

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046351**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.04

(21) Номер заявки
202190753

(22) Дата подачи заявки
2019.09.30

(51) Int. Cl. *A61K 33/00* (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **СОСТАВ, СОДЕРЖАЩИЙ ОЗОНИРОВАННОЕ МАСЛО, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛИ**

(31) **102018000009063**

(32) **2018.10.01**

(33) **IT**

(43) **2021.06.28**

(86) **PCT/IB2019/058298**

(87) **WO 2020/070623 2020.04.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОЗ ЗОУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Кароччи Джанкарло (ES)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DATABASE WPI, Week 201727,
Thomson Scientific, London, GB; AN 2017-08542Q
XP002792134, & CN 106 265 722 A (HOUJ), 4
January 2017 (2017-01-04), abstract
WO-A2-2008050157
US-A1-2006074129

(57) Описан состав, содержащий по меньшей мере одно озонированное масло для применения в предотвращении и/или лечении опухоли, предпочтительно злокачественной опухоли. Состав предназначен для применения введением, выбранным из перорального, местного, инъекционного и их комбинаций. Опухоль выбрана из солидной опухоли; кожной опухоли; опухоли слизистой оболочки и опухоли жидких тканей.

046351

B1

046351
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению состава, содержащего озонированное масло, в предотвращении и/или лечении опухоли, в частности злокачественной опухоли (рака).

Предшествующий уровень техники

Неопластическая клетка отличается от нормальной во многих аспектах, включая блокировку митохондриальной функции, направленную на подавление апоптоза (спонтанной гибели клеток), что представляет собой фундаментальное препятствие для развития рака. Митохондриальная блокировка, возникающая в неопластической клетке, известна как эффект Варбурга.

Недавние экспериментальные исследования показывают, что неопластическим клеткам в их росте благоприятствуют молекулы антиоксидантов, но противоположный эффект дают прооксидантные ситуации. В частности, раковые стволовые клетки, которые вызывают устойчивость к химио-/лучевой терапии и рецидивам, характеризуются восстанавливающей средой и, следовательно, являются очень чувствительными к цитотоксическим эффектам окислительного повреждения (Zhou et al., Reactive oxygen species in normal and tumour stem cells. *Adv Cancer Res.* 2014; 122:1-67). Митохондрия представляет собой главный эндогенный источник окислительных молекул.

Таким образом, сегодня усиление окислительного повреждения представляет собой стратегию лечения рака (Liu et al., 2015, Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* Article ID294303).

Были предприняты некоторые попытки применять озон в качестве источника окисляющих частиц в терапии рака. В частности, применяли газообразный озон (Rossmann et al., Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable. *Clin Cancer Res.* 2014; 20 (16):4289-4301) или в виде озонированного водного раствора путем инъекции (Kuroda et al., The Safety and Anti-Tumor Effects of Ozonated Water in Vivo. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(10): 25108-25120). Данные исследования показали специфическое цитотоксическое действие на опухолевую ткань при отсутствии повреждения здоровых тканей. Однако полученный терапевтический эффект был значительным, но временным.

Таким образом, в данной области ощущается потребность в обеспечении состава на основе озонирующих веществ для профилактики и/или лечения опухоли, в частности злокачественной опухоли (рака), который преодолевает недостатки и ограничения составов предшествующего уровня техники.

Таким образом, техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении состава, содержащего озонирующие вещества, который является эффективным в предотвращении и/или лечении опухоли, в частности злокачественной опухоли (рак), который оказывает пролонгированный терапевтический эффект с течением времени.

Злокачественная опухоль может представлять собой солидную опухоль, например, опухоль предстательной железы, печени, легких, груди, колоректальной области, поджелудочной железы или головного мозга; кожную опухоль; опухоль слизистой оболочки, например, рта, носа, ануса, вульвы или влагалища; или жидкую опухоль, такую как опухоль жидких тканей.

В частности, техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения заключается в обеспечении такого состава, который оказывает терапевтический эффект в течение, по меньшей мере шести месяцев с момента окончания терапии, предпочтительно, по меньшей мере 5 лет.

Следующая техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении такого состава, который является эффективным в предотвращении образования метастазов.

Следующая техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения заключается в обеспечении такого состава, которые имеет большее содержание озонидов, чем озонирующие составы предшествующего уровня техники, описанные выше (30 мг-экв. O₂/кг), в частности больше чем 100 мг-экв. O₂/кг, еще более конкретно больше чем 500 мг-экв. O₂/кг.

Следующая техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении такого состава, который имеет высокую переносимость, т.е. меньшее количество и интенсивность нежелательных побочных эффектов по сравнению с применяемыми в настоящее время терапиями.

В частности, состав должен иметь возможность оказывать противораковое действие, не повреждая неопухолевые клетки, т.е. здоровые клетки.

Следующая техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении такого состава, который позволяет легко персонализировать дозу.

Сущность настоящего изобретения

Аналогичная проблема решается согласно настоящему изобретению составом, содержащим по меньшей мере одно озонированное масло для применения в предотвращении и/или лечении опухоли, предпочтительно злокачественная опухоль.

Предпочтительно, данный состав предназначен для применения путем введения, выбранного из перорального, местного, инъекцией (например, путем инфльтрации), ингаляцией (например, в форме аэрозоля) и их комбинаций.

Предпочтительно, данный состав предназначен для применения местным введением и/или введением инъекцией (например, путем инфльтрации).

Предпочтительно, озонированное масло содержит озониды в количестве 500-1500 мг-экв. O_2 /кг, более предпочтительно 600-1400 мг-экв. O_2 /кг, даже более предпочтительно 700-1300 мг-экв. O_2 /кг.

В предпочтительном варианте осуществления, озонированное масло содержит озониды в количестве больше чем 800 и меньше чем 1500 мг-экв. O_2 /кг, более предпочтительно больше чем 900 и меньше чем 1400 мг-экв. O_2 /кг, даже более предпочтительно больше чем 1000 и меньше чем 1300 мг-экв. O_2 /кг, самое предпочтительное больше чем 1100 и меньше чем 1200 мг-экв. O_2 /кг.

Содержание озонидов можно измерить в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, способом определения количества пероксидов, описанным в инструкции (ЕЕС) № 2568/91 от 11 июля 1991, касающейся характеристик оливкового масла и оливкового масла второго отжима, и соответствующих способах анализа, приложение III.

Предпочтительно, озонированное масло представляет собой растительное масло, прошедшее процесс озонирования, более предпочтительно выбранное из: подсолнечного масла, оливкового масла, арахисового масла, арганового масла, виноградного масла, масла жожоба, соевого масла, кукурузного масла, пальмового масла, хлопкового масла, рапсового масла, масла кокосового ореха, касторового масла, льняного масла, масла бурачника, масла примулы вечерней и их смесей.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, озонированное масло представляет собой масло семян подсолнечника (в дальнейшем также "подсолнечное масло"), арахисовое масло (в дальнейшем также "арахисовое масло") или их смеси. Фактически, предпочтительно применять масло, по существу не обладающее какой-либо естественной антиоксидантной активностью.

Предпочтительно, озонированное масло по существу не содержит антиоксидантных агентов.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, озонированное масло выбрано из: подсолнечного масла, арахисового масла, арганового масла, виноградного масла, масла жожоба, соевого масла, кукурузного масла, пальмового масла, хлопкового масла, рапсового масла, кокосового масла, касторового масла, льняного масла, масла бурачника, масла примулы вечерней и их смесей, более предпочтительно подсолнечное масло и/или арахисовое масло.

Предпочтительно, озонированное масло получается в процессе озонирования, в котором для введения кислорода применяют газообразный кислород высокой степени очистки.

Предпочтительно, состав предполагается вводить животному или человеку, страдающему опухоли, более предпочтительно злокачественной опухоли.

Предпочтительно, опухоль выбрана из солидной опухоли, например, опухоли предстательной железы, печени, легких, груди, толстой кишки, поджелудочной железы или головного мозга; кожной опухоли; опухоли слизистой оболочки, например, рта, носа, ануса, вульвы или влагалища; и опухоли жидких тканей, например, опухоли кроветворной ткани.

Предпочтительно, приведенный выше состав действует на опухолевую клетку путем окисления митохондриальных мембран.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, приведенный выше состав предназначен для применения местным введением.

Состав для целей местного применения настоящего изобретения может состоять из приведенного выше, по меньшей мере, одного озонированного масла или он может содержать приведенное выше по меньшей мере одно озонированное масло, предпочтительно в концентрации в массовых процентах по отношению к общей массе состава от 1 до 50%, даже более предпочтительно от 2 до 20%, самое предпочтительное от 3 до 15%.

В предпочтительном варианте осуществления, состав для местного применения настоящего изобретения дополнительно содержит фармацевтически приемлемую среду, совместимую с озонированным маслом.

Предпочтительно, состав для местного применения настоящего изобретения имеет форму, выбранную из масла, геля и эмульсии, более предпочтительно масла.

Гель может представлять собой гидрогель или липогель.

Предпочтительно, гидрогель содержит, в весовых процентах относительно суммарного веса гидрогеля, 3-30%, более предпочтительно 5-20%, самое предпочтительное 8-15%, по меньшей мере одного озонированного масла.

Термин "гидрогель" в настоящем изобретении обозначает, что состав находится в форме гелеобразного гидрофильного раствора, в котором озонированное масло диспергировано в водной среде.

Термин "липогель" в настоящем изобретении обозначает, что состав находится в форме гелеобразного липофильного раствора, в котором озонированное масло диспергировано в липидной среде.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения, местное применение для предотвращения и/или лечения опухоли осуществляют местным нанесением состава на поврежденную ткань, предпочтительно на период более трех дней и менее шестидесяти дней, более предпочтительно от десяти до тридцати дней.

Предпочтительно, местное нанесение состава осуществляют один или два раза в день, более предпочтительно два раза в день.

Предпочтительно, местное нанесение осуществляют нанесением на пораженную ткань количества

состава, достаточного для покрытия неопластического поражения, более предпочтительно для покрытия неопластического поражения и, по меньшей мере, части кожи в непосредственной близости от поврежденного участка.

