



(51) МПК

C07D 455/03 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 455/03 (2025.08); A61K 31/4375 (2025.08); A61K 47/55 (2025.08); A61P 35/00 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025105007, 04.03.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.03.2025Дата регистрации:
26.12.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.03.2025

(45) Опубликовано: 26.12.2025 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУ "Национальный медицинский и
исследовательский центр онкологии"
Министерства здравоохранения РФ, О.Г.
Ишонина

(72) Автор(ы):

Златник Елена Юрьевна (RU),
Филиппова Светлана Юрьевна (RU),
Сагакянц Александр Борисович (RU),
Новикова Инна Арнольдовна (RU),
Дженкова Елена Алексеевна (RU),
Межевова Ирина Викторовна (RU),
Гненная Надежда Владимировна (RU),
Енин Ярослав Сергеевич (RU),
Мироненко Ирина Николаевна (RU),
Буров Олег Николаевич (RU),
Дряпак Ангелина Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

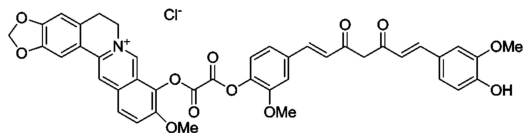
Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 108210493 B, 12.03.2019. Parisa
Samadi et al., "Berberine: A novel therapeutic
strategy for cancer", IUBMB Life, 2020, v.72,
issue 10, pages 2057-2232. Wensen Zhang et al.,
"Curcumin's prevention of inflammation-driven
early gastric cancer and its molecular
mechanism", Chin Herb Med, 2022, 14 (2), pages
244-253. US 20240398726 A1, 05.12.2024. (см.
прод.)

(54) Применение соединения, содержащего молекулы куркумина и берберина, в качестве средства, обладающего цитотоксической активностью против опухолевых клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению соединения, содержащего молекулы куркумина и берберина, в качестве средства, обладающего цитотоксической активностью в отношении клеточных линий немелкоклеточного рака легких H1299, аденокарциномы желудка AGS и аденокарциномы толстой кишки HT29. Соединение обладает высокой растворимостью

и стабильностью и проявляет избирательную цитотоксическую активность против культур опухолевых клеток и не проявляет ее против нормальных клеток (линии SC5-MSK) человека. 4 ил., 1 табл., 1 пр.



(56) (продолжение):

RU 2771527 C1, 05.05.2022. WO 2010104595 A1, 16.09.2010. RU 2670088 C1, 18.10.2018.

RU 2 8 5 3 9 1 0 C 1

RU 2 8 5 3 9 1 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 455/03 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07D 455/03 (2025.08); A61K 31/4375 (2025.08); A61K 47/55 (2025.08); A61P 35/00 (2025.08)

(21)(22) Application: 2025105007, 04.03.2025

(24) Effective date for property rights:
04.03.2025Registration date:
26.12.2025

Priority:

(22) Date of filing: 04.03.2025

(45) Date of publication: 26.12.2025 Bull. № 36

Mail address:

344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBU "Natsionalnyj meditsinskij i ssledovatel'skij
tsentr onkologii" Ministerstva zdravookhraneniya
RF, O.G. Ishonina

(72) Inventor(s):

Zlatnik Elena Yurevna (RU),
Filippova Svetlana Yurevna (RU),
Sagakyants Aleksandr Borisovich (RU),
Novikova Inna Arnoldovna (RU),
Dzhenskova Elena Alekseevna (RU),
Mezhevova Irina Viktorovna (RU),
Gnennaya Nadezhda Vladimirovna (RU),
Enin Yaroslav Sergeevich (RU),
Mironenko Irina Nikolaevna (RU),
Burov Oleg Nikolaevich (RU),
Dryapak Angelina Nikolaevna (RU)

(73) Proprietor(s):

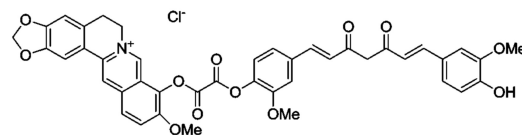
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr onkologii" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)(54) USE OF COMPOUND CONTAINING CURCUMIN AND BERBERINE MOLECULES AS MEANS
POSSESSING CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST TUMOUR CELLS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

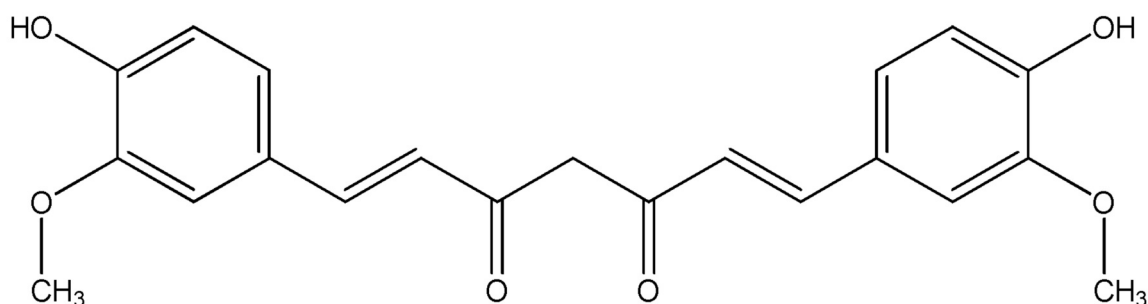
SUBSTANCE: invention relates to the use of a
compound containing curcumin and berberine molecules
as a means possessing cytotoxic activity against cell
lines of non-small cell lung cancer N1299, gastric
adenocarcinoma AGS and colon adenocarcinoma HT29.EFFECT: compound has high solubility and stability
and exhibits selective cytotoxic activity against tumourcell cultures and does not exhibit it against normal
human cells (SC5-MSK line).

