



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75857** (13) **C2**
 (51) МПК (2006)
A61K 31/191 (2006.01)
A61K 31/66
A61K 33/06
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ДИГІДРАТ МАГНІЮ ДИКАЛЬЦІЄВОЇ ОКТАКАЛІЄВОЇ СОЛІ ГЛЮКОНОВОЇ ТА ОКСІЕТИЛІДЕНДИФОСФОНОВОЇ КИСЛОТ ЯК ЗАСІБ ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

1

2

(21) а200511138

(22) 24.11.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна Петрівна, Бачиш Євгенія Миколаївна

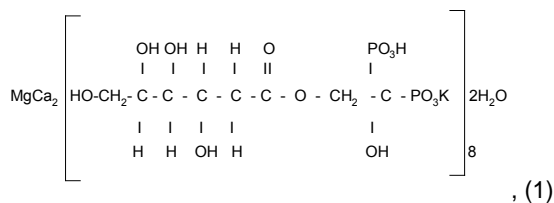
(73) Суслов Євгеній Іванович, Підгаєвська Тетяна Петрівна, Бачиш Євгенія Миколаївна

(56) UA, 42244, С, 15.10.2001

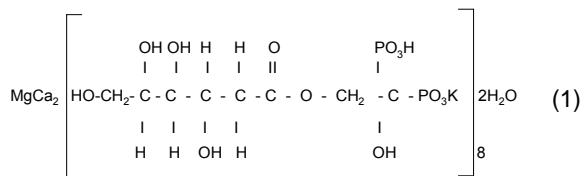
UA, 40714, С, 15.08.2001

UA, 12053, С, 16.09.1993

(57) 1. Дигідрат магнію дикальцієвої, октакалієвої солі глюконової та оксіетилідендифосфонові кислот формули (1)



Винахід відноситься до хімії нових комплексних сполук, зокрема до дигідрату магній дикальцієвої октакалієвої солі глюконової та оксіетилідендифосфонові кислот формули:



далі "глюкофорс", який проявляє протипухлинну активність, та до способів його одержання, та додатково відноситься до медицини, а саме до

як засобу лікування злоякісних пухлин.

2. Спосіб одержання дигідрат магнію, дикальцієвої, октакалієвої солі глюконової та оксіетилідендифосфонові кислот, який **відрізняється** тим, що піддають взаємодії оксид магнію, глюконат кальцію, гідрат калію та оксіетилідендифосфонову кислоту в еквімолярних співвідношеннях, причому вказану взаємодію здійснюють при температурі 15-80°C протягом 24-72 год під тиском 1 атм.

3. Спосіб лікування злоякісних пухлин, який **відрізняється** тим, що хворому вводять сполуку за ф. 1 в дозі, що відповідає терапевтично активній її кількості, а курс лікування визначають по онкотестуванню та/або по клініко-лабораторним показникам.

онкофармакології та до терапевтичного лікування злоякісних пухлин.

Пошук нових засобів для лікування злоякісних пухлин є одною з першорядних задач сучасної онкофармакології.

Серед відомих протипухлинних засобів як найбільш близький до рішення, що заявляється, є засіб Суслова-Підгаєвської, який представляє собою суміш кальцію глюконату та комплексону - динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти у співвідношенні 1 : 1 масових частин (патент UA № 42244). Однак цьому засобу притаманні наступні недоліки:

недостатній антипроліферативний ефект: пригнічення проліферації в 30%.

незбалансоване співвідношення інгредієнтів засобу;

(13) **C2**(11) **75857**(19) **UA**

недостатня активність апоптозу злоякісних клітин;

використання складових компонентів засобу як суміш речовин, а не синтезованої хімічно детермінованої речовини;

висока токсичність одної із складових частин - динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти;

нез'ясованість молекулярної форми засобу.

Задачею цього винаходу є створення такого засобу для лікування злоякісних пухлин, яке забезпечило би високу ефективність лікування за рахунок усунення вищевказаних недоліків.