Кожу в непосредственной близости от поврежденного участка определяют как поверхность кожи, которая простирается от края поражения до одного сантиметра от него.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения, состав для местного применения содержит озонированное масло, которое содержит озониды в количестве больше чем 800 и меньше чем 1500 мг-экв. O₂/кг, более предпочтительно больше чем 900 и меньше чем 1400 мг-экв. O₂/кг, даже более предпочтительно больше чем 1000 и меньше чем 1300 мг-экв. O₂/кг, самое предпочтительное больше чем 1100 и меньше чем 1200 мг-экв. O₂/кг.

Состав для местного применения в частности показан для предотвращения и/или лечения кожных опухолей, таких как, например, злокачественная меланома, базальноклеточная эпидермоидная карцинома и спиноцеллюлярная эпидермоидная карцинома.

Более того, состав для местного применения в частности показан для применения в предотвращении и/или лечения опухоли слизистой оболочки, например, рта, носа, ануса, вульвы или влагалища.

Согласно альтернативному предпочтительному варианту осуществления, приведенный выше состав предназначен для применения пероральным введением.

Кроме того, было обнаружено, что состав для перорального применения настоящего изобретения является эффективным в предотвращении образования метастазов, в частности, у радиорезистентных субъектов.

Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к составу для перорального применения настоящего изобретения для применения в предотвращении образования метастазов, более предпочтительно у радиорезистентного человека или животного, являющегося млекопитающим.

Состав для цели перорального применения настоящего изобретения может состоять из приведенного выше, по меньшей мере одного озонированного масла, или он может содержать приведенное выше по меньшей мере одно озонированное масло, предпочтительно в концентрации, в процентах по массе по отношению к общей массе состава, от 1 до 5%, даже более предпочтительно от 2 до 3%.

Согласно предпочтительному аспекту, состав настоящего изобретения содержит среду, совместимую с озонированным маслом, предпочтительно в количестве от 95 до 99% по весу, более предпочтительно от 97 до 98% по весу, где проценты относятся к общей массе состава.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, указанная среда содержит, по меньшей мере, один подсластитель и воду.

Предпочтительно, подсластитель выбран из, по меньшей мере, одного сахара, более предпочтительно выбран из фруктозы, глюкозы, сахарозы и их смесей; по меньшей мере одного фруктового концентрата; по меньшей мере одного полиола; и, по меньшей мере одного растительного экстракта, более предпочтительно стевии; и их смесей.

В предпочтительном варианте осуществления, среда содержит сироп и/или мед.

Предпочтительно, сироп представляет собой сироп фруктозы.

Предпочтительно, мед представляет собой сырой необработанный мед.

Среда может дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, выбранных из эфирного масла лимона, подкислителей, моногидрата лимонной кислоты, консервантов, лактата натрия, сорбата калия, бензоата натрия, аравийской камеди, ксантановой камеди, натуральных или искусственных ароматизаторов (например, вишневого ароматизатора), эмульгирующих агентов (полисорбат 80) и их смесей.

Среда может также содержать осмотическую воду.

Среда может дополнительно содержать по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Предпочтительно, состав для перорального применения настоящего изобретения имеет форму, выбранную из капсулы и напитка, более предпочтительно напитка, даже более предпочтительно сиропа.

Термин "сироп" в настоящем изобретении обозначает водный препарат, содержащий по меньшей мере один подсластитель. Сироп находится в легко дозируемой жидкой форме и не требует применения покрытий, в частности покрытий, устойчивых к среде желудочно-кишечного тракта.

Предпочтительно, среда дополнительно содержит липосомальную фракцию. Указанную липосомальную фракцию можно успешно применять для увеличения степени абсорбции озонированного масла, поскольку она способствует биодоступности и позволяет получить более продолжительное и постепенное высвобождение активного компонента.

Предпочтительно, состав для перорального применения настоящего изобретения находится в форме капсул, устойчивых к среде желудочно-кишечного тракта, например, с покрытием на основе оксида кремния.

Фактически, оксид кремния оказывает адсорбирующее действие на озонированное масло, обеспечивая контролируемое высвобождение в кишечном тракте после прохождения желудочно-кишечного барьера, а не остается в виде болюса.

Фактически, озонированные масла имеют тенденцию в значительной степени нейтрализоваться по их действию в сильноокислой среде и, следовательно, оказывают меньшее воздействие в среде желудка.

Предпочтительно, состав для перорального применения, содержащий озонированное масло настоящего изобретения, имеет высокую биодоступность, поэтому он может достигать системного кровотока и, следовательно, проявлять терапевтическую активность в отношении злокачественной опухоли. Фактически, конкретный состав для перорального применения настоящего изобретения, например, в форме сиропа, способствует биодоступности и абсорбции сразу после приема, начиная с самой начальной части пищеварительного тракта, включая слизистую оболочку полости рта и под языком. По этой причине состав для перорального применения настоящего изобретения характеризуется отсутствием гастростойчивых покрытий, которые препятствовали бы быстрой системной абсорбции.

Более того, состав для перорального применения настоящего изобретения, который быстро всасывается уже в начальном тракте пищеварительного тракта, делает ненужным применение антиоксидантных (и, следовательно, восстанавливающих) добавок в целях сохранения. Фактически, данные антиоксидантные добавки взаимодействуют с действующим веществом (озоном, окислителем), тем самым влияя на терапевтические свойства состава и возможность его системного всасывания. Следовательно, приведенные выше специфические характеристики делают состав согласно настоящему изобретению особенно подходящим для индукции системных, а не только местных лечебных эффектов.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения, пероральное применение для лечения опухоли осуществляют пероральным введением состава, предпочтительно в течение периода более трех дней и менее шестидесяти дней, более предпочтительно от десяти до тридцати дней.

Предпочтительно, пероральное введение состава осуществляют один или два раза в день, более предпочтительно два раза в день.

Согласно следующему предпочтительному аспекту настоящего изобретения, пероральное применение для предотвращения, в частности для предотвращения рецидивов, опухоли осуществляют пероральным введением состава, предпочтительно в течение периода более трех дней и менее шестидесяти дней, более предпочтительно от десяти до тридцати дней.

В случае предотвращения рецидивов введение состава предпочтительно направлено на стволовые клетки, которые особенно связаны с развитием рецидивов. Фактически, данные клетки характеризуются внутриклеточной средой с высоким потенциалом восстановления, которая позволяет им противостоять химио/лучевой терапии. Состав настоящего изобретения обладает способностью изменять данную среду на окислительную.

Предпочтительно, пероральное введение состава осуществляют один или два раза в день, даже более предпочтительно два раза в день.

Согласно следующему предпочтительному аспекту настоящего изобретения, пероральное применение для предотвращения образования метастазов осуществляют пероральным введением состава, предпочтительно в течение периода более трех дней и менее шестидесяти дней, даже более предпочтительно от десяти до тридцати дней.

Предпочтительно, пероральное введение состава осуществляют один или два раза в день, даже более предпочтительно два раза в день.

Предпочтительно, пероральное введение осуществляют введением количества озонированного масла от 0,1 до 0,5 мл в день на килограмм веса тела субъекта. Это соответствует, например, 7-35 мл дозе озонированного масла в день для пациента с весом тела 70 кг.

Более предпочтительно, пероральное введение осуществляют введением количества озонированного масла от 0,2 до 0,4 мл, даже более предпочтительно от 0,25 до 0,35 мл в день на килограмм веса тела субъекта.

Состав для перорального применения в частности показан для применения в предотвращении и/или лечении опухоли жидких тканей, например, опухоли кроветворной ткани.

Более того, состав для перорального применения в частности показан для применения в предотвращении и/или лечении опухоли, поражающей внутренние органы, например толстую кишку, печень, поджелудочную железу, легкие, грудь, простату и органы, защищенные гематоэнцефалическим барьером (включая другие органы центральной нервной системы, такие как мозг, и семенник). Согласно альтернативному предпочтительному варианту осуществления, приведенный выше состав предназначен для применения введением инъекцией.

Состав для инъекции настоящего изобретения может состоять из приведенного выше, по меньшей мере, одного озонированного масла или он может содержать приведенное выше по меньшей мере одно озонированное масло в концентрации, в процентах по массе по отношению к общей массе состава, по меньшей мере, 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 95%, самое предпочтительное 99%.

В предпочтительном варианте осуществления, состав с целью инъекции настоящего изобретения содержит фармацевтически приемлемую среду, совместимую с озонированным маслом.

Предпочтительно, состав для инъекции настоящего изобретения находится в форме масла.

В предпочтительном варианте осуществления, состав для инъекции настоящего изобретения дополнительно содержит по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество.

Предпочтительно, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (эфиры полиоксиэтиленгликоля и сорбитана) или SPAN (алкильные эфиры сорбитана).

Предпочтительно, поверхностно-активное вещество выбрано из: полисорбата 80 (моноолеат полиоксиэтилен (20) сорбитана), полисорбата 20 (монолаурат полиоксиэтилен (20) сорбитана), полисорбата 40 (монопальмитат полиоксиэтилен (20) сорбитана), полисорбат 60 (моностеарат полиоксиэтилен (20) сорбитана), сорбитанмонолаурата, сорбитанмонопальмитата, сорбитанмоностеарата, сорбитантристеарата и сорбитанмоноолеата и их смесей, более предпочтительно полисорбата 80.

Благодаря данному приему можно сделать озонированное масло диспергируемым в воде, тем самым предотвращая возможность того, что инъекция озонированного масла внутримышечно или внутривенно приведет к осложнениям, таким как, например, тромбоз легочной артерии или головного мозга.

В предпочтительном варианте осуществления, состав настоящего изобретения для инъекции содержит воду, полисорбат 80, озонированное арахисовое масло или подсолнечное масло, хлорид натрия.

Предпочтительно, инъекцию осуществляют путем инфльтрации, флекбоклиза, внутривенно, внутримышечно или даже введением через венозный катетер (порт-катетер).