1 cl, 4 dwg, 1 tbl, 1 ex



Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано в качестве нового соединения, потенциально эффективного на моделях немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы толстой кишки и рака желудка. Оно включает новое соединение и способ его получения, а также подтверждение цитотоксической активности *in vitro*.

Широко известен тот факт, что полученные из лекарственных растений активные соединения, такие как алкалоиды, полифенолы, полисахариды, терпены, цианидины и т. д. могут обладать цитостатическим либо цитотоксическим действием. Куркумин (1,7-бис-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-гепта-1,6-диен-3,5-дион) - кислотное полифенольное соединение, широко присутствующее в растении *Curcuma longa* (L.) с множественными фармакологическими действиями, имеет следующую химическую структуру.



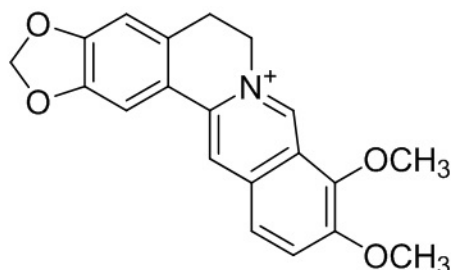
(1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione
Molecular Weight: 368,38

Многочисленные публикации указывают на то, что куркумин обладает сильным цитостатическим действием по отношению к различным опухолевым клеткам, ингибирует пролиферацию, миграцию и метастазирование опухолевых клеток, а также индуцирует их апоптоз (см. Ming T, Tao Q, Tang S, Zhao H, Yang H, Liu M, Ren S, Xu H. Curcumin: An epigenetic regulator and its application in cancer. Biomed Pharmacother. 2022 Dec;156:113956. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113956. Epub 2022 Nov 2. PMID: 36411666).

Также известно, что куркумин проявляет значительную противовоспалительную и противоопухолевую активность за счет эпигенетического регулирования (см. Zhang W, Cui N, Ye J, Yang B, Sun Y, Kuang H. Curcumin's prevention of inflammation-driven early gastric cancer and its molecular mechanism. Chin Herb Med. 2022 Mar 26;14(2):244-253. doi: 10.1016/j.chmed.2021.11.003. PMID: 36117672; PMCID: PMC9476644). Исследования *in vitro* показывают, что куркумин значительно увеличивает экспрессию микроРНК-34а в клетках рака желудка SGC-7901 и препятствует пролиферации, миграции и инвазии клеток SGC-7901 (см. Sun C, Zhang S, Liu C, Liu X. Curcumin Promoted miR-34a Expression and Suppressed Proliferation of Gastric Cancer Cells. Cancer Biother Radiopharm. 2019 Dec;34(10):634-641. doi: 10.1089/cbr.2019.2874. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31539270). Однако, при этом клинические исследования показали, что ежедневная доза 8 г (считающаяся высокой) куркумина не оказывает влияния на организм человека, т.к. чистый куркумин обладает низкой растворимостью в воде, низкой абсорбцией, быстрым системным выведением из организма, и ограниченной биодоступностью при пероральном приеме. Лишь небольшая часть куркумина, поступившая перорально, адсорбируется в кишечнике (см. Racz LZ, Racz CP, Pop LC, Tomoaia G, Mocanu A, Barbu I, Sárközi M, Roman I, Avram A, Tomoaia-Cotisel M, Toma VA. Strategies for Improving Bioavailability, Bioactivity, and Physical-Chemical Behavior of Curcumin. Molecules. 2022 Oct 13;27(20):6854. doi: 10.3390/molecules27206854. PMID: 36296447; PMCID: PMC9608994). Исходя из выше изложенных

фактов куркумин может быть применен как противоопухолевый препарат, при условии, что будут решены проблемы, связанные с его растворимостью в воде, липофильностью и биодоступностью.

Берберин - широко известный изохинолиновый алкалоид с множеством биологических эффектов, выделяемый из растений рода *Berberis* sp. который использовался в медицине на протяжении многих лет (см. Habtemariam S. Berberine pharmacology and the gut microbiota: A hidden therapeutic link. Pharmacol Res. 2020 May;155:104722. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104722. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105754). Химическая структура имеет следующее строение:



9,10-dimethoxy-5,6-dihydro-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-ium