Поставлена задача вирішується використанням сполуки формули (1) як протипухлинного засобу та способом його одержання.

Сполука (1) є представником нового класу комплексонатів лужних металів фосфорорганічних сполук з С-О та з Р-С-Р зв'язком.

Складові частини "глюкофору" є ключовими метаболітами окислювально-відновних ферментативних реакцій. Так, оксиетилідендифосфонова кислота, яка складає частину молекули протипухлинного засобу, відноситься до структурних аналогів пірофосфату (PP_1), який бере участь у циклі трикарбованих кислот Кербса, циклі повного згорання пірофосфату, головним джерелом якого є гліколітичне перетворення вуглеців. Відомо, що біохімія вуглеців ракових пухлин тече в умовах гліколізу. Mg^{2+} є каталізатором більшості ферментативних реакцій багатьох біохімічних циклів (1). Глюконова кислота є продуктом ферментативного окислення глюкози.

Біофосфонати використовуються як речовини, що впливають на мінералізацію кісток (2,3). Більшість з них не відносяться до протипухлинних засобів, тому що їхня протипухлинна активність слабка (4).

Особливістю "глюкофору" є виражена здатність гальмувати пухлинний ріст та його метастази в експерименті та в клініці (значно зменшується показник об'єму метастазів на відміну від відомих препаратів) поряд з основною властивістю комплексонатів подібного класу щодо стійкого комплексонування з металами (здібністю внутрішньоядерної інкорпорації іонів Ca^{2+} в пухлинні клітини), цілеспрямованої активації апоптозу, малої токсичності на організм.

В розробленому засобі за рахунок міжмолекулярного збалансування співвідношення компонентів та іонів лужноземельних та лужних металів (К, Са, Mg) присутності комплексону оксиетилідендифосфонової кислоти (ОЕДФ), забезпечується зростання протипухлинного ефекту злоякісних клітин шляхом підвищення процесу їх апоптозу та блокування онкогенетичної активності, а також спрощення процесу одержання засобу (замість суміші окремих речовин використовується речовина з визначеною молекулярною формулою $-Mg, Ca_2 (C_8 H_{15} P_2 O_{13} K)_8 2H_2O$). Цей засіб являє собою комплексонат-ліганд у вигляді дигідрату магній дикальцієвої октокалієвої солі оксиетилідендифосфонової та глюконової кислот.

Передумовою для створення засобу для блокування проліферації ракових та лейкозних клітин

стала запропонована нами концепція про маталобілковозалежну регуляцію детермінації диференціювання клітин (5,6), згідно з якою ракова прогресія пов'язана із дестабілізацією молекулярних зв'язків між ДНК та кальцій-зв'язуючими внутрішньоядерними протеїнами, експресією онкогенів, втратою іонізованого кальцію. Також відомо, що для ефективної регуляції максимальної активності кальцію кальмодуліном потрібно, щоб хоча б один його домен був заповнений магнієм. А для підтримки молекулярної архітекτονіки та стабільності біохімічних мембран особливо важливою є здібність магнію та кальцію наближувати молекули за рахунок сил електростатичного притягання. Магній бере участь в регуляції гліколізу. Таким чином як кальцій, так і магній є регулятором ключових ферментативних процесів в організмі.

Відомо, що група біофосфонатів разом з магнієм блокує синтез білку на стадії ініціації (7). Звідси витікає припущення, що складові компоненти засобу, що заявляється, можуть блокувати процеси дисоціації в хроматині на стадії ініціації неопластичної трансформації клітин та синтезу онкоглобулінів. Це може забезпечуватись завдяки наявності іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} в молекулі комплексонату ОЕДФ.

Для одержання комплексної сполуки 1, яка в силу сукупності властивостей його окремих складових може бути засобом для лікування злоякісних пухлин, здійснюють взаємодію оксиду магнію, кальцію глюконату, гідрату калію та оксиетилідендифосфонової кислоти при 15-80°C протягом 24-72 годин під тиском 1 ат. Одержаний розчин піддають випарюванню до одержання сухої речовини. Діючі речовини беруть в еквімолярних співвідношеннях.