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения, применение инъекцией в лечении опухоли осуществляют инъекцией состава в поврежденную ткань, предпочтительно в течение периода более трех дней и менее шестидесяти дней, более предпочтительно от десяти до тридцати дней.

Предпочтительно, инъекцию состава осуществляют один или два раза в день, даже более предпочтительно два раза в день.

Предпочтительно, введение инъекцией осуществляют инъекцией количества озонированного масла от 0,5 до 5 мл, более предпочтительно от 0,7 до 4 мл, даже более предпочтительно от 1 до 3 мл в день на см неопластической массы.

Состав для инъекции в частности показан для применения в лечении солидной опухоли, такой как, например, опухоль предстательной железы, печени, легких, груди или толстой кишки, особенно в тех случаях, когда опухоль находится на поздней стадии.

Состав для инъекции согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно следующему предпочтительному аспекту, состав настоящего изобретения предназначен для применения введением ингаляцией, например, в виде аэрозоля.

Состав для применения ингаляцией настоящего изобретения может состоять из приведенного выше, по меньшей мере, одного озонированного масла, или он может содержать приведенное выше по меньшей мере одно озонированное масло, предпочтительно в концентрации, в процентах по массе по отношению к общей массе состава, от 1 до 50%, даже более предпочтительно от 2 до 20%, самое предпочтительное от 3 до 15%.

В предпочтительном варианте осуществления, состав для применения ингаляцией настоящего изобретения дополнительно содержит фармацевтически приемлемую среду, совместимую с озонированным маслом.

Предпочтительно, состав для введения ингаляцией дополнительно содержит по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество, как описано выше.

Благодаря данному способу можно сделать озонированное масло диспергируемым в воде.

В предпочтительном варианте осуществления, состав настоящего изобретения для применения ингаляцией содержит воду, полисорбат 80, озонированное арахисовое масло или подсолнечное масло, хлорид натрия.

Состав для применения ингаляцией в частности показан для применения в предотвращении и/или лечении опухоли, поражающей легкие (карцинома легких) или проксимальный отдел дыхательной системы (bronхи, гортань, глотка).

Предпочтительно, предотвращение и/или лечение настоящего изобретения включает один или более из местного введения, перорального введения, введения путем ингаляции и введения инъекцией приведенного выше состава, т.е., можно сочетать, например, пероральное введение с местным введением и/или введением инъекцией.

Также можно сочетать местное введение с введением инъекцией и/или пероральным введением.

Наконец, можно сочетать введение инъекцией с пероральным введением и/или с местным введением.

При подходящем сочетании приведенных выше способов введения можно получить, например, как ремиссию опухоли, так и предотвращение метастазов.

Приведенные выше составы для перорального применения, для местного применения и инъекцией можно применять в предотвращении и/или лечении опухолей, и/или в предотвращении образования метастазов, и/или рецидивов, одновременно или последовательно.

Предпочтительно, состав вводят в сочетании с хирургическим вмешательством, более предпочтительно криохирургическим вмешательством, направленным на удаление опухоли, или в сочетании с криохирургическим вмешательством, т.е. состав можно вводить пероральным путем, ингаляционным путем, местно, инъекционным путем или их комбинациями, начиная с определенного дня перед хирургическим вмешательством или криотерапевтическим вмешательством и до определенного дня после это-

го. Альтернативно, его можно вводить пероральным путем, ингаляционным путем, местно, инъекционным путем или их комбинациями, начиная со дня хирургического вмешательства и до определенного дня после этого, или начиная с определенного дня после хирургического вмешательства или криотерапевтического вмешательства.

Предпочтительно, состав для перорального применения вводят в сочетании с сеансом радиотерапии направленной на лечение опухоли, более предпочтительно для радиорезистентных людей или млекопитающих.

Состав для перорального применения можно вводить, начиная с определенного дня перед сеансом радиотерапии и вплоть до определенного дня после этого, более предпочтительно, начиная с определенного дня перед сеансом радиотерапии и вплоть до дня его начала, даже более предпочтительно, начиная, по меньшей мере, за 20 дней перед сеансом радиотерапии.

Фактически было обнаружено, что пероральное введение состава, начиная до лучевой терапии, подавляет образование метастазов у радиорезистентных субъектов.

Предпочтительно, лечение опухоли согласно настоящему изобретению включает введение состава настоящего изобретения до того, как достигают соотношения U Cor/U Carг между антиоксидантными частицами (U Cor) и окисляющими частицами (U Carг) в крови пациента 4-12, более предпочтительно 5-10, самое предпочтительное 6-8.

Величины меньше чем 4, фактически, если они сохраняются со временем, указывают на передозировку состава и, следовательно, их следует избегать, поскольку в здоровых клетках пациента может быть вызвано окислительное повреждение с последующим повышенным риском для пациента сердечно-сосудистых заболеваний, таких как сердечные приступы и инсульты. Наоборот, величины выше 12 указывают на то, что лечение не очень эффективно или не завершено.

Предпочтительно, лечение опухолей согласно настоящему изобретению включает введение состава настоящего изобретения до тех пор, пока не достигают соотношения U Cor/U Carг между антиоксидантными частицами (U Cor) и окисляющими частицами (U Carг) в крови пациента меньше чем 7, более предпочтительно меньше чем 6, даже более предпочтительно меньше чем 5.

Предпочтительно, приведенное выше соотношение равно или больше чем 4.

Фактически наблюдали, что в случае пациента, страдающего от злокачественного новообразования, особенно если оно агрессивно и/или имеет большие размеры, приведенное выше соотношение U Cor/U Carг изменяется по отношению к здоровому человеку, у которого нормальное значение составляет 7 ± 1 . У онкологического больного данное значение намного выше значений у здоровых людей и обычно встречаются значения 46 ± 7 .

Начальная величина данного параметра варьируется среди пациентов и зависит от многих факторов, помимо наличия опухоли, включая рацион возраст, образ жизни, другие заболевания и т.д. Следовательно, мониторинг данного параметра до и во время лечения позволяет разработать индивидуальную терапию для пациента, что позволяет добиться более эффективного уменьшения новообразования, избегая при этом передозировки состава.

Оценка окислительного статуса, т.е. определение приведенного выше отношения U Cor/U Carг, можно проводить любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью теста FRAS, основанного на реакциях окисления-восстановления железистого субстрата с количественным определением показателя оптической плотности при 505 нм после реакции с исследуемым образцом крови. Тест FRAS можно проводить (а) для оценки антиоксидантных частиц способом, описанным в Benedetti et al., Clin. Lab 59; 1091-1097, 2013; (b) для оценки окисляющих частиц способом, описанным в Iannitti et al., J. Oral Path. Medicine, DOI: 10.1111/j. 1600-0714.2012.01143.x, 2012).

Тест дает количественную оценку: (а) общего количества окисляющих частиц в эквивалентах молекул пероксида водорода ($1 \text{ U Carг} = 0,08 \text{ мг H}_2\text{O}_2 \text{ на } 100 \text{ мл}$); и (b) общее количество антиоксидантных частиц в эквивалентах молекул аскорбиновой кислоты ($1 \text{ U Cor} = \text{микромоль/литр аскорбиновой кислоты}$). Тест является неинвазивным и проводится путем взятия микроколичества (50-100 мкл) периферической венозной крови путем микропункции кожи дистального отдела пальца. Можно применять тесты, подобные FRAS, при условии, что они должным образом проверены и сравнены с ним.

Предпочтительно, лечение включает одну или более сессий лечения, с интервалом в определенный период времени до стабилизации приведенной выше желаемой величины с течением времени.

Данный конкретный период времени может составлять от 1 до 6 месяцев, предпочтительно от 1 до 3 месяцев.

Величину считают стабильной во времени, когда она остается практически постоянной в течение, по меньшей мере шести месяцев, более предпочтительно, по меньшей мере одного года, даже более предпочтительно, по меньшей мере двух лет, самое предпочтительное, по меньшей мере трех лет.

Специалист в данной области может регулировать дозировку и продолжительность лечения, а также его можно разделять на один или несколько сеансов для достижения заранее установленной цели, на основе клинической оценки пациента со ссылкой на конкретную онкологическую патологию, которой он страдает.

Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения и/или лечения опухоли, предпочтительно злокачественной опухоли, который включает введение состава настоящего изобретения нуждающемуся человеку или млекопитающему.

Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения образования метастазов и/или рецидивов, который включает введение состава для перорального применения настоящего изобретения нуждающемуся человеку или млекопитающему, предпочтительно радиорезистентному человеку или млекопитающему.

Местное применение озонированного масла в настоящее время известно для лечения кожных заболеваний и/или поражений. В частности, применение озонированного масла особенно подходит для лечения кожных заболеваний и инфекций, а также хронических инфекций кожных покровов. В настоящее время неожиданно было обнаружено, что озонированное масло является эффективным в предотвращении и лечении приведенных выше опухолей, в частности злокачественных опухолей.

Не желая тем самым быть связанными какой-либо теорией, предполагают, что газообразные или водные препараты на основе озонирующих веществ предшествующего уровня техники, являются менее эффективными, чем состав настоящего изобретения для предотвращения и/или лечения опухолей, в частности злокачественных опухолей, поскольку газообразная или водная форма ограничивает действие окислительного эффекта во внеклеточной среде: неопластические клетки фактически окружены липофильной мембраной, которая предотвращает прямое проникновение газа или воды.

Напротив, с составом настоящего изобретения, содержащим озонированное масло, получают эффективные и длительные результаты.

Фактически, масло, проникая в митохондриальные мембраны неопластической клетки, способно активировать апоптоз окислением и, таким образом, вызывать гибель неопластической клетки.

Испытания *in vitro* показывают, что на самом деле состав настоящего изобретения способен оказывать мощное противораковое действие на клеточном уровне, и выяснен механизм действия состава настоящего изобретения, который основан на проникновении озонированного масла в цитоплазму клетки благодаря его способности окислять клеточные мембраны, включая плазмалемму, которая отделяет клетку от внешней среды. Проникая в цитоплазму, озонированное масло на короткое время задерживается в вакуолях. Однако мембраны данных вакуолей быстро окисляются озонированным маслом, и затем масло диффундирует в цитоплазму, оказывая тем самым свое действие.