Chemical Formula: $C_{20}H_{18}NO_4^+$

Molecular Weight: 336,36

Берберин привлек внимание к себе в виду низкой цитотоксичности по отношению к неопухолевым клеткам и широкого спектра фармакологических действий, включая противовирусное, гипогликемическое, противовоспалительное, гипотензивное, противоопухолевое действия (см. Samadi P, Sarvarian P, Gholipour E, Asenjan KS, Aghebati-Maleki L, Motavalli R, Hojjat-Farsangi M, Yousefi M. Berberine: A novel therapeutic strategy for cancer. IUBMB Life. 2020 Oct;72(10):2065-2079. doi: 10.1002/iub.2350. Epub 2020 Jul 31. PMID: 32735398). Накопленные за последние десятилетия исследования показали, что берберин обладает значительным противоопухолевым эффектом. Он может подавлять пролиферацию, метастазирование и инвазивность опухолевых клеток. У него показана возможность индукции апоптоза, по путям соответствующим сигнальным путям AMPK, MAPK и AKT (см. Zhu Y, Xie N, Chai Y, Nie Y, Liu K, Liu Y, Yang Y, Su J, Zhang C. Apoptosis Induction, a Sharp Edge of Berberine to Exert Anti-Cancer Effects, Focus on Breast, Lung, and Liver Cancer. Front Pharmacol. 2022 Jan 27;13:803717. doi: 10.3389/fphar.2022.803717. PMID: 35153781; PMCID: PMC8830521). Однако при всем выше сказанном биодоступность куркумина и берберина как двух самостоятельных соединений остается низкой.

Пероральная биодоступность и всасывание берберина в кишечнике низкая. В исследовании на животных, проведенном на крысах, берберин (2,5 мг/кг) вводили внутривенно, и C0 (начальная концентрация в плазме) составляла 2,833 мкг/мл, а при пероральном введении крысам дозы 400 мг/кг берберина Cmax составляла 0,260 мкг/мл (см. Khoshandam A, Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacokinetic of berberine, the main constituent of *Berberis vulgaris* L.: A comprehensive review. Phytother Res. 2022 Nov;36(11):4063-4079. doi: 10.1002/ptr.7589. Epub 2022 Oct 11. PMID: 36221815).

Берберин представляет собой планарный липофильный катион с высокой тропностью как к различным клеточным мембранам, так и к митохондриям по причине разности зарядов. Особенно сильно выражена таргетность берберина к мембранам митохондрий опухолевых клеток, по причине того, что трансмембранный потенциал митохондрий опухолевых клеток аномально высокий ($\Delta\Psi_m$), в отличие от трансмембранного

потенциала не опухолевых клеток (см. Begum HM, Shen K. Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells. WIREs Mech Dis. 2023 May-Jun;15(3):e1595. doi: 10.1002/wsbm.1595. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36597256; PMCID: PMC10176868). Берберин потенциально рассматривается многими

5 исследователями в качестве cargo (адресного доставщика) фармацевтически активного фрагмента в опухолевые клетки. Он, как отдельная молекула, в значительной мере обладает противоопухолевым потенциалом, а значит использование его в качестве cargo для цитостатического препарата может существенным образом усилить действие последнего.

10 В качестве аналогов изобретения мы рассматриваем те из них, которые направлены на повышение водорастворимости и биодоступности куркумина и берберина, а также их противоопухолевой активности. В ряде патентов предлагается использование композиций, содержащих куркумин и/или берберин или новых веществ, содержащих их.

15 В патенте №2750992 C2 (см. Бюл. №19 от 07.07.2021) по одному из вариантов содержащая куркумин. Однако, авторами исследовано действие на нормальные эпителиальные клетки простаты (PrEC), а не опухолевые, что не позволяет судить об ее противоопухолевом действии.

20 Авторами найдены патенты, направленные на повышение растворимости в воде куркумина и берберина. В патенте №2615815 (см. Бюл. №11 от 11.04.2017) предлагается солюбилизат, состоящий из куркумина и по меньшей мере, одного эмульгатора, а именно Полисорбата 80 или Полисорбата 20 или смеси из Полисорбат 20 и Полисорбат 80, что позволяет получить его мицеллированную форму. Однако, в патенте не описано действие полученного вещества на культуры клеток.

25 В патенте №2771527 (см. Бюл. №13 от 05.05.2022)получена стабильная водорастворимая комбинация активных веществ, обеспечено предотвращение выпадения куркумина в осадок. Авторы указывают, что токсичность, обусловленную мицеллизацией активного вещества по изобретению, в сравнении с его нативной формой, можно исключить по результатам исследований с проведением МТТ-тестов на
30 жизнеспособность клеток. Таким образом, авторами предложена комбинация, а не вещество и не исследовано действие солюбилизата на опухолевые клетки.

В патенте №2808324 (см. Бюл. №34 от 28.11.2023) в частности,способ, включающий приготовление вводимого неводного раствора куркуминоида, более конкретно, включающий растворение куркуминоида в глицерине. Однако, не приводятся данные
35 о действии вещества на культуры клеток.

В патенте № 2665378 (см. Бюл. № 25 от 29.08.2018) предложено использование спиртового коллоидного раствора нанокристаллического диоксида церия, стабилизированного поливинилпирролидоном, предотвращает деградацию куркумина в процессе получения композита. Процесс сушки обеспечивает стабильность композита
40 при последующем хранении и позволяет получать композит с широким диапазоном заданных концентраций. Однако, как и в вышеупомянутых патентах, в патенте низкая цитотоксичность полученного вещества рассматривается как его положительное свойство, тогда как это справедливо только для клеток нормальных тканей, но не опухолевых.