Винахід пояснюється прикладами конкретного виконання.

ПРИКЛАД 1

В реактор вносять 14,48г (0,02моль) оксиетилідендифосфонової кислоти і послідовно додають 0,8г оксиду магнію (0,02моль), 5,48г кальцію глюконату (0,02моль), 10,0мл дистильованої води та доводять рН до 7,0 2М розчином гідрооксиду калію. Розчин залишають при 20°C на 24 год. до просвітління. Взаємодію вказаних компонентів проводять при температурі 35-40°C та при тиску 1атм. Далі випарюють рідину на водяній бані до сухої речовини.

Результати мас-спектрального аналізу отриманої речовини:

Знайдено, %

Са - 2,4; 2,2;	С - 22,7; 22,9;	О - 49,1; 49,5;
Mg - 0,9; 0,7;	Н - 3,4; 3,6;	
К - 8,2; 9,1;	Р - 14,6; 14,8;	

За хімічною формулою, %:

Са - 2,3;	Н - 3,5;
Mg - 0,7;	Р - 14,7;
К - 9,1;	О - 49,5;
С - 22,7.	

ІЧ-спектр, KBr, cm^{-1} : 1820-1620 ($C=O$); 2965, 2920 (CH_2); 1390 (CH_2); 1176, 1165 (P - O); 1090, 1053 ($\gamma P - O$).

Дані мас-спектрального, хімічного аналізів та ІЧ-спектру підтверджують теоретичні розрахунки структурної формули сполуки нового класу

комплексонатів, а саме дигідрату магній дикальцієвої, октокальцієвої солі глюконової та оксietiлідендифосфонової кислот - $Mg\ Ca_2\ K_8\ DD$.

Сполука є білою дрібнокристалічною речовиною у вигляді порошку солоного смаку, яка добре розчиняється у воді, практично не розчинною в органічних розчинниках, мало гігроскопічною, при довгостроковому збереженні не змінює колір.

Параметри гострої токсичності вивчені на білих нелінійних мишах. Отриману речовину одноразово вводили мишам внутрішньочеревним шляхом. Результати урахували в альтернативній формі на 14 добу після затравлення. Середньо смертельна доза (LD_{50}) $Mg\ Ca_2\ K_8\ DD$ дорівнювала 300мг/кг.

Вивчення протипухлинної активності $Mg\ Ca_2\ K_8\ DD$ провадилося на культурі ракових клітин легень людини.

ПРИКЛАД 2

Для проведення експерименту готували 10% водний розчин запропонованого засобу $Mg\ Ca_2\ K_8\ DD$ - глюкофору.

В культуру пухлинних клітин лінії A-549, одержаних з недрібноклітинного раку легень людини, вводили "глюкофорс" у розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування клітин. Максимальне пригнічення проліферації клітин спостерігалось на 48 годину експерименту і досягло 75 % від загалу клітин. Показник апоптичної активності дорівнював 25 на 100 клітин

ПРИКЛАД 3

В культуру пухлинних клітин мієломи мишей лінії BALB /c/ вводили засіб, що заявляється, - у розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування клітин. Максимальне пригнічення проліферації клітин спостерігалось на 48 годину експерименту і досягло 71 % від загалу клітин. Показник апоптичної активності дорівнював 14 на 100 клітин.

Випробування запропонованого нами протипухлинного засобу проводили в порівнянні з відомим засобом по п. UA № 42244 в експериментах на культурі пухлинних клітин лінії A-549, отриманих з недрібноклітинного раку легень людини і на культурі клітин мієломи мишей лінії BALB/c/.

Для проведення експерименту готували 10 % водний розчин глюкофору.