Таким образом, состав настоящего изобретения характеризуется уникальной способностью проникать внутрь опухолевых клеток благодаря повреждению, которое он также вызывает на внешней клеточной мембране. Учитывая чистоту (т.е. высокую концентрацию озонидов) и высокую стабильность озонированного масла и, следовательно, состава настоящего изобретения, проникновение не ставит под угрозу прооксидантные способности, которые затем напрямую выражаются во внутриклеточном сайте. Этот аспект отличается тем, что другие составы озонирующих веществ не способны производить данный эффект, поскольку они нейтрализуются антиоксидантами во внеклеточной или внутриклеточной среде, обе из которых особенно богаты антиоксидантной защитой, особенно в неопластических стволовых клетках.

Рак представляет собой системное заболевание организма. Новообразование не может самостоятельно развить адекватные трофические поддерживающие структуры для собственного развития. Таким образом, характерным признаком карциномы является наличие заметного инфильтрата воспалительных макрофагальных клеток, которые, будучи полностью неспособными противодействовать опухолевому росту, поддерживают его, поставляя кислород, метаболиты и неососудами. Данные клетки определяются как макрофаги, связанные с опухолями. Сегодня степень воспаления представляет собой наиболее прогностический показатель неблагоприятного развития новообразования. Таким образом, раку более эффективно противостоит включение перорального состава, способного системно противостоять воспалению.

Наблюдали, что состав настоящего изобретения способен оказывать противовоспалительное действие, не вызывая иммуносупрессии, что продемонстрировано тестами *in vitro* и *in vivo*.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, предполагают, что механизм, лежащий в основе данного явления, представляет собой ингибирование окислительной реакции макрофагов. Макрофаги, ответственные за неспецифический клеточно-опосредованный тканевой иммунитет, действуют путем высвобождения активных форм кислорода и воспалительных цитокинов в тканевой среде, которые способны нейтрализовать бактерии, если они присутствуют; в отсутствие такового, однако, после активации макрофагов развиваются воспалительные явления, которые предполагают, как и в случае рака, патогенную значимость. Состав настоящего изобретения ингибирует окислительную реакцию макрофагов за счет отрицательной обратной связи; фактически присутствие внеклеточной среды, уже богатой озонными окисляющими частями, блокирует высвобождение дополнительных окисляющих частиц макрофагами, таким образом, подавляя активацию и последующее воспаление.

Также считают, что селективный эффект озонированного масла по настоящему изобретению с высоким содержанием озонидов, убивающий неопластические клетки, а не нормальные дифференцированные клетки, обусловлен тем фактом, что митохондрии в неопластической клетке неактивны, как с мета-

болической точки зрения, так и с точки зрения активации запрограммированной гибели клеток (апоптоза) внутренним путем высвобождением цитохромов и кальция в цитоплазму. Эта характеристика отличает опухолевую клетку от здоровой клетки.

Митохондриальная мембрана в основном состоит из фосфолипидов, наиболее важным из которых является кардиолипин, который устроен так, чтобы формировать типичный липидный бислой внешней митохондриальной мембраны, объединяя гидрофобные хвосты двух молекул и заставляя гидрофильные головки выступать внутрь цитоплазматической гидрофильной среды вне митохондрии и в гидрофильную среду матрикса внутри митохондрии. Однако структура кардиолипина в значительной степени зависит от его связи с цитохромом с, основным активным компонентом окислительного фосфорилирования. Кардиолипин, в частности, расположен, как описано выше, в присутствии связи с функционирующим цитохромом с, т.е. в здоровой ткани. Бислой, образованный кардиолипином, в данном случае толстый, плотный и симметричный с непрерывностью гидрофильных головок. Такое расположение предотвращает доступ к гидрофобным хвостам перекисных свободных радикалов, переносимых озонированным маслом настоящего изобретения. Таким образом, здоровая клетка устойчива к цитотоксическому действию озонированного масла согласно настоящему изобретению (см. фиг. 1а).

Напротив, в неопластической клетке кардиолипин обнаруживается в отсутствие функционирующего цитохрома с. Это приводит к разделению гидрофобных хвостов, что приводит к утончению мембраны и зазорам между гидрофильными головками. В данной ситуации перекисные свободные радикалы, переносимые озонированным маслом настоящего изобретения, имеют доступ к гидрофобным хвостам, и клетка является чувствительной к цитотоксическим эффектам озонированного масла настоящего изобретения (см. фиг. 1б).

Эффективность состава настоящего изобретения может также зависеть от других факторов, таких как его чистота, отсутствие антиоксидантов, и его высокая биодоступность.

В частности, в случае варианта осуществления настоящего изобретения, который включает сочетание состава для перорального применения и состава для применения инъекцией, обнаружено, что данное сочетание позволяет получить прямой цитопатический эффект за счет инфильтрации в опухолевую массу и, следовательно, повышает эффективность.

Состав для перорального применения настоящего изобретения, как упоминается выше, действительно быстро всасывается системным путем. Данный аспект представляет собой абсолютную особенность в отношении присутствующих на рынке озонированных масел с низким содержанием озонида, которые не способны системно всасываться или которые иногда даже превращают в комплекс с антиоксидантами с целью стабилизации и сохранения, что влияют на их фармакологические эффекты.

Следовательно, состав настоящего изобретения позволяет стабилизировать очень высокие количества озоновых окисляющих частиц (озонидов) в липофильном комплексе, позволяя ему проникать внутрь опухолевой клетки и активировать в данном месте механизмы автономной гибели клеток (апоптоза) без повреждения окружающих здоровых тканей.

Состав настоящего изобретения характеризуется длительностью терапевтического эффекта в течение, по меньшей мере шести месяцев, предпочтительно, по меньшей мере одного года, более предпочтительно, по меньшей мере двух лет, даже более предпочтительно, по меньшей мере трех лет, самое предпочтительное, по меньшей мере пяти лет.

Состав для перорального применения настоящего изобретения особенно применим в предотвращении образования метастазов и/или рецидивов.

В частности, когда пероральное введение состава сочетают с лучевой терапией для радиорезистентных субъектов, наблюдают, что состав является эффективным для предотвращения образования метастазов. Фактически, низкая доступность кислорода (гипоксия) представляет собой основной механизм, который запускает миграцию неопластических клеток из первичного очага (метастазирование). Настоящее изобретение, представленное здесь, за счет увеличения доступности кислорода в месте первичной опухоли подавляет активацию процесса метастазирования.

Высокое содержание озонидов также важно для персонализации терапевтической дозы. Фактически, дозы лекарственного средства должны быть индивидуализированы в зависимости от типа пациента, которого лечат, и существующей неопластической патологии. Широкий диапазон озонидов, который может содержать состав, позволяет индивидуализировать терапевтическую дозу с точностью, недостижимой ранее. Данная персонализация осуществляется на основе количественной оценки соотношения между окисляющими и антиоксидантными частицами в плазме лечимого субъекта, как показано выше. Наконец, состав настоящего изобретения характеризуется высокой переносимостью и отсутствием нежелательных побочных эффектов, что весьма своеобразно для лекарственного средства, способного убивать раковые клетки. Данная характеристика обусловлена большой разницей, которая существует между нормальными и неопластическими клетками в их способности противостоять окислительному повреждению, особенно когда оно происходит во внутриклеточной среде.

Дополнительные особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана структура кардиолипина в нормальных клетках (фиг. 1a) и в неопластической клетке (фиг. 1b).

На фиг. 2 показаны результаты клеточного анализа *in vitro* для определения противоракового действия озонированного масла семян подсолнечника настоящего изобретения на линию раковых клеток A 549. Фиг. 2a представляет собой изображение линии клеток через 60 мин, 24, 48 и 72 ч воздействия озонированного подсолнечного масла настоящего изобретения, полученное с помощью оптического микроскопа. Неозонированное подсолнечное масло применяли в качестве сравнительного контроля. Фиг. 2b представляет собой изображение, полученное с помощью оптического микроскопа, показывающее избирательное окрашивание клеток трипановым синим, избирательное окрашивание только мертвых клеток.

На фиг. 3 показаны результаты клеточного анализа *in vitro*, применяя нормальную субклеточную и трихромную флуоресцентную микроскопию для определения механизма действия на внутриклеточном уровне в неопластической клетке. На фиг. 3a показано изображение, полученное с помощью оптического микроскопа, клеток линии клеток A549 после воздействия озонированного подсолнечного масла настоящего изобретения в концентрации 10% об./об. в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), в течение двух часов: обнаружено внутриклеточное проникновение озонированного масла в цитоплазматический участок (прозрачные светоотражающие вакуоли). Неозонированное подсолнечное масло применяли в качестве сравнительного контроля. На фиг. 3b показаны изображения трихромной флуоресцентной микроскопии клеток линии клеток A549 после воздействия озонированного масла семян подсолнечника настоящего изобретения в течение 0, 30 и 60 мин с окрашиванием. Неозонированное подсолнечное масло применяли в качестве сравнительного контроля. Окрашивание показывает: (а) красный: озонированное масло; (б) синий: ядро; (с) зеленый: цитоплазматические структуры и, в частности, митохондрии. Подтверждено проникновение масла в цитоплазматический участок.

На фиг. 4 показаны дополнительные изображения под флуоресцентным микроскопом клеток линии клеток A549, подвергнутых воздействию контрольного подсолнечного масла и масла, содержащего 10 и 80% озонированного подсолнечного масла, с окрашиванием трихромом с наложенными каналами (наложение). Желтое пятно указывает на наложение красного и зеленого. Данное наложение происходит только в клетках, обработанных озонированным маслом, и не в контроле; это означает, что масло (красный) достигает и повреждает митохондрии (зеленый) (пример 3).

На фиг. 5 показано сравнение значений жизнеспособности клеток A549 после обработки различными маслами согласно примеру 4.

