



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77371

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/191 (2006.01)

A61K 31/185

A61P 35/00

C07C 59/00

C07C 229/76 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СІЛЬ M_1M_2 АЛЬДОНОВОЇ ТА АМІНОКАРБОНОВОЇ КИСЛОТ, ЩО ВІЯВЛЯЄ ПРОТИПУХЛИННУ ДІЮ, ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

1

2

(21) а200600983

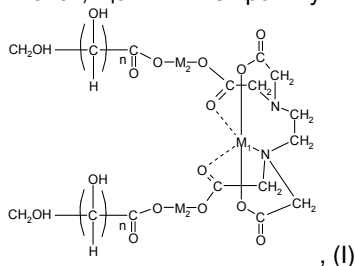
(22) 02.02.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

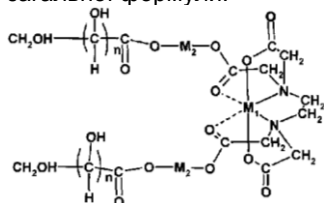
(72) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна
Петрівна, Зайцев Володимир Миколайович(73) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна
Петрівна, Зайцев Володимир Миколайович

(56) RU 2 207 857 C2

Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические
аспекты. - Москва, Медицина, 1979. - с. 208-210(57) 1. Сіль M_1M_2 альдонової та амінокарбонкової
кислот, що виявляє протипухлинну дію, формули:де M_1, M_2 - лужноземельні метали.

2. Спосіб одержання солі M_1M_2 альдонової та амінокарбонкової кислот, що виявляє протипухлинну дію, який **відрізняється** тим, що 50,0мл 0,25М/л розчину солі $M_{(3)}$ амінокарбонкової кислоти і 50,0 мл 0,23М/л розчину альдонату $M_{(2)}$ змішують при легкому нагріванні, рН суміші доводять до 9,2, додають 50,0мл 0,23М/л розчину хлориду $M_{(1)}$, комплексну сполуку при інтенсивному перемішуванні висолюють з водного розчину додаванням етилового спирту, утворену маслоподібну субстанцію затирають в абсолютному етиловому спирті до повної кристалізації, відфільтровують та висушують протягом 4 годин при температурі 100°C.

Винахід 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 амінокарбонковою кислотами та до способів їх синтезу, який проявляє протипухлинну активність, далі "альдонат" загальної формули:

де M_1M_2 - лужноземельні метали.

Серед відомих протипухлинних засобів, найбільш близьким до рішення, що заявляється, є ["Лекарственный препарат оксалиплатина в виде стабильной водного раствора, способ его получения и применение", патент RU №2207857].

Однак цьому засобу притаманні наступні недоліки:

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

(13) C2

(11) 77371

(19) UA

Задачею цього винаходу 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 антипроліферативної 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 тече 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. - 101с].

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 пермішуванні. 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 біме-

талічних комплексів лужноземельних металів з альдоновою та амінокарбоновою кислотами (органічними сполуками). Вона є комплексонатом (лігандом), сілллю 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 протипухлинний (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 ліпопротейдні клітинні мембрани, при довгостроковому збереженні не змінює колір. Складові частини альдонату є ключовими метаболітами окислювально-відновлювальних внутрішньоклітинних ферментативних реакцій. Так, компонент альдози - альдонової кислота приймає участь у циклі Кребсу, є метаболітом багатьох біохімічних реакцій у ядрі та в цитоплазмі 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 внутрішньоядерної 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 години ураховували результат дослідження. Максимальне блокування проліферації ракових клітин спостерігалось на 48 годину і досягло 20% від загалу клітин культури.

Приклад 2

Запропонований протипухлинний засіб альдонат вводили у культуру пухлинних клітин недрібноклітинного раку легень 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 години і досягло 90% (Рис. 1)

Виразений протипухлинний ефект альдонату був підтверджений також шляхом визначенням Z-потенціалу культури пухлинних клітин методом електрофорезу в поліактрламідному 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 аниметастатична дія розробленого засобу була перевірена в експерименті на 100 мишах лінії С57BL з моделями карциноми Л'юїс і меланоми В-16, які метастазують в легень. 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 до-

би 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 недрібноклітинного раку легень 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 легень людини, ніж відомий протипухлинний препарат оксаліплатині. 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.

48 година культивування під впливом протипухлинних засобів

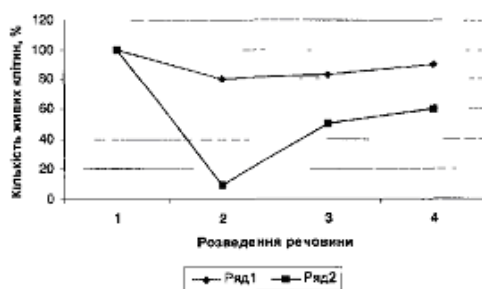


Рис. 1

Примітка: Ряд 1 – засіб оксаліплатин за патентом № 2207857

Ряд 2 – засіб альдонат