45 В патенте №2788599 (см. Бюл. №3 от 23.01.2023) предложена композиция берберина и белков гороха, способствующая повышению его растворимости в водной среде, что устраняет наибольшее препятствие для всасывания в кишечнике, а также гарантирует более высокую биодоступность его активного ингредиента в присутствии ингибитора

P-гр верапамила, что подтверждает важность этого клеточного механизма во всасывании берберины в нижнем отделе кишечника. На основании тестирования фармакокинетики берберины приводятся данные об улучшении его биодоступности *in vivo* при использовании данной композиции. Авторы предлагают композицию для

предупреждения и/или лечения дислипидемии и/или гиперхолестеринемии, и/или метаболического синдрома, и/или сердечно-сосудистого заболевания и не проводили исследования действия композиции на культуры опухолевых и нормальных клеток.

В патенте №2733743 (см. Бюл. №28 от 06.10.2020) предложен способ лечения и/или предотвращения кожной токсичности, вызванной таргетной терапией, содержащий введение пациенту фармацевтической композиции для местного применения, содержащей от 0,1 до 0,3% масс. берберины, а указанная таргетная терапия выбрана из группы, состоящей из ингибиторов MEK, ингибиторов HER2 и ингибиторов mTOR. Изобретение, хотя и имеет отношение к онкологии, не описывает противоопухолевого действия берберины, а направлено на предотвращение нежелательных явлений таргетной терапии.

В патенте №2670088 (см. Бюл. №29 от 18.10.2018) представлен технический результат - получено новое соединение - соль мангиферин-6-О-берберины, которая может быть использована в качестве АМРК активатора и найти свое применение в медицине для лечения метаболических, кардиоваскулярных, неврологических и воспалительных заболеваний, рака и заболеваний мышечных систем. Однако, АМРК активатор, которому авторы придают приоритетное значение, известен как универсальный активатор метаболизма и применяется в виде БАД в качестве сжигателя жира. Получил громкое рекламное название «Life Extension», поскольку считается, что многие заболевания связаны с ожирением. Однако, несмотря на то, что авторы среди них указывают рак, в описании изобретения отмечены только доброкачественные опухоли (гиперплазии) молочной и предстательной желез.

В патенте №2814497 (Бюл. №7 от 29.02.24) предложен способ получения растворимой в воде формы препарата на основе берберины, характеризующийся тем, что в качестве действующего вещества используется порошок берберины, в качестве растворителя берут 1-метил-2-пирролидон при температуре 40 °С и при постоянном перемешивании добавляют в него порошок берберины, полученную смесь перемешивают до полного растворения, и, продолжая перемешивать, добавляют в качестве поверхностно-активного вещества кремофор EL, а через 15 мин, продолжая перемешивать, добавляют воду, доводя объем раствора до 100 мл, при следующем соотношении компонентов. Хотя способ и может играть существенную роль в увеличении биодоступности берберины и таким образом влиять на его активность, авторами не приводятся данных о его влиянии на культуры опухолевых и неопухолевых клеток.

Задачей изобретения является получение нового вида соединения, обладающего высокой водорастворимостью и стабильностью, которое позволит реализовать в полной мере противоопухолевый потенциал обеих молекул (куркумина и берберины).

Техническим результатом предлагаемого нами изобретения является получение вещества, обладающего свойствами куркумина и берберины, растворимостью в воде, что позволяет повысить его биодоступность, и проявляющего избирательное цитотоксическое действие *in vitro* против культур опухолевых клеток.

Технический результат достигается тем, что для улучшения физико-химических характеристик обоих соединений мы присоединили куркумин через гидролизуемый линкер к молекуле берберины. Химическая "сшивка" берберины и куркумина через гидролизуемый линкер позволит обеспечить несколько уровней действия нового соединения: 1) интегральное действие всей гибридной молекулы в целом на опухолевую

клетку; 2) дифференциальное действие активных метаболитов - куркумина и берберрубина (метаболита берберины). Образование активных метаболитов в опухолевой клетке должно происходить под действием широкого спектра гидролаз (эстераз). Вне зависимости от механизма действия полученного соединения, создание гибридного соединения обеспечивает высокую таргетность структуры и значительную проникающую способность (по сравнению и немодифицированным куркумином).

Изобретение «Соединение, обладающее цитотоксической активностью против опухолевых клеток *in vitro* немелкоклеточного рака легких человека, аденокарциномы желудка, аденокарциномы толстой кишки и способ его получения» является новым, так как оно неизвестно в области онкологии при разработке и оценке действия новых противоопухолевых соединений на основе вторичных метаболитов растений.

Новизна изобретения заключается в том, что путем химического синтеза получено новое соединение, объединяющее молекулы куркумина и берберины, каждое из которых, по данным патентной и информационной литературы, обладает противоопухолевым эффектом, но вследствие плохой водорастворимости, низкой биодоступности и нестабильности не нашли широкого применения. Предлагаемая молекула полученного соединения обладает долгосрочной стабильностью (90 дней) в виде порошка, водорастворимостью и стабильностью в водных растворах в течение 7 дней, фотостабильностью в течение 72 часов непрерывного облучения. Соединение проявляет избирательную цитотоксическую активность против культур опухолевых клеток и не проявляет ее против нормальных клеток (линии SC5-MSK) человека.