На фиг. 6 показаны результаты клеточного анализа *in vivo* для определения противовоспалительной силы состава настоящего изобретения. График показывает снижение маркера активации макрофагов HLA α у двух субъектов, получавших сироп настоящего изобретения, измеренного цитофлуориметрией.

Фиг. 7 представляет собой серию фотографий, показывающих процесс заживления у кошки, страдающей плоскоклеточной эпидермоидной карциномой носа после лечения составом настоящего изобретения. В частности, на фигурах показано состояние кошки до лечения (фиг. 7a), через 24 ч после вмешательства (фиг. 7b), через 72 ч после вмешательства (фиг. 7c), через 7 дней после вмешательства (фиг. 7d), через 10 дней после вмешательства (фиг. 7e), и через три недели после вмешательства (фиг. 7f) (полное восстановление).

Фиг. 8 представляет собой серию фотографий, показывающих процесс заживления у кролика, страдающего язвенной плоскоклеточной карциномой прямой кишки, после лечения составом настоящего изобретения и криотерапевтического вмешательства, до вмешательства (фиг. 8a-d), через 7 дней после вмешательства (фиг. 8e), через 10 дней после вмешательства (фиг. 8f), через четыре недели после вмешательства (фиг. 8g) (полное восстановление) и через семь месяцев после вмешательства (фиг. 8h) (сохранение полного восстановления).

На фиг. 9 показаны результаты теста на жизнеспособность опухолевых клеток A549 после воздействия озонированного масла настоящего изобретения при 700 ("OOAO 700") или 1100 ("OOAO 1100") озонидов, вводимого до ("PRE") или после ("POST") лучевой терапии (2 грэя). OOAO увеличивает способность излучения убивать опухолевые клетки от 7 до 14 раз. Постобработка OOAO1100 представляет собой наиболее эффективную терапевтическую ситуацию.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение далее будет дополнительно проиллюстрировано некоторыми вариантами осуществления, как показано ниже.

Пример 1.

Получение состава в виде сиропа.

Следующий состав получали в виде сиропа:

2,5% озонированное подсолнечное масло с содержанием озонидов, равным 700 мг-экв. O₂/кг, и остальные 97,5% включают водный раствор фруктозы, подкислитель, моногидрат лимонной кислоты, консерванты, лактат натрия, осмотическую воду, сорбат калия, вишневый ароматизатор, эмульгатор (полисорбат 80); где указанные проценты относятся к общей массе состава.

Пример 2.

Анализ *in vitro* клеток карциномы.

Озонированное подсолнечное масло с содержанием озонидов, равным 700 мг-экв. O_2 /кг, исследовали на крайне недифференцированных и агрессивных клетках карциномы легких человека (линия клеток A549). Неозонированное подсолнечное масло применяли в качестве сравнительного контроля. Лечение заключалось в контакте клеток с маслом в течение двух часов с последующим промыванием. Эксперимент повторяли в четырех повторах. Клетки, не обработанные или обработанные неозонированным подсолнечным маслом, быстро росли, достигая слияния в зоне роста через 72 ч. Клетки, обработанные маслом настоящего изобретения, показали затруднения в росте в первые 24 ч, после чего они быстро подверглись гибели, достигающей кульминации через 72 ч с исчезновением слоя растущих клеток и простым присутствием мертвых клеток и диффузных апоптотических тел в супернатанте. На фиг. 2а показаны результаты, полученные в эксперименте.

Гибель клеток, обработанных озонированным маслом, также была продемонстрирована путем избирательного окрашивания трипановым синим согласно стандартному протоколу в секторе (фиг. 2б).

В частности, клетки линии A549 высевали в колбу на 75 см для культур клеток и обрабатывали озонированным подсолнечным маслом (General Service, Испания) при концентрации 10% об./об. в DMEM. Контроль осуществляли обработкой A549 в колбе на 75 см подсолнечным маслом (EMI) той же концентрации. Через четыре часа после обработки из каждой колбы отбирали аликвоту клеток, помещали на предметное стекло микроскопа и окрашивали трипановым синим, как сообщает Strober et al. (Strober W., Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015 Nov 2; 111:A3. B.1-3).

Пример 3.

Механизм действия на внутриклеточном уровне в неопластической клетке.

Динамику, с которой продукт по настоящему изобретению индуцирует гибель раковых клеток, исследовали с помощью нормальной субклеточной и трихромной флуоресцентной микроскопии, при которой ядра окрашивали в синий цвет, митохондрии и клеточные мембраны в зеленый цвет, масло семян подсолнечника и озонированное масло в красный цвет.

8×10^4 клеток линии A549 высевали на покрывное стекло для микроскопии (20×20 мм). На следующий день клетки обрабатывали озонированным подсолнечным маслом (содержание озонидов 700 мг-экв. O_2 /кг) (General Service, Испания) при разных концентрациях (10% и 80% об./об. в DMEM) в течение двух часов. Контроль осуществляли, применяя неозонированное подсолнечное масло (EMI Supermercati, Италия) в той же концентрации, что и при обработке, и в течение того же времени. На фиг. 3а показано внутриклеточное проникновение в цитоплазматический участок 10% об./об. озонированного масла (прозрачные светоотражающие вакуоли).

Для удаления масел через 24 ч клетки промывали раствором, содержащим 0,1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, Милан, Италия) в PBS (фосфатный буферный раствор, Euroclone, Милан, Италия) и затем только PBS. После промывок клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при 37°C и, наконец, окрашивали D10C6, нильским красным, родамином и DAPI, как сообщается Chen et al., Tarnowski et al., Koning et al., Johnson et al. (Chen W et al., A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J Microbiol Methods.* 2009 Apr; 77 (1): 41-7; Tarnowski BI et al., DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem.* 1991; 66 (6): 297-302.; Koning AJ et al., D10C6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1993; 25(2): 111-28; Johnson LV et al., Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980 Feb; 77 (2): 990-4).

Было замечено, что неозонированное подсолнечное масло только минимально проникало в клетки (цитоплазму), где оно было разделено на небольшие четко очерченные вакуоли. Наоборот, озонированное масло обильно проникало в цитоплазму, вероятно, из-за его особой способности окислять клеточные мембраны, включая плазмалемму, отделяющую клетку от внешней среды. После проникновения в цитоплазму, озонированное масло первоначально захватывалось в вакуолях; однако мембраны данных вакуолей быстро окислялись, и масло диффундировало в цитоплазму, создавая красный ореол, который накладывали на зеленый цвет мембран и внутриклеточных органелл (митохондрий). Результаты относительно 10% об./об. озонированного масла представлены на фиг. 3б.

Данные события достигали кульминации через 24 ч и сопровождалась гибелью клеток, обработанных маслом настоящего изобретения. Таким образом, очевидно, что озонированное масло настоящего изобретения проникает внутрь опухолевых клеток, где оно вызывает цитоплазматическое окислительное повреждение. Наиболее чувствительной к данному действию органелла является митохондрий. Окисление митохондриальных мембран неопластической клетки способно активировать апоптоз и, следовательно, гибель неопластической клетки.

Состояние митохондриальной функции в клетках, обработанных озонированным маслом, затем анализировали, оценивая высвобождение кальция митохондриями, применяя красного флуорохром (родамин 2) в качестве прямого индикатора повреждения митохондрий.

Конечную точку измеряли в неопластических клетках A549, обработанных подсолнечным маслом

(контроль) или озонированным маслом в дозах 10% об./об. и 80% об./об. относительно культуральной среды. Было обнаружено увеличение высвобождения внутрицитоплазматического кальция при однократной дозе в зависимости от количества применяемого озонированного масла.

Затем проводили селективное окрашивание митохондриальных мембран с помощью зеленого окрашивания (DiOC6), проверяя изменение интенсивности сигнала в контроле по отношению к клеткам, обработанным озонированным маслом. Заметное снижение интенсивности сигнала в цитоплазме (где расположены митохондрии) наблюдали в клетках, обработанных озонированным маслом; данный результат указывает на повреждение митохондриальной мембраны, вызванное обработкой озонированным маслом. В обработанных клетках также наблюдали большие цитоплазматические липидные вакуоли. Данные вакуоли содержат окисленные липиды, которые не катаболизируются клеткой, поэтому она приобретает вид "вспенивающейся клетки", который характеризует клетки, которые не могут катаболизировать липиды из-за высокого уровня повреждения митохондрий. Таким образом, присутствие данных вакуолей в клетках, обработанных озонированным маслом, является дополнительным доказательством того, что действие состава настоящего изобретения проявляется преимущественно и непосредственно на митохондриальной мембране.

Затем было выполнено цифровое наложение изображений, анализирующих высвобождение внутриклеточного кальция и повреждение митохондриальной мембраны (фиг. 4). На изображениях появляется желтое пятно, которое возникает в результате почти идеального наложения красного цвета на зеленый. Данный результат указывает на то, что внутриклеточный кальций (красный) высвобождается именно митохондриальными (зелеными) мембранами, поврежденными озонированным маслом. Фактически, данное наложение (желтое пятно) отсутствует в контрольных клетках, где митохондриальные мембраны не повреждены и, следовательно, окрашены в зеленый цвет, и где митохондрии не выделяют кальций.

Данный результат демонстрирует, как механизм терапевтического действия состава настоящего изобретения представляет собой внутриклеточную индукцию митохондриального повреждения с последующей активацией внутреннего клеточного апоптоза.

Пример 4.

Сравнительные тесты различных масел на жизнеспособность клеток.

Сравнительный эксперимент проводили для оценки особенности действия масла состава настоящего изобретения по отношению к другим озонированным маслам.

Клетки анапластической карциномы A549 выращивали в присутствии различных озонированных масел с низким содержанием озонидов или масел настоящего изобретения при 700 ("ООАО 700") и 1100 мг-экв. O₂/кг ("ООАО 1100"); их способность вызывать гибель клеток оценивали путем окрашивания жизнеспособных клеток кристаллическим фиолетовым в соответствии со следующим протоколом.

