



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **14023** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**A61K 31/191** (2006.01)  
**A61K 31/185**  
**A61P 35/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

### ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ПРОТИПУХЛИННИЙ ЗАСІБ СІЛЬ  $M_1M_2$  АЛЬДОНОВОЇ ТА АМІНОКАРБОНОВОЇ КИСЛОТ

1

2

(21) u200600981

(22) 02.02.2006

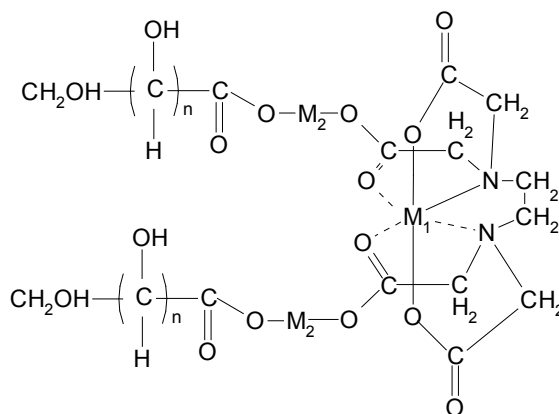
(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

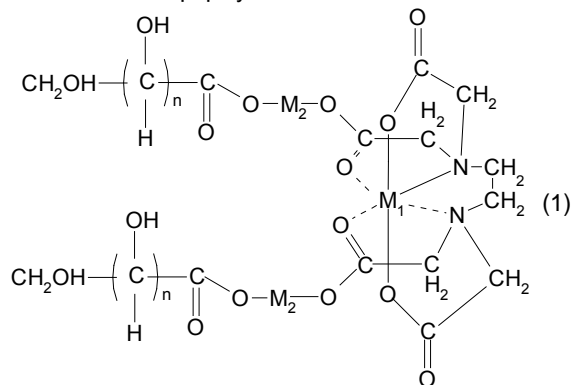
(72) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна  
Петрівна, Зайцев Володимир Миколайович

(73) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна  
Петрівна, Зайцев Володимир Миколайович

(57) Протипухлинний засіб сіль  $M_1M_2$  альдонової  
та амінокарбонОВОЇ кислот формули



Корисна модель відноситься до медицини, а саме до онкофармакології. також додатково відноситься до хімії нових комплексних сполук, зокрема до різнолігандних біметалічних комплексів лужноземельних металів з альдоновою та амінокарбонОВОЮ кислотами та до способів їх синтезу, який проявляє протипухлинну активність, далі "альдонат" загальної формули:



де  $M_1M_2$  - лужноземельні метали.

Серед відомих протипухлинних засобів, най-

більш близьким до рішення, що заявляється, є "Лекарственный препарат оксалиплатина в виде стабильного водного раствора. способ его получения и применение", патент RU №2207857

Однак цьому засобу притаманні наступні недоліки:

- висока токсичність;
- наявність чужерідного металу (платини) у складі препарату;
- нездатність розчинятися в спирто-жирових розчинниках, що заважає безперешкодному проникненню препарату через ліпідні мембрани та гемато-енцефалічний бар'єр.

Задачею цієї корисної моделі було поставлено створення засобу для протипухлинного впливу на злоякісні клітини, який би усував вищевказані недоліки засобу-прототипу та забезпечував би високу ефективність профілактики та лікування онкологічних хвороб на всіх стадіях ракової прогресії.

Поставлена задача вирішується використанням розробленою винахідниками органічної сполуки формули (1) як протипухлинного засобу поряд із розробкою технології його одержання з подальшим експериментальним дослідженням антипро-

(13) **U**(11) **14023**(19) **UA**

ліферативної активності в умовах культури пухлинних тканин.

Передумовою для його створення стала концепція авторів про металобілковозалежну регуляцію детермінації диференціювання клітин [Суслов Е.И., Подгаевская Т.П. Новая концепция канцерогенеза и перспективы лечения рака // Укр. биохим. журн. - 2000. - N 4, С. 566.], згідно з якою ракова прогресія під впливом канцерогенів пов'язана із дестабілізацією молекулярних зв'язків в ДНК та між ДНК та кальцій-зв'язуючими внутрішньоядерними протеїнами, експресією онкогенів, втратою кальцію в ДНП. Також відомо, що для ефективної регуляції активності кальцію кальмодуліном потрібно, щоб хоча б один його домен був заповнений іншим лужноземельним металом. А для підтримки молекулярної архітектури та стабільності біохімічних мембран особливо важливою є здібність  $M_{(n)}$  наближувати молекули за рахунок сил електростатичного притягання.

Відомо, що біохімія сахарів ракових пухлин теж в умовах гліколізу. Деякі  $M_{(n)}$  є регуляторами гліколізу та каталізаторами більшості ферментативних реакцій біохімічних циклів [Чекман И.С., Горчакова Н.А., Николай С.Л. Магний в медицине. - Кишинёв, Штенда, 1992. - 101 с.].