Для лучшего понимания представляем фигуры.

Фиг. 1. Спектры поглощения UV-vis водных растворов берберины при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Фиг. 2 Сравнительная характеристика жизнеспособности клеток различных культур при инкубации с куркумоберберинном.

Фиг. 3. Культуры H1299, HT29. Слева контроль, справа - 7,14 мМ КБ. 10X.

Фиг. 4. Культуры H129, HT29, окрашивание Ноеchst. Слева контроль, справа - 7,14 мМ КБ. 10X.

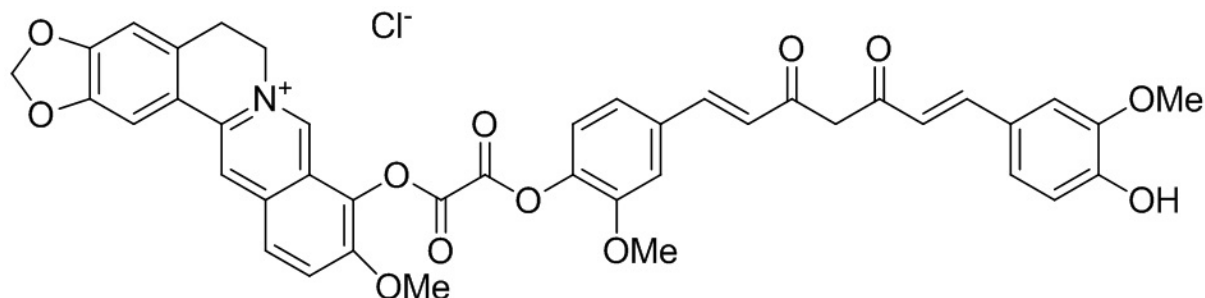
Изобретение «Органическое соединение, обладающее цитотоксической активностью против опухолевых клеток *in vitro* немелкоклеточного рака легких человека, аденокарциномы желудка, аденокарциномы толстой кишки и способ его получения» является промышленно применимым и может быть воспроизведено и исследовано на животных моделях опухолевого роста, в частности, рака легкого, а в дальнейшем может быть применено для лечения онкологических больных с данным вариантом злокачественного процесса.

Изобретение выполняется следующим образом.

Методика получения. К раствору 1 ммоль (340 мг) берберрубина в 10 мл абсолютного ацетонитрила по каплям прибавляли раствор 1.5 ммоль аксолилхлорида в 5 мл абсолютного ацетонитрила. Раствор перемешивали 10 минут на магнитной мешалке до прекращения изменения цвета с красного на желто-оранжевый. Далее по каплям прибавляли раствор 2 ммоль куркумина в абсолютном ацетонитрила и перемешивали 15 минут на магнитной мешалке пока не сформируется осадок оранжевого цвета. Осадок отфильтровывали на фильтре Шотта (16 пор/мм^2) и промывали холодным ацетонитрилом и диэтиловым эфиром. Осадок перекристаллизовывали из ацетонитрила и сушили над ангидроном в вакуум-эксикаторе. Выход 76%, оранжевые игольчатые кристаллы, Тпл. 124-126°C.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ : 3.26 - 3.12 (м, 2H), 3.96 (с, 6H), 4.12 (с, 3H), 4.31 (м, 2H), 4.93 (т, $J = 6.2$ Гц, 1H), 5.91 (с, 2H), 6.13 (с, 2H) 6.48 (д, $J=15.8$ Гц, 2H), 6.94 (д, $J=8.2$ Гц, 2H), 7.05-7.06 (м, 2H), 7.11 - 7.15 (м, 2H), 7.52 - 7.54 (м, 1H), 7.60 (д, $J=15.8$ Гц, 2H), 7.71-7.74 (м, 1H), 7.75 (с, 1H), 7.98 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H), 8.14 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H), 8.88(с, 1H), 9.81 (с, 1H). ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ : 194.9, 164.5, 161.4, 159.1, 150.1, 148.1, 149.8, 149.5, 148.5, 146.3, 145.8, 142.7, 144.2, 137.1, 132.9, 131.0, 128.5, 127.3, 126.0, 123.8, 122.8, 122.2, 121.1, 120.3, 118.6, 116.2, 118.1, 111.5, 111.4, 108.9, 105.8, 102.5, 57.5, 56.19, 55.4, 54.3, 26.93.

Структурная формула соединения, его брутто формулу и молекулярный вес



Molecular Weight: 780,1719

Полученное соединение в отличие от стокового куркумина хорошо растворимо в воде, растворимость в воде более 2 г/л при температуре 20 °С.

Определение стабильности. Определение фотостабильности. Определение фотостабильности производилось в соответствии с ОФС «Определение фотостабильности лекарственных средств». Для выявления фотостабильности использовались два различных образца. В стеклянную чашку Петри (100*20; 90*20), помещался порошок полученного соединения толщиной менее 1 мм и экспонировался под люминисцентной лампой в световом потоке 20000 Лк в течение 72 часов при температуре 22 °С. После экспонирования проводили регистрацию спектра поглощения UV-vis раствора образца при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л с использованием спектрометра Shimadzu UV-2600. По результатам исследования выявлено, что появления дополнительных полос поглощения не происходит.