Клетки линии A549 высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном при плотности 6x10 клеток на лунку в 100 мл культуральной среды DMEM (Sigma-Aldrich, Милан, Италия). На следующий день в каждую лунку добавляли 10 мл озонированного подсолнечного масла (General Service, Испания), и клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. Контроль осуществляли, применяя подсолнечное масло (EMI Supermercati, Италия) в той же концентрации, что и при обработке, и в течение того же времени. После инкубации клетки сначала промывали раствором, содержащим 0,1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, Милан, Италия) в PBS (Euroclone, Милан, Италия), и затем PBS. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием кристаллическим фиолетовым, как описано Feoktistova et al., Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. Cold Spring Harb Protoc.; 2016(4): pdb. prot 087379]. Результаты считывали на фотометре для микропланшетов (Multiskan FC, Thermo Scientific) при длине волны 570 нм.

Следующие препараты оценивали относительно контроля, не обработанного или обработанного неозонированным подсолнечным маслом: активный спрей V03 (Benedetti & Co Biosolutions Sri, Брешия, Италия), озонированное оливковое масло (Vegetal Progress Sri, Турин, Италия), EMI подсолнечное масло (EMI Supermercati, Италия), крем-масло Ozone Elite (ECS Elitegroup), крем-масло Ozonia 10 (Innovares Sri, Италия), оливковое масло 03 Tu Piel (Qualified naturopath, Великобритания), масло Ozofarm (Ozofarm, Парма, Италия), масло настоящего изобретения при ООАО 700 и ООАО 1100.

Полученные результаты представлены на фиг. 5, показывающем для каждого препарата количество все еще жизнеспособных клеток после обработки (процент по отношению к необработанному контролю, 100% жизнеспособность). Все эксперименты были повторены 8 раз.

Полученные результаты показывают, что выживаемость клеток снижается в присутствии озонированного масла по сравнению с контролями. Однако ни одно из озонированных масел предшествующего уровня техники не способно снизить процент выживших клеток ниже 20%. Единственными препаратами, способными достичь данного результата, являются ООАО 700 и ООАО 1100. Фактически процент выживших клеток составляет всего 6,78% в ОАОО 700, и минимальное наблюдаемое значение снижается на 2,7% в случае ООАО 1100.

Пример 5.

Определение противовоспалительного действия озонированного сиропа на масляной основе.

Противовоспалительное действие озонированного сиропа на масляной основе примера 1 оценивали

in vivo сравнительной оценкой в моменты времени Т0 (до введения состава настоящего изобретения) и Т1 (в конце исследования) субпопуляций лимфоцитов у двух добровольцев, получавших лечение, точной цитофлуориметрией. Пациенты (здоровые и с массой тела 70 кг, возраст 54 года) получали 2,5% озонированный сироп в течение 1 недели в дозе 12 мл два раза в день между приемами пищи. Противовоспалительную активацию макрофагов и лимфоцитов оценивали в периферической крови до и после лечения цитофлуориметрией. Полученные результаты представлены на фиг. 6, на которой показан график разброса распределения лейкоцитов в соответствии с маркировкой CD38 (лейкоцитарный маркер, вертикальная ось) и HLA α r (маркер активации макрофагов, горизонтальная ось). На фигуре показано заметное снижение в момент времени Т1 относительно Т0 маркеров активации макрофагов (HLA α r) (стрелка); вместо этого изменений не наблюдали в субпопуляциях лимфоцитов, ответственных за защитный иммунитет.

Данные результаты показывают, что рассматриваемый состав может оказывать противовоспалительное действие, не вызывая подавления иммунитета.

Пример 6.

Обработка дифференцированных кератиноцитов человека.

Для оценки безопасности рассматриваемого состава и его неспособности вызывать цитопатические эффекты в здоровых клетках дифференцированные кератиноциты человека обрабатывали озонированным подсолнечным маслом (700 мг-экв. O₂/кг) в соответствии с экспериментальными протоколами, уже описанными в примерах 2 и 3. Результаты анализировали через 48 и 72 ч без обнаружения каких-либо изменений жизнеспособности клеток или наличия цитопатических эффектов.

Безопасность состава также оценивали *in vivo* на двух добровольцах (из примера 5), получавших сироп, анализируя традиционные химические параметры крови: не наблюдали никаких изменений базального физиологического состояния.

Пример 7.

In vivo клинический случай.

Затем на животных проводили эксперименты *in vivo*, чтобы проверить, можно ли перенести терапевтические эффекты, наблюдаемые в экспериментальных моделях, описанных до сих пор, на ситуации *in vivo*. Гуманное лечение проводили под ветеринарным контролем на животных, страдающих серьезными спонтанными онкологическими заболеваниями, для которых не существует лечения с признанной эффективностью. Ниже приведены некоторые примеры полученных результатов.

Случай 1. 8-летний кот с гистологически подтвержденным плоскоклеточным эпидермоидным раком носа (фиг. 7a). Данная карцинома известна своей агрессивностью и быстрым развитием у данного животного, поэтому обычно требуется немедленная эвтаназия животного. Получив информацию о быстром развитии заболевания, о местных и системных побочных эффектах и стоимости лучевой терапии, о "разрушающих" эффектах "традиционной" хирургии, владельцы выбрали введение инфльтрацией, пероральным путем и местным нанесением озонированного масла.

Протокол, которому следовали в этом клиническом случае, был следующим.

Инфльтрация ООАО 700 (700 мг-экв. O₂/кг), 1 мл за сеанс (4 сеанса, 1 сеанс каждые 5 дней, всего 4 сеанса) в виде нескольких местных инъекций (6 за сеанс) в новообразование, в пораженную часть, в течение 20 дней. Пероральное введение со дня первой инфльтрации озонированного подсолнечного масла (700 мг-экв. O₂/кг, "ООАО 700") по 5 капель утром и вечером во влажной пище, которой обычно кормили пациента (банка или пакет влажного корма для взрослых кошек) в течение 21 дня. Местно на пораженные участки наносили большое количество подсолнечного масла ООАО 700 два раза в день, начиная со дня первой инфльтрации, в количестве, достаточном для полного покрытия, в том числе кожи перилезии, нанесение повторяли в течение на 21 дня.

Через 24 ч после начала лечения отмечали начало некроза области, где было новообразование (фиг. 7b).

Через 72 ч струнья размягчались, и владелец мог легко удалить их (фиг. 7c).

Через семь дней струнья полностью исчезли. В месте контакта зонда с кожей носа сохранилась большая язва (фиг. 7d).

Через 10 дней было отмечено почти полное заживление язвы с неопителизацией всего кончика носа (фиг. 7e).

В конце третьей недели имело место полное "восстановление" поверхности кончика носа. Владельцы, учитывая очевидное самочувствие субъекта, решили прекратить всю терапию (фиг. 7f).

Таким образом, терапию прерывали, животное помещали под наблюдение в течение 8 месяцев, и у него не было обнаружено рецидивов опухолевого заболевания, которое, таким образом, было устранено. На сегодняшний день, по прошествии более десяти месяцев, субъект находится в отличном состоянии и не показывает признаков возобновления роста опухоли. Владельцы сообщают о полном возвращении к нормальной жизни без обонятельного дефицита.

Пример 8.

Второй *in vivo* клинический случай.

Случай 2. 5-летний кролик с гистологически подтвержденной плоскоклеточной язвенной карциномой прямой кишки (фиг. 8a). Поражение было сильно злокачественным, воспаленным и кровоточащим.

Учитывая деликатность области и хирургический риск недержания кала, было решено провести криохирургию с защитным нанесением на здоровую область озонированного масла.

Перед вмешательством был начат 7-дневный пероральный прием 5 капель озонированного подсолнечного масла (ООАО 700, 700 мг-экв. O_2/kg) утром и вечером, который продолжался до 10 дней после криотерапии. В день вмешательства подготовку субъекта проводили путем очень осторожного смазывания всего пораженного участка маслом (фиг. 8b), чтобы полностью покрыть пораженный участок, включая кожу вокруг области. Инфильтрацию также проводили после вмешательства (ООАО 700, 1 мл за сеанс в виде несколько местных инъекций в опухолевую массу, как уже описано в примере 1) в пораженный участок. На фиг. 8с показано выполнение операции, а на фиг. 8d показано полное замораживание новообразования. Местное нанесение и пероральное введение продолжали до 10 суток после вмешательства. На седьмой день после вмешательства все еще было отмечено присутствие некротического материала, и область все еще выглядела гиперемированной (фиг. 8е). Через десять дней после вмешательства некротический материал отсутствовал, отек данной части и окружающий неоваскуляризированный воспалительный ореол заметно уменьшились (фиг. 8f). На двадцать восьмой день после вмешательства наблюдали полное восстановление области, пораженной новообразованием (фиг. 8g).

На сегодняшний день (11 месяцев спустя) никаких признаков местного возобновления роста или метастазов нет, и субъект не показывает никаких проблем во время дефекации или мочеиспускания (фиг. 8h).

Пример 9.

Случай 3.

Человеческий клинический случай.

Пациентка 93 лет с гистопатологически подтвержденной злокачественной спино-клеточной эпидермоидной карциномой. Новообразование располагалось на коже черепа в теменной области, имело характер крайней инвазивности и быстрое прогрессирование *ab initio*. Фактически, в черепную коробку вторглись всего за несколько недель с последующим париетальным остеолитом. Новообразование быстро продолжило прогрессировать, проникая внутрь черепа и приближаясь к паутинной оболочке. Эти данные были продемонстрированы компьютерной аксиальной томографией. Новообразование появилось снаружи значительных размеров, покрывая весь свод черепа с заметным не только эндофитным (внутри черепа), но и экзофитным (выступ за пределы черепа опухолевой массы) ростом. Новообразование выглядело как сильно злокачественное, характеризующееся высоким уровнем анаплазии, быстрым прогрессированием, наличием неопластических язв значительного размера, заметным воспалением перилезионных краев и полным отсутствием заживления гранулематозной ткани в областях, окружающих опухолевую язву. Пациент страдал, у него повышалась температура.