Для одержання засобу за формулою 1, яка в силу сукупності властивостей його окремих складових може бути засобом для лікування злоякісних пухлин, здійснюють синтез комплексної сполуки.

Приклад синтезу комплексної сполуки Солі  $M_1M_2$  альдонової та амінокарбонової кислоти.

В стакан об'ємом 500мл вносили 50мл 0,25моль/л розчину солі  $M_{(3)}$  амінокарбонової кислоти і 50мл 0,23моль/л розчину альдонату  $M_{(2)}$  при легкому нагріванні. Далі інгредієнти змішували. РН суміші доводили до 9,2. Додавали 50мл 0,23моль/л розчину хлориду  $M_{(1)}$ . Комплексну сполуку висолювали з водного розчину додаванням етилового спирту при інтенсивному її перемішуванні. Утворену маслоподібну субстанцію затирали в абсолютному етиловому спирті до повної кристалізації, відфільтровували і висушували протягом 4 годин при температурі 100°C. Після висушування сполука, що виділена має наступний кількісний склад (% мас):

C:H:N: $M_{(2)}$ : $M_{(1)}$ =32:4:3:10:3

Індивідуальність нової речовини підтверджена спектроскопічно методами рентгенівського фазового аналізу та інфрачервоної спектроскопії. Склад речовини доведено методом елементного аналізу на основні компоненти.

Розроблена сполука (альдонат) формули (1) є представником нового класу різнолігандних біметалічних комплексів лужноземельних металів з альдоновою та амінокарбоновою кислотами (органічними сполуками). Вона є комплексоном (лігандом), сіллю  $M_1M_2$  альдонової та амінокарбонової кислот. Альдонат виявився малотоксичним на живі клітини. Нами була визначена його молекулярна формула. Встановлено, що це зовсім нова сполука. Створено таке співвідношення компонентів - іонів лужноземельних металів, альдонової та амінокарбонової кислоти, яке забезпечує протипух-

линний (антипроліферативний) ефект на злоякісні клітини в експерименті на культурі клітин недрібноклітинного раку легень шляхом блокування процесу їх проліферації, на відміну від засобу-прототипу.

Сполука альдонат за фізичними властивостями є білою дрібнокристалічною речовиною у вигляді порошку соленого смаку, без запаху, добре розчиняється у воді та спиртожирових розчинниках, що сприяє процесу його проникнення через ліппротеїдні клітинні мембрани, при довгостроковому збереженні не змінює колір. Складові частини альдонату є ключовими метаболітами окислювально-відновлювальних внутрішньоклітинних ферментативних реакцій. Так, компонент альдози - альдонова кислота приймає участь у циклі Кребсу, є метаболітом багатьох біохімічних реакцій у ядрі та в цитоплазми клітин;  $M_{(n)}$  входять до структури білків ДНП, зв'язують нуклеотиди ДНК [Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты. - Москва, Медицина, 1979. - С. 208-210]. Здорові клітини не потребують молекулярної корекції. Ракові клітини мають дефіцит  $M_{(n)}$ , обумовлений дисбалансом геному, спрямованого на синтез атипових злоякісних клітин з повною втратою їхнього типоспецифічного диференціювання і розладами мітотичного циклу. Розроблений протипухлинний засіб - альдонат є донатором  $M_1M_2$  в ДНП пухлинних клітин шляхом їхніх носіїв - комплексонів, а саме залишків альдонової та амінокарбонової кислот, які сприяють внутрішньоядерній інкорпорації деяких  $M_{(n)}$ , безпосередньо впливаючи на процес гальмування клітинного циклу пухлинних клітин та їхньої проліферації з перепрофілюванням проліферації на апоптоз. Засіб альдонат тим позитивно відрізняється від прототипу, що впливає на структуру ДНП, як із зовнішньої сфери (через  $M_{(n)}$  - зв'язуючі ядерні білки), так і з внутрішньої (через інкорпорацію  $M_1M_2$  в молекулярну структуру нуклеотидів).

На 100 нелінійних мишах досліджені параметри гострої токсичності альдонату. Засіб вводили внутрішньочеревинно в дозі від 1000,0мг/кг до 10000,0мг/кг маси тварин. Встановлено, що середньосмертельна доза альдонату (LD-50) дорівнювала 8000мг/кг.

Вивчення протипухлинної активності альдонату проводили на культурі пухлинних клітин А-549, отриманих з недрібноклітинного раку легень людини. Для порівняння використовували 10% розчин відомого протипухлинного засобу за патентом №2207857 - оксаліплатину. Одночасно в одну частину культури пухлинних клітин вносили засіб альдонат в другу - оксаліплатин в розведенні від  $10^{-1}$  до  $10^{-4}$ . Результат реєстрували через 24, 48 і 72 години.