Долгосрочные исследования стабильности проводились в соответствии с ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных препаратов аптечного изготовления». Для выявления долгосрочной стабильности полученного соединения использовались два различных образца субстанции, полученных в разные дни. В стеклянную чашку Петри (100*20; 90*20), помещался порошок полученного соединения толщиной менее 1 мм и выдерживался в сушильном шкафу при температуре 25° С и относительной влажности 65 % в течение 90 дней. Аналогичным образом провели исследование стабильности лекарственных препаратов при температуре минус 18°С. После выдерживания образцов в течение 45 и 90 дней проводили пробоотбор и регистрацию спектров поглощения UV-vis раствора образца при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л с использованием спектрометра Shimadzu UV-2600. По результатам исследования выявлено, что изменений в спектрах поглощения и появления дополнительных полос поглощения не происходит по сравнению с образцом перед испытаниями.

Исследования стабильности водных растворов проводились в соответствии с ОФС

«Аспекты стабильности лекарственных средств». Для выявления стабильности полученного соединения в водных растворах использовались два различных образца субстанции, полученных в разные дни, каждый из которых был использован для приготовления двух серий растворов с концентрациями 1 мг/л и 10⁻⁵ моль/л.

5 Образец полученного соединения с концентрацией 1 мг/л помещался в колориметрическую кювету и выдерживался при температуре 20 °С в течение 7 дней. В ходе проведения исследования образование осадка, признаки микробиологического загрязнения или выделение газа не зафиксировано.

10 Раствор полученного соединения с концентрацией 1*10⁻⁵ моль/л помещался в колориметрическую кювету и выдерживался при температуре 20 °С в течение 7 дней. После выдерживания образцов проводили регистрацию спектров поглощения UV-vis раствора с использованием спектрометра Shimadzu UV-2600. По результатам исследования выявлено, что появления дополнительных полос поглощения не происходит по сравнению с образцом перед испытаниями (см. Фиг. 1).

15 Однако в спектре поглощения водных растворов полученного соединения через неделю отмечается гипохромный эффект для полосы поглощения 357 нм с 1,62 до 1,57 единиц в шкале интенсивности и гиперхромный эффект полосы 445 нм с 0,40 до 0,41 единицы связанные с изменением сольватной оболочки, характерной для берберинов (изменение степени гидратации), что не приводит к деструкции или изменению
20 фармакологической активности субстанций.

Цитотоксичность полученного соединения оценивали по действию на клеточные линии H1299 (немелкоклеточная карцинома легких человека), AGS (аденокарцинома желудка) и HT29 (аденокарцинома толстой кишки). В качестве объекта сравнения была использована линия мезенхимальных стволовых клеток SC5-MSC. Эксперимент был
25 проведен с использованием метода МТТ, в основе которого лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в ДМСО. Уменьшение оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными, регистрируемое на двухрежимном планшетном ридере Tecan Infinite®
30 M Nano Plus свидетельствует о цитотоксическом действии испытуемого вещества на клетки.

Клеточные линии H1299, AGS, HT29 и SC5-MSC культивировали в полной среде DMEM с добавлением 10% ФСК и 1% гентамицина. Клетки высаживали на 96-луночный планшет в количестве 5 тыс. клеток на лунку. После адгезии клеток ко дну планшета
35 среду культивирования заменяли на среду, содержащую полученное органическое соединение серий двукратных разведений в диапазоне концентраций от 0,008789 мМ/л до 7,14 мМ/л. В контрольные лунки вносили среду без содержания тестируемого вещества. Планшеты культивировали при 37°С и 5,0% CO₂. МТТ тест проводили с экспозицией 72 часа культивирования по стандартной методике. Для считывания
40 показаний оптической плотности использовали ридер Tecan Infinite® M Nano Plus (Швейцария).

Результаты представлены в таблице 1 и на фигурах 2-4.

Таблица 1

45 Влияние различных концентраций полученного соединения на выживаемость опухолевых и нормальных клеток.

Концентрации, мМ/л	Количество живых клеток, % от показателей в контроле			
	H1299	AGS	HT29	SC5-MSC
3,57	44,63	35,8	45,6	90,3

7,14	33,44	22,5	38,2	70,25
------	-------	------	------	-------

Как видно из табл. 1, концентрации КБ ниже 3,75 мМ/л не оказывали заметного влияния на результат МТТ-теста. При использовании наиболее высокой концентрации КБ (7,14 мМ/л) отмечено цитостатическое действие на культуру SC5-MSC и цитотоксическое действие, а именно, разрушение опухолевых клеток всех исследованных культур. Инкубация с КБ в концентрации 3,57 мМ/л не вызывала выраженного цитостатического эффекта на нормальные клетки при наличии цитотоксичности против опухолевых.

На Фиг. 2 представлены кривые, характеризующие процент живых клеток исследованных культур при инкубации с различными концентрациями КБ, которые для большей наглядности графика представлены в мкМ/л.

