпочтительное мольное соотношение соединений 4 и 5 составляет 1:1.



Фиг. 1

Spectrum from PE 22.03.2016 (sizeex).wiff (sample 3) - PE sample, +TOF MS (100 - 2500) from 23.389 to 25.942 min, Recalibrated

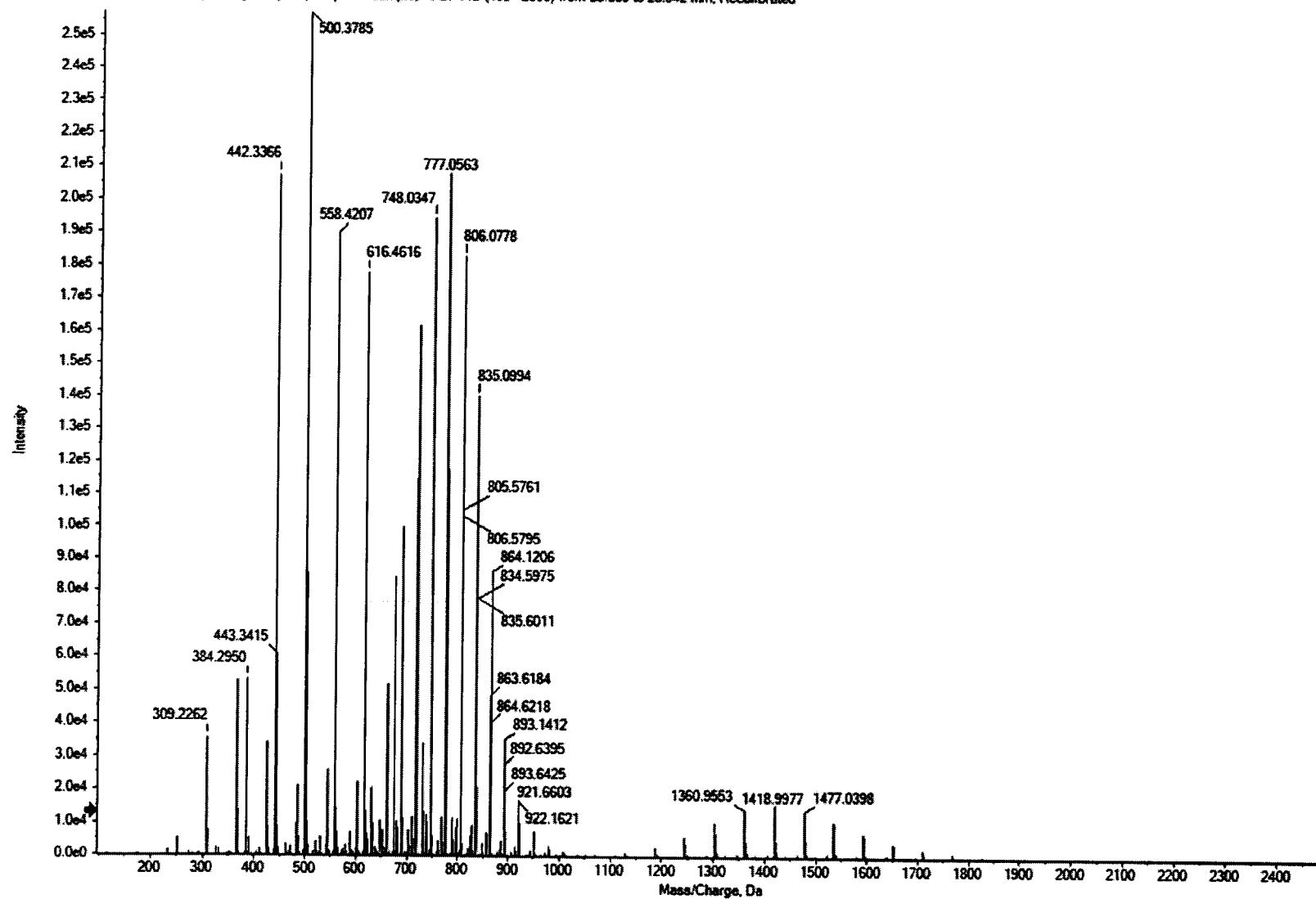


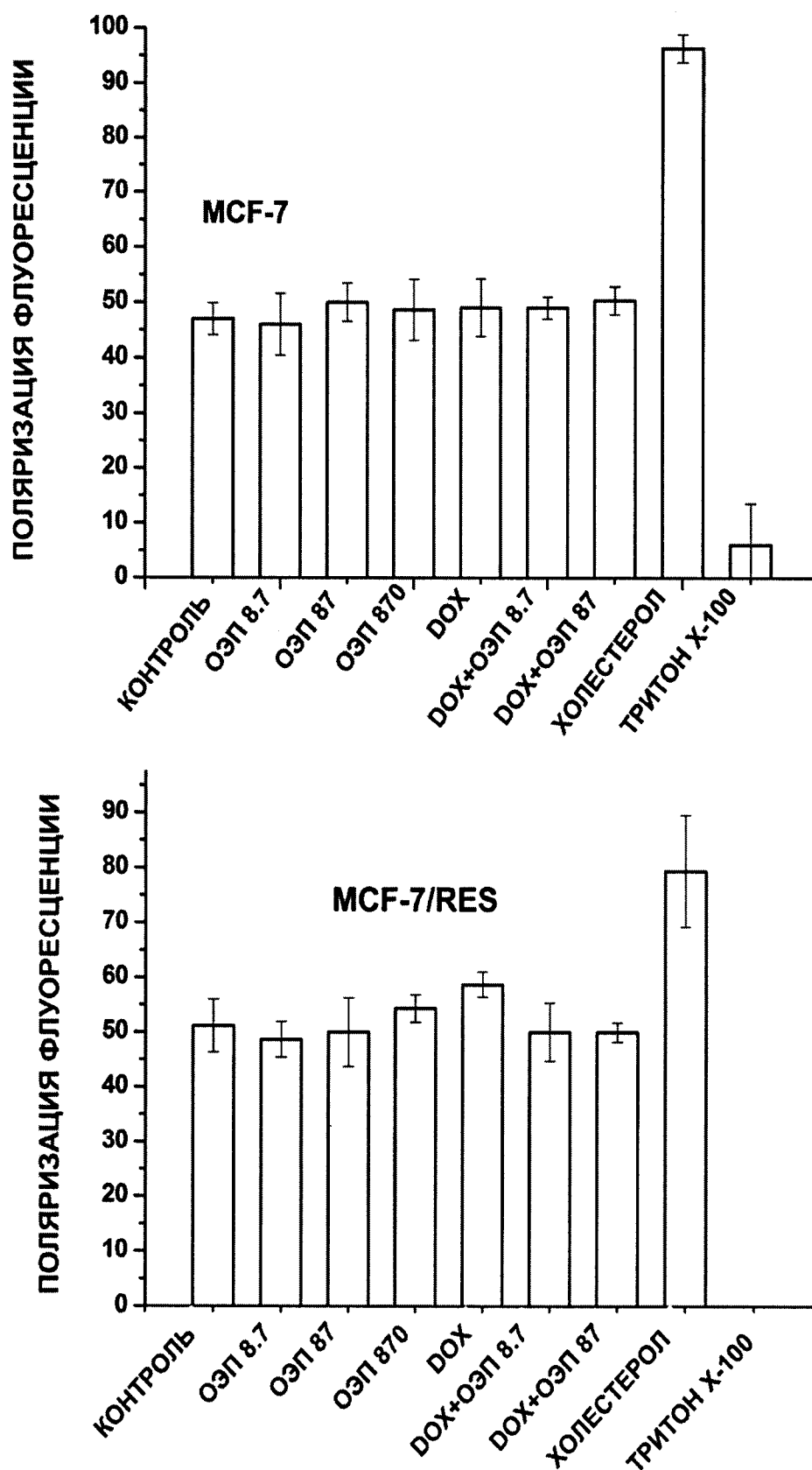
Таблица 2

	<i>HCT-116</i>	<i>M-14</i>	<i>SNB-19</i>	<i>HCT-15</i>	<i>A-498</i>	<i>HSF</i>	<i>MCF-7</i>	<i>PC-3</i>	<i>SF-539</i>	<i>OVCAR-4</i>	<i>NCI-H322M</i>	<i>CaCo-2</i>