Приклад 1. Відомий протипухлинний засіб оксаліплатин вводили в культуру пухлинних клітин недрібноклітинного раку в розведенні від  $10^{-1}$  до  $10^{-4}$ , і на 24,48 та 72 годину ураховували результат дослідження. Максимальне блокування проліферації ракових клітин спостерігалось на 48 годину і досягало 20% від загалу клітин культури.

Приклад 2. Запропонований протипухлинний засіб альдонат вводили у культуру пухлинних клі-

тин недрібноклітинного раку легені в розведенні від  $10^{-1}$  до  $10^{-4}$ . Результат реєстрували через 24, 48 і 72 години. Максимальне блокування проліферації ракових клітин альдонатом спостерігалось на 48 годину і досягало 90% (Фіг.)

Виражений протипухлинний ефект альдонату був підтверджений також шляхом визначенням Z-потенціалу культури пухлинних клітин методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Метод здійснювали при застосуванні дози 200мг/кг. Під впливом засобу в пухлинних клітинах А-549 визначено зменшення від'ємного та збільшення позитивного потенціалу відносно контролю.

Таким чином, нами встановлено, що особливістю альдонату є виражена здатність гальмувати проліферацію пухлинних клітин та цілеспрямовано активувати апоптоз малігнізованих клітин (через спроможність внутрішньоядерної інкорпорації іонів  $M_1M_2$  в пухлинні клітини),

Протипухлинна та антиметастатична дія розробленого засобу була перевірена в експерименті на 100 мишах лінії С57ВL з моделями карциноми Л'юїс і меланоми В-16, які метастазують в легені. 20 тварин були контрольними (не лікованими). 80 мишей були проліковані розробленим засобом альдонатом в дозах 200мг/кг і 450мг/кг маси тварини, який вводився внутрішньочеревно.

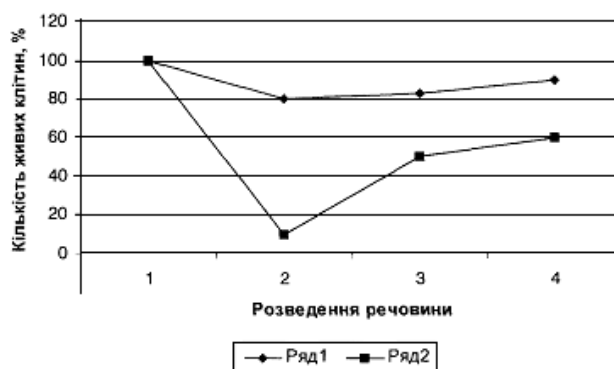
Приклад 3. При лікуванні мишей альдонатом в дозі 200мг/кг, який вводився 10 разів на протязі 21 доби з перервою на одну добу після кожного введення засобу. Спостерігалось зменшення первинної пухлини в середньому на 64% в порівнянні з контролем - нелікованими мишами. Кількість метастазів зменшувалася в середньому на 86%.

Приклад 4. При лікуванні тварин альдонатом в

дозі 450мг/кг, який вводили 10 разів на протязі 21 доби з перервою після кожного введення на одну добу. Спостерігалось зменшення первинної пухлини і кількості метастазів в середньому на 99%, тобто пухлинний ріст практично зупинявся повністю.

При аналітичному порівнянні антипроліферативних (протипухлинних) можливостей запропонованого та відомому засобів встановлено: у альдоната антипроліферативна дія відносно ракових клітин у 4,5 разів ефективніша. При цьому при розведеннях цей ефект зберігається значно довше, ніж у прототипу, що є великою перевагою, тому що для досягнення подібного ефекту лікування потрібна менша доза засобу, а це в свою чергу знижує токсичне навантаження. Альдонат у порівнянні з прототипом ( $LD_{50}$  не перевищує 8000мг/кг) у 200 разів менш токсичний ( $LD_{50}$  прототипу 40мг/кг). Альдонат гальмує ріст клітин в культурі пухлинних клітин лінії А-549, отриманих з недобринного раку легені людини на 90% при критерії значності  $>25\%$ .

Таким чином, запропонований протипухлинний засіб альдонат, який має хімічно встановлену молекулярну формулу, - у чотири з половиною рази ефективніше блокує проліферацію клітин недрібноклітинного раку легені людини, ніж відомий протипухлинний препарат оксаліплатини. При цьому токсичність альдонату у 200 разів менша в порівнянні з відомим препаратом. Це свідчить про велику перспективу розробленого протипухлинного засобу для лікування недрібноклітинного раку легень людини, для терапії якого в теперішній час немає надійних хіміотерапевтичних препаратів.



Примітка: Ряд 1 - оксаліплатин за патентом №2207857  
Ряд 2 - засіб альдонат

Фіг.