Как видно из представленных на нем данных, при действии концентраций КБ, начиная с 320 мкМ/л и выше, происходит выраженное угнетение роста всех исследованных опухолевых культур, тогда как неопухолевая сохраняет большую жизнеспособность. Хотя количество живых клеток в последней при высоких концентрациях КБ тоже сокращается, не отмечено ее разрушения, в отличие от культур опухолевых клеток, которые иллюстрируют Фиг. 3, 4

Как видно из Фиг. 4, морфология злокачественных клеток значительно меняется - ядра становятся крупнее, клетки распластанные, в культуре HT29 появляется мигрирующий край. Наблюдаются признаки апоптоза. У SC5-MSC при тех же дозах и выше подобных признаков не наблюдается, только снижается конfluence, размер клеток, хотя и увеличивается, но морфология остаётся типичной.

При окрашивании ядерным красителем Hoechst видно, что в опухолевых клетках происходит нарушение последних этапов деления - телофазы и кариокинеза.

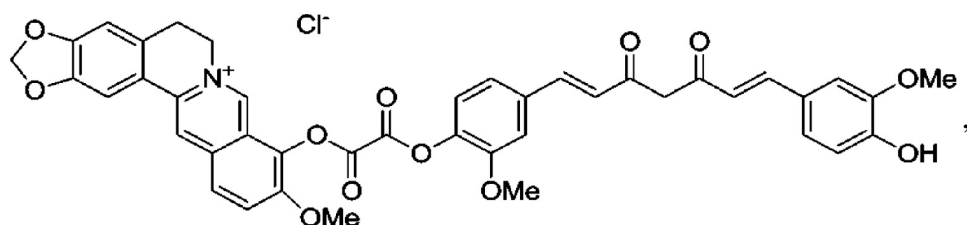
Наблюдаются многоядерные клетки с разными по форме и размерам ядрами.

Новое органическое соединение проявляет выраженное цитотоксическое действие на культуры ряда опухолевых клеток, что позволяет расценивать его как соединение, обладающее избирательной противоопухолевой активностью *in vitro*, перспективное для дальнейшей разработки.

Технико-экономическая эффективность изобретения заключается в том, что его применение позволит получить новое вещество, растворимое в воде, биодоступно, потенциально обладающее противоопухолевой активностью против опухолевых клеток *in vitro* немелкоклеточного рака легких человека, аденокарциномы желудка, аденокарциномы толстой кишки.