	Колоректальная карцинома человека	Меланома кожи человека	Глиобластома человека	Колоректальная аденокарцинома человека	Карцинома почки человека	Условно нормальные фибробласты кожи человека	Аденокарцинома молочной железы человека	Аденокарцинома простаты человека	Глиосаркома человека	Аденокарцинома яичников человека	Немелкоклеточная карцинома Легкого человека	Колоректальная аденокарцинома человека
Докс, мкМ	0.094 ± 0.004	0.188 ± 0.088	0.277 ± 0.123	0.564 ± 0.381	0.799 ± 0.143	1.000 ± 0.444	1.37 ± 0.313	1.44 ± 0.639	2.63 ± 0.042	2.95 ± 0.72	5.39 ± 1.13	6.14 ± 0.431
ОЭП, мг/мл	1.690 ± 0.330	3.104 ± 1.019	0.457 ± 0.116	5.807 ± 1.095	5.827 ± 2.812	5.086 ± 0.366	1.725 ± 0.856	6.067 ± 2.476	0.3 ± 0.04	4.236 ± 1.238	2.169 ± 0.733	2.39 ± 1.499

Таблица 3

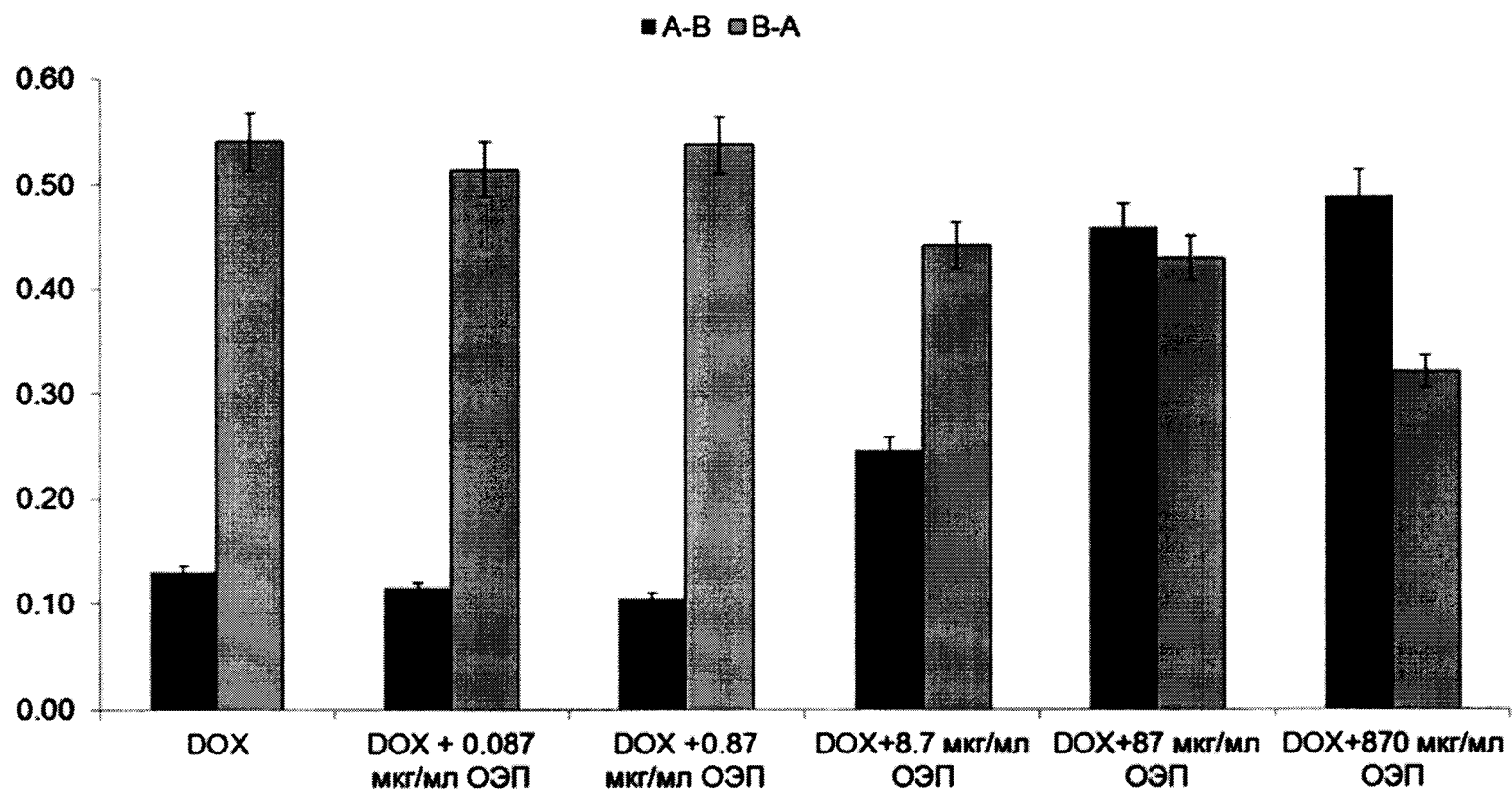
m/z иона	Пробы	С ОЭП [нМ]	v ОЭП [pmol]	m белка [mkg]	v ОЭП / m белка [pmol/mkg]
442.3368	ОЭП 8.7 мкг/мл	-	-	81.8	-
		5.93	1.19	1.50	0.7680
		31.60	6.32	22.10	0.2860
	ОЭП 87 мкг/мл	0.34	0.07	10.80	0.0064
		7.26	1.45	27.60	0.0526
		11.00	2.20	33.90	0.0651
	ОЭП 870 мкг/мл	4.36	0.87	14.30	0.0609
		7.18	1.44	15.70	0.0913
		3.29	0.66	18.10	0.0363
558.4202	ОЭП 8.7 мкг/мл	0.33	0.07	81.90	0.0008
		9.08	1.82	1.50	1.1800
		39.00	7.80	22.10	0.3530
	ОЭП 87 мкг/мл	1.98	0.40	10.80	0.0367
		12.80	2.57	27.60	0.0931
		21.80	4.35	33.90	0.1280
	ОЭП 870 мкг/мл	5.74	1.15	14.30	0.0803
		13.80	2.75	15.70	0.1750
		7.47	1.49	18.10	0.0827
616.4619	ОЭП 8.7 мкг/мл	0.78	0.16	81.90	0.0019
		15.20	3.04	1.50	1.9700
		49.50	9.89	22.10	0.4470
	ОЭП 87 мкг/мл	2.62	0.52	10.80	0.0485
		15.60	3.11	27.60	0.1130
		24.30	4.86	33.90	0.1430
	ОЭП 870 мкг/мл	5.65	1.13	14.30	0.0789
		16.80	3.36	15.70	0.2130
		7.65	1.53	18.10	0.0846