Не имея возможности вмешаться хирургическим путем из-за увеличения опухолевой массы и преклонного возраста пациента, было решено вмешаться региональной паллиативной лучевой терапией с 8 сеансами по 2 грэя каждый. Исходя из непосредственного опыта, специалисты-радиотерапевты ожидали, что данный подход будет чисто паллиативным, поскольку данный тип рака очень мало поддается лечению. Поэтому было решено применять озонированное подсолнечное масло с содержанием 1100 озонидов ("ООАО 1100") местным нанесением на раковую язву.

Таким образом, возникла проблема со временем применения ОААО 1100 в отношении лучевой терапии, а именно, нужно ли применять продукт до или после лечения гамма-излучением. С этой целью был проведен эксперимент *in vitro*, в котором клетки анапластической карциномы A549 подвергали воздействию ионизирующего излучения (2 грэя) как в условиях предварительной обработки, так и после обработки ООАО 1100 и ООАО 700 (озонированное подсолнечное масло при 700 озонидах). Таким образом, выживаемость клеток оценивали сравнительно тестом с применением кристаллического фиолетового по отношению к контрольным клеткам, подвергавшимся облучению, но не обработанным озонированным подсолнечным маслом. Эксперимент повторяли 16 раз в нескольких планшетах, всего 48 экспериментов (3 экспериментальных условия x 16 повторов). Полученные результаты представлены на фиг. 9.

Полученные результаты указывают на сильное радиосенсибилизирующее действие ООАО 700 и даже больше ООАО 1100. Максимальный обнаруженный эффект был у ООАО 1100 при введении после воздействия гамма-лучей. С механистической точки зрения данный эффект соответствует активации внутреннего митохондриального апоптоза, активируемого озонированным маслом в клетках, подвергшихся генотоксическому радиационному повреждению. Поэтому было решено применять ООАО 1100 в режиме после лечения, т.е. в конце каждого сеанса радиотерапии. Поэтому в конце первого сеанса радиотерапии ООАО 1100, загущенный при 4°C, помещали на опухолевое поражение стеклянным распределителем и язву покрывали марлей и гидрофобной повязкой.

Обработку продолжалось 8 сеансов подряд с интервалом в 2 дня между каждым из них. Прием препарата ООАО 1100 возобновляли в конце каждого сеанса. Таким образом, ООАО 1100 было оставлено в месте действия на 48 ч в перерывах между сессиями.

Макроскопический анализ четко показал сильное уменьшение размеров новообразования, как по амплитуде, так и по глубине. Также отмечали образование репаративной грануляционной ткани по краям поражения.

После этого лучевую терапию прекращали и продолжали только местную обработку ООАО 1100. Впоследствии новообразование не возобновило рост, но продолжило регрессировать.

Эти данные подтверждают специфический ингибирующий эффект ООАО 1100 на опухоль также в отсутствие лучевой терапии. В конце периода наблюдения сохранился только мягкий струп из экссудативного материала, возникший в результате колликативного некроза опухолевой ткани.

Чтобы проверить, оказывает ли местное нанесение ООАО 1100 системное влияние на окислительный баланс, был проведен свободнорадикальный анализ плазмы крови до (Т0) начала обработки ООАО 1100 и в конце (Т1), применяя Fras (свободнорадикальный анализ, Fras 4 Evolve, H&D, Парма, Италия)). В Т0 параметры резко изменились с особенно низким значением окисляющих частиц, т.е. 38 U сог (нормальный диапазон 250-280). Параллельно уровень антиоксидантов сильно увеличился до значения 8318 U сог (нормальный диапазон 2200-2800). Баланс антиоксидант/оксидант (соотношение U сог/U сог), таким образом, составлял 219 (нормальный диапазон 7-10). Данные результаты демонстрируют, что наличие неопластических масс значительного размера означает сильное снижение уровня системного окислительного повреждения. В Т1 значения изменялись следующим образом: 201 U сог, 7544 U сог, 37 U сог/U сог. Следовательно, наблюдали увеличение на 530% окисляющих частиц, уменьшение антиоксидантов на 13%, уменьшение соотношения U сог/U сог на 583%. Данные значения указывают на то, что регресс опухолевой массы связан с изменением окислительного баланса, вызванным обработкой ООАО.

По окончании лечения самочувствие пациента было хорошим, он более не болел, и его не лихорадило. Неблагоприятные эффекты, как субъективные, так и объективные, которые могут быть связаны с лечением ООАО 1100 или лучевой терапией, во время лечения не обнаружены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение состава, содержащего по меньшей мере одно озонированное масло для предотвращения и/или лечения опухоли, где указанное по меньшей мере одно озонированное масло содержит озониды в количестве от 500 до 1500 мэв. O₂/кг.

2. Применение по п.1, где опухоль является злокачественной опухолью.

3. Применение по п.1 или 2, где указанный состав предназначен для введения, выбранного из перорального, местного, инъекционного, ингаляционного и их комбинаций.

4. Применение по любому из пп.1-3, где указанное по меньшей мере одно озонированное масло содержит озониды от 600 до 1400 мэв. O₂/кг, более предпочтительно от 700 до 1300 мэв. O₂/кг.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, где указанное озонированное масло представляет собой растительное масло, прошедшее процесс озонирования, предпочтительно выбранное из: подсолнечного масла, оливкового масла, арахисового масла, арганового масла, масла из виноградных косточек, масла жожоба, соевого масла, кукурузного масла, пальмового масла, хлопкового масла, рапсового масла, кокосового масла, касторового масла, льняного масла, масла бурачника, масла примулы вечерней и их смесей, предпочтительно подсолнечного масла.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, где указанная опухоль выбрана из солидной опухоли; опухоли кожи; опухоли слизистой оболочки и опухоли жидких тканей.

7. Применение по любому из пп.3-6 для местного введения, где состав предпочтительно содержит, в весовых процентах относительно суммарного веса состава, 1-50%, более предпочтительно 2-20%, даже более предпочтительно 3-15% указанного по меньшей мере одного озонированного масла.

8. Применение по п.7, где состав представлен в форме, выбранной из масла, геля и эмульсии, предпочтительно масла.

9. Применение по любому из пп.3-6 для перорального введения, где состав предпочтительно содержит, в весовых процентах относительно суммарного веса состава, 1-5%, более предпочтительно 2-3%, указанного по меньшей мере одного озонированного масла.

10. Применение по п.9, где состав содержит среду, совместимую с указанным по меньшей мере одним озонированным маслом, предпочтительно в количестве, в весовых процентах относительно суммарного веса состава, 95-99%, более предпочтительно 97-98%.

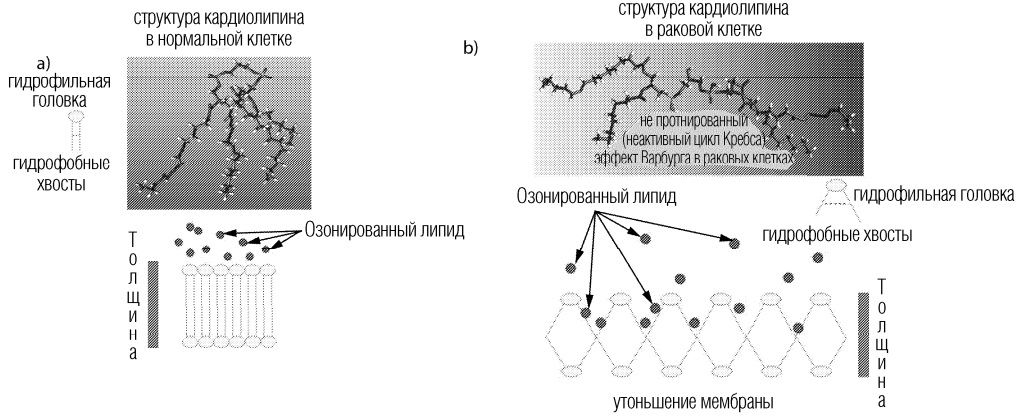
11. Применение по п.9 или 10, где указанная среда содержит по меньшей мере один подсластитель и воду.

12. Применение по п.11, где состав представлен в форме, выбранной из капсулы и напитка, предпочтительно напитка, более предпочтительно сиропа.

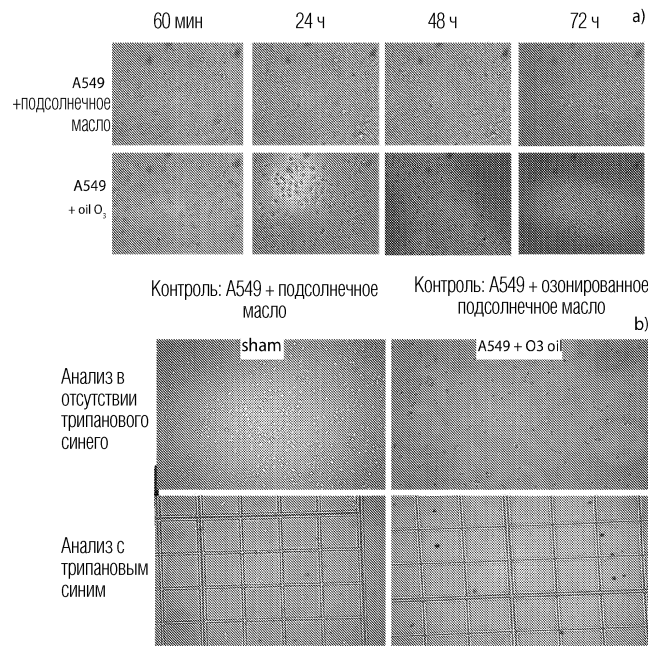
13. Применение по любому из пп.3-6 для введения посредством инъекции, где состав предпочтительно состоит из указанного по меньшей мере одного озонированного масла.

14. Применение по любому из пп.3-6 для ингаляционного введения, где предпочтительно указанный состав дополнительно содержит по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество.