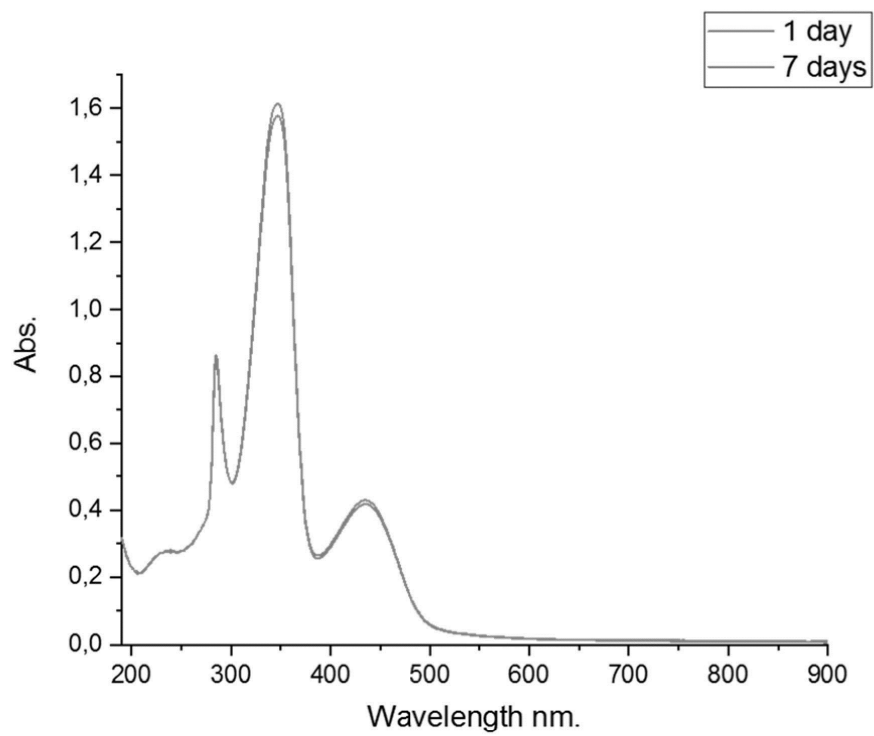
(57) Формула изобретения

Применение соединения, представляющего собой



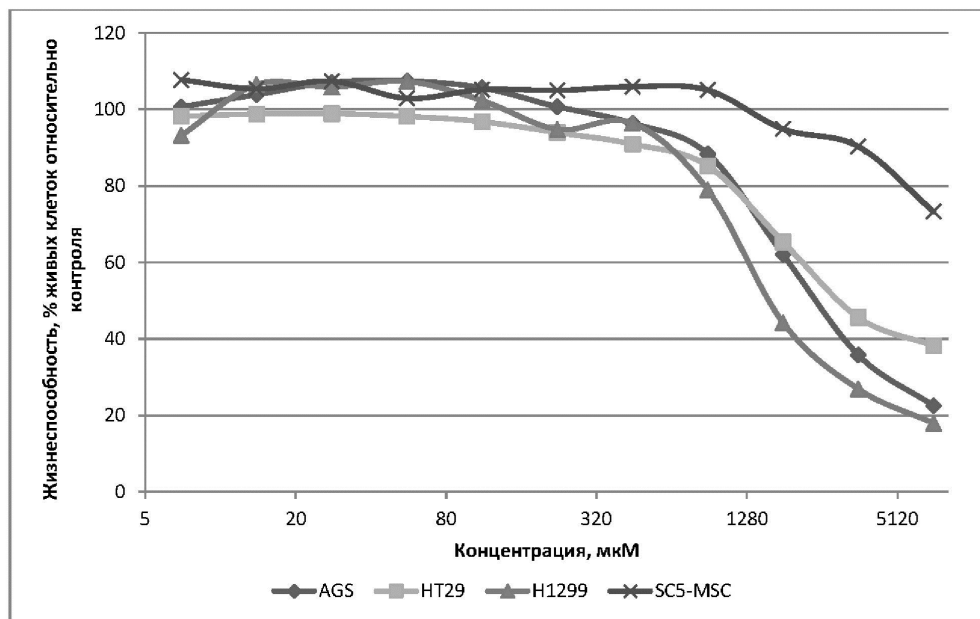
в качестве средства, обладающего цитотоксической активностью в отношении клеточных линий немелкоклеточного рака легких H1299, аденокарциномы желудка AGS и аденокарциномы толстой кишки HT29.

1

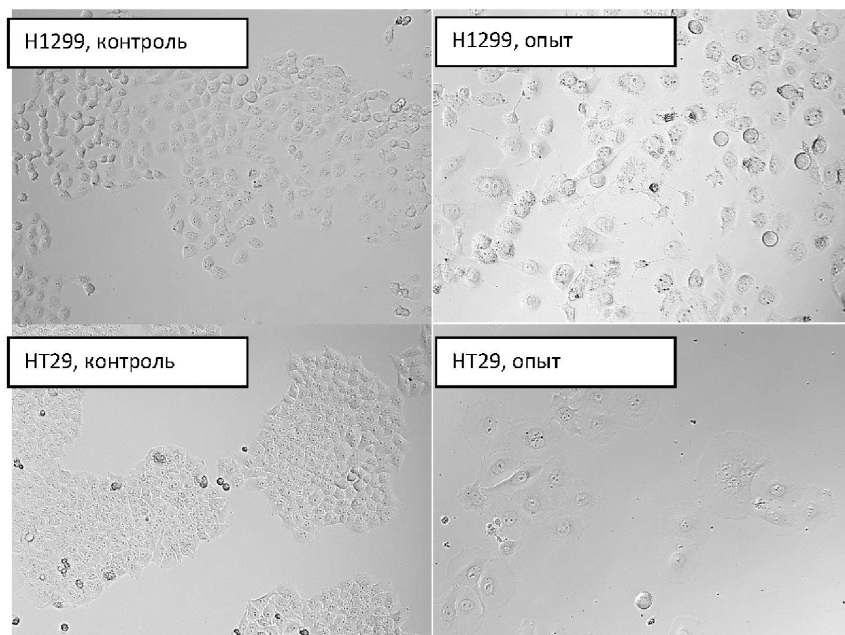


Фиг. 1

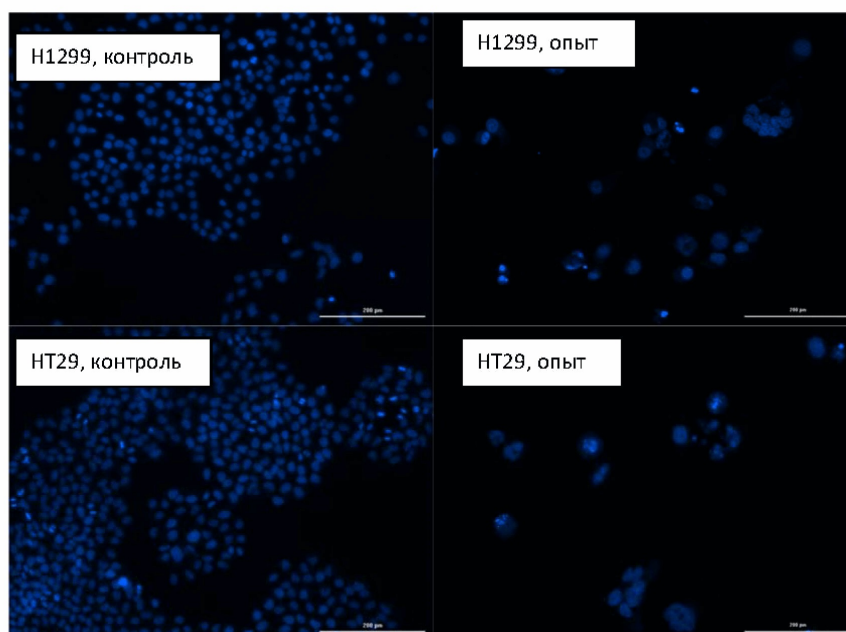
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4