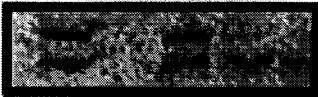
Фиг. 4

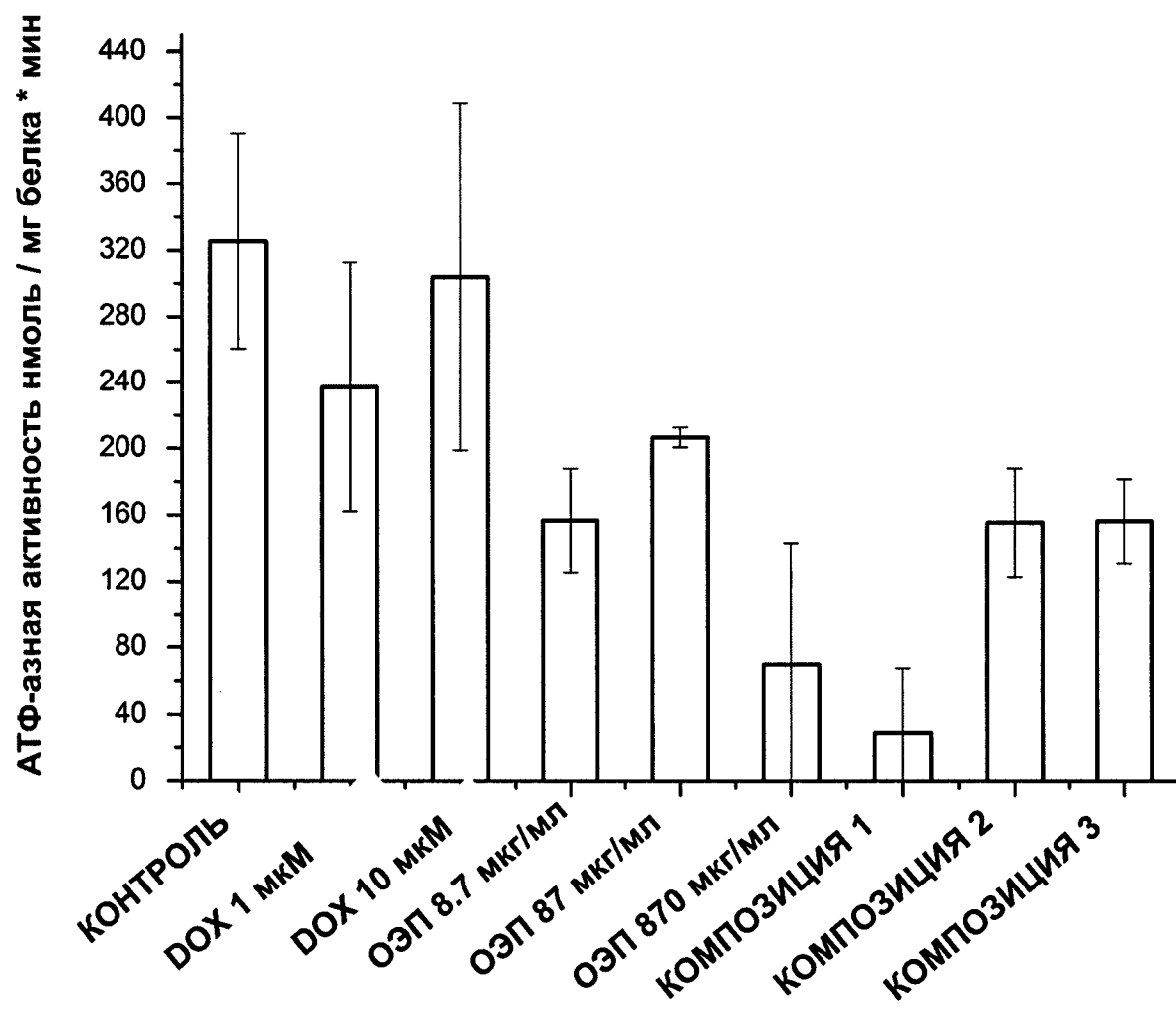


Фиг. 5

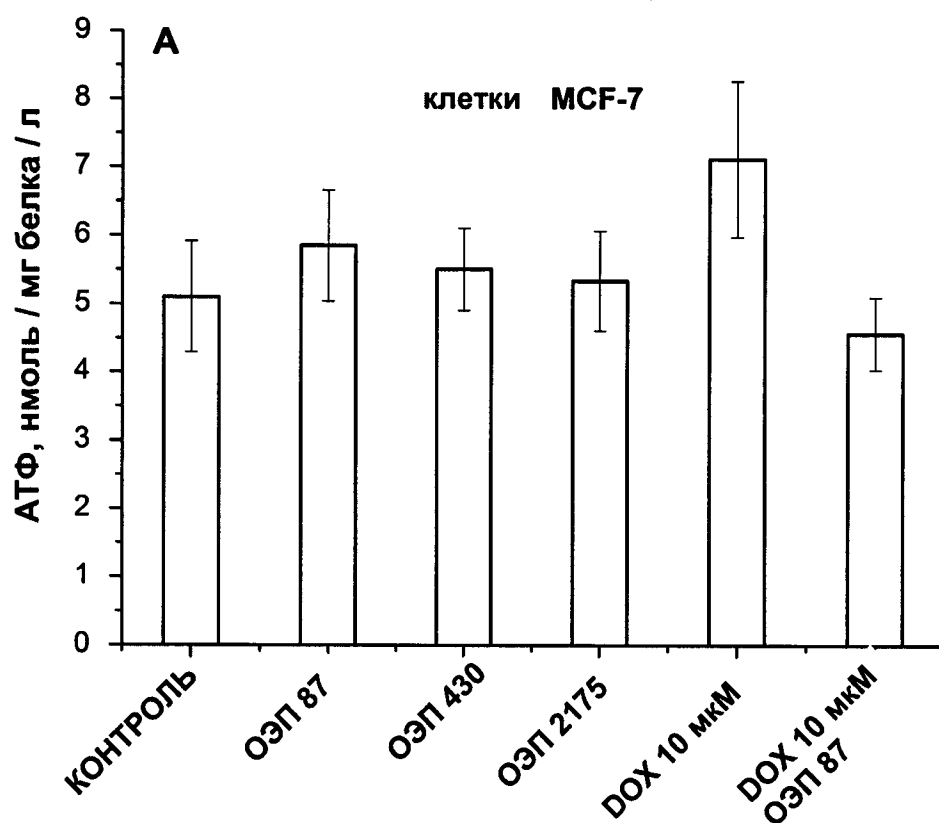
Проницаемость DOX Рарр, 10-6 см/сек



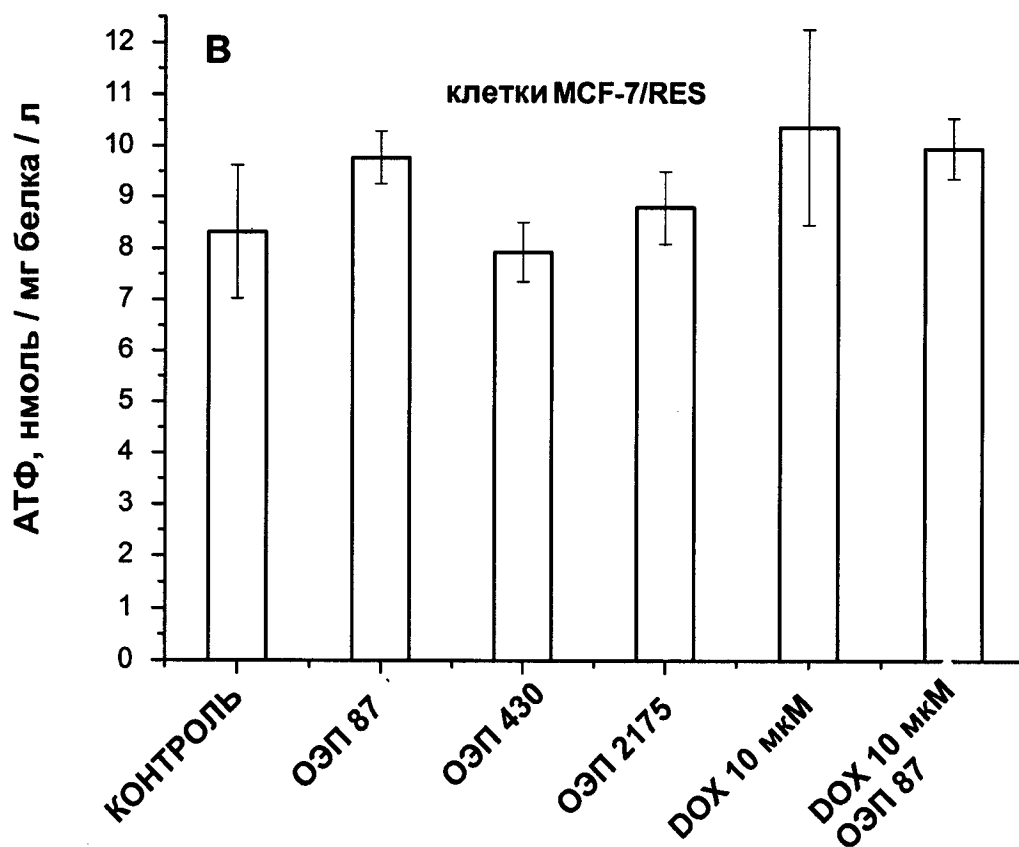
	MCF-7				MCF7-ABCC1-DsRed				MCF7-ABCC2-BFP				MCF7-ABCB1-GFP			
Доксорубин	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Олигоэфирполиол	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
ABCB1																



Фиг. 8



Фиг. 9 А



Фиг. 9 В