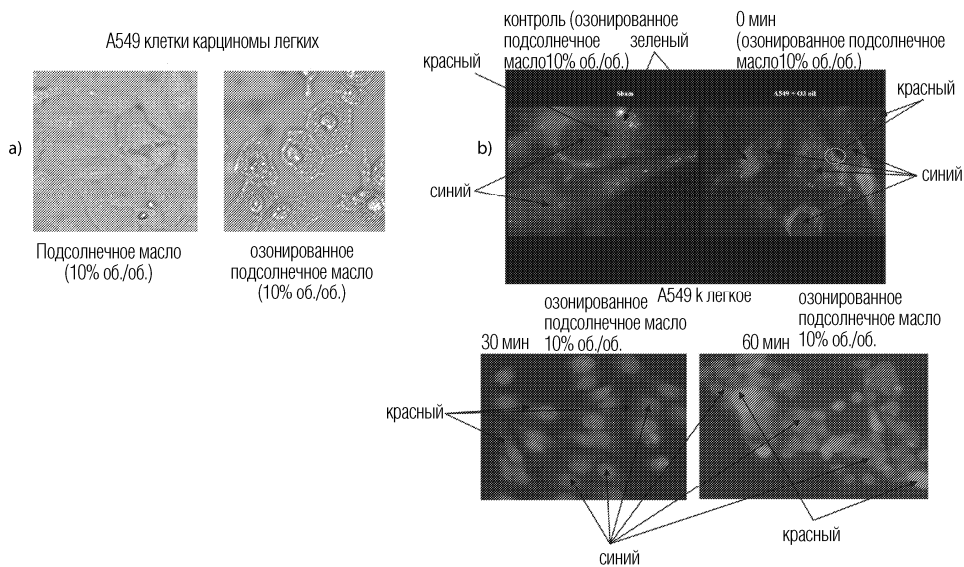
15. Применение по любому из пп.1-14, где лечение опухоли включает введение указанного состава до того, как соотношение U Сог/U Сог между антиоксидантными частицами (U Сог) и окисляющими частицами (U Сог) в крови пациента достигает 4-12, предпочтительно 5-10, более предпочтительно 6-8.



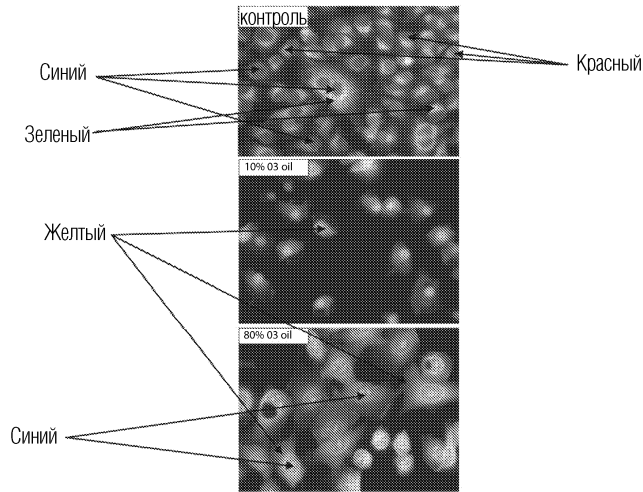
Фиг. 1



Фиг. 2

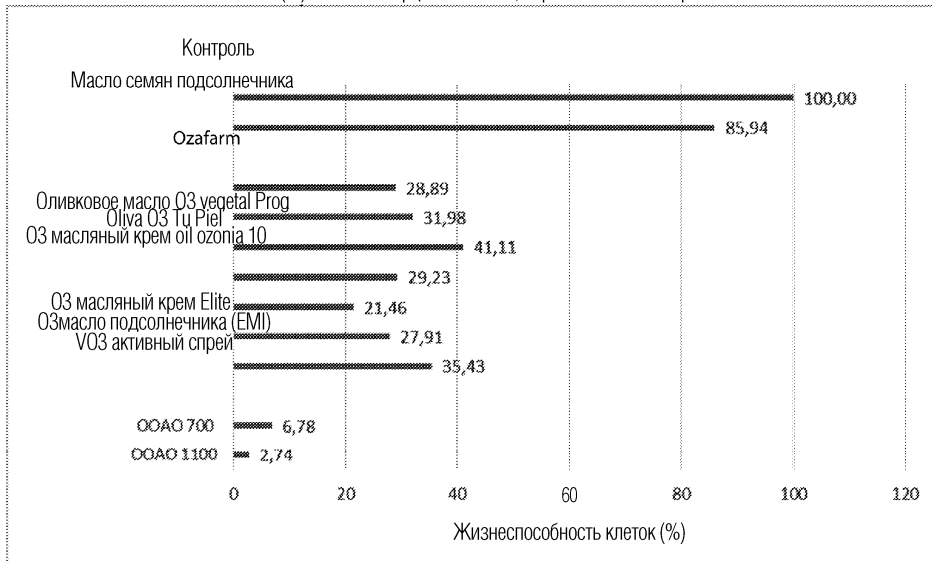


Фиг. 3



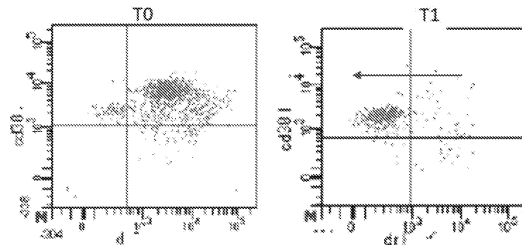
Фиг. 4

Жизнеспособность клеток (%) в клетках карциномы A549, обработанных озонированными маслами



Фиг. 5

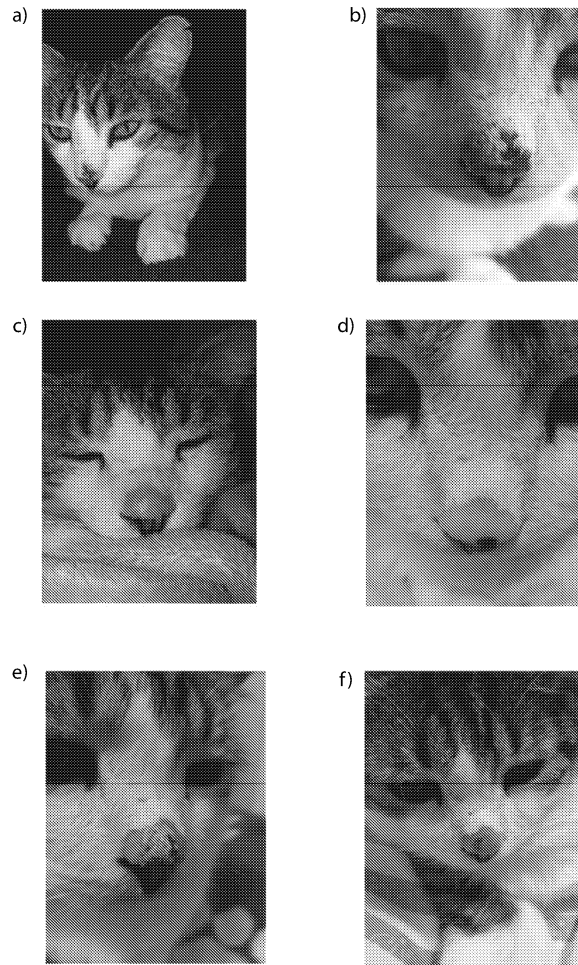
Сироп с озонированным маслом
Снижение активации моноцитов (HLA-dr)



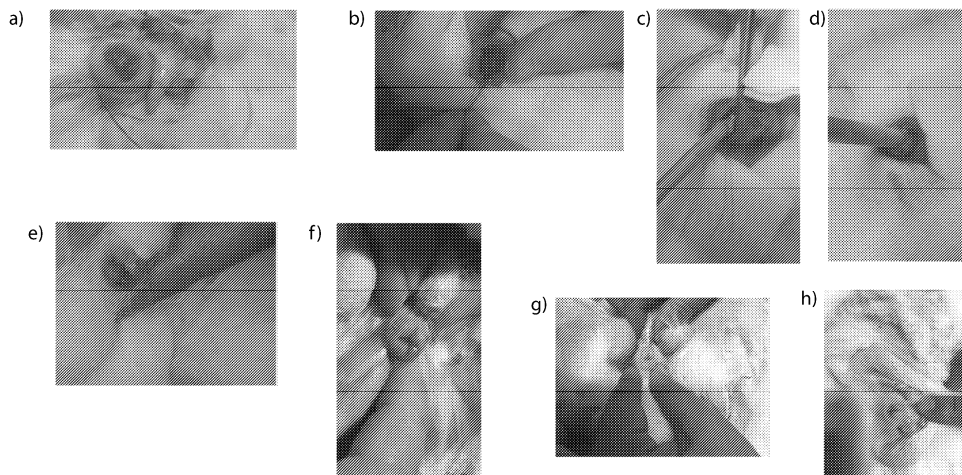
HLA-dr: маркер активации
(воспаление, вызванное невирусным стрессом)

Противовоспалительный эффект

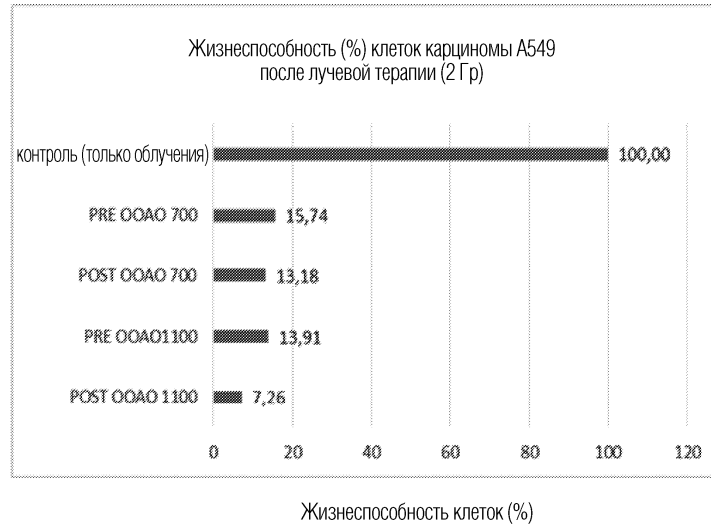
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