Приклад 1

Протипухлинний засіб за відомим рішенням вводили в культуру пухлинних клітин недрібноклітинного раку легень в розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування клітин. Максимальне пригнічення (блокування) проліферації ракових клітин спостерігалось на 48 годину експерименту і досягло 30% від загалу клітин. Показник апоптичної активності дорівнював 2 на 100 клітин.

Приклад 2

Запропонований протипухлинний засіб глюкофорс вводили в культуру пухлинних клітин недрібноклітинного раку легень в розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування. Максимальне пригнічення проліферації клітин спостерігалось на 48 годину експерименту і досягло 75% від загалу клітин (у 2,5 рази вище, ніж для

відомого засобу). Показник апоптичної активності був у 14 разів більший - 25 на 100 клітин.

Приклад 3

Протипухлинний засіб за відомим рішенням вводили в культуру пухлинних клітин мієломи мишей у розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування. Пригнічення (блокування) проліферації лейкозних клітин не спостерігалось ні в одному терміні експерименту. Апоптична активність не визначена.

Приклад 4

Запропонований протипухлинний засіб глюкофорс вводили в культуру пухлинних клітин мієломи мишей в розведенні 0, -2, -3, -4 на 24, 48 і 72 годину культивування. Максимальне пригнічення проліферації клітин спостерігалось на 48 годину експерименту і досягло 71% від загалу клітин. Показник апоптичної активності дорівнював 14 на 100 клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що у відповідності до способу, що заявляється, лікування злоякісних пухлин хворому вводять сполуку за ф. 1 в дозі, що відповідає терапевтичне активній її кількості, а курс лікування визначають по онкотестуванню та/або по клініко-лабораторним показникам.

Визначення дози запропонованого протипухлинного засобу для лікування раку проводили в експерименті на мишах. Спочатку визначали вірогідність токсичних проявів дії засобу на 100 нелінійних мишах шляхом одноразового внутрішньочеревного введення засобу в дозах від 10 до 600мг/кг маси тварин. Встановлено, що LD_{50} цього засобу дорівнює 300 мг/кг маси мишей. Морфологічні дослідження показали, що перші прояви токсичної дії засобу визначалися при дозі засобу 250мг/кг маси миші (початкові дистрофічні зміни у деяких паренхіматозних органах: у печінці, нирках. Терапевтичну дозу визначали на експериментальних моделях карциноми Л'юїс, яка метастазує в печені, і меланоми B-16.

Для експериментів були використані 200 мишей лінії C57BL з вищевказаними моделями. Перші прояви ефекту були визначені при дозі засобу 70 мг/кг (показники ваги та об'єму метастазів в середньому гальмувались на 50 %). При дозі засобу 100-200 мг/кг ці показники зростали до 75% - 80%. При підвищенні терапевтичної дози засобу в деяких випадках виникали первинні ознаки токсичної дії у вигляді змін структури паренхіматозних органів. Доза засобу 100-150 мг/кг визначена середньотерапевтичною.

Курс лікування для хворих - волонтерів глюкофосом провадили шляхом 10 разових внутрішньовенних введень протипухлинного засобу через кожні 48 год в дозі 100-150мг/кг. Вказаний алгоритм був обумовлений особливостями дії засобу на пухлини, отриманими в експериментах: як на культурі тканин пухлини, так і на моделях лінійних тварин. Ефективність лікування оцінювали шляхом проведення онкотестування в динаміці кожні 3-4 тижні по закінченню курсу. Стійка ремісія пухлинного росту, як правило, визначалась після проведення 2-4 курсів лікування глюкофорсом.

Внаслідок апробації глюкофору (на групі 30 добровольців, в тому числі у хворих на

недрібноклітинний рак легенів, рак молочної залози та рак печінки у III-IV стадії з метастазами у лімфатичні вузли та внутрішні органи) був встановлений знеболюючий ефект, антигістамінна та протизапальна дія. Засіб глюкофорс застосовувався у вигляді 15 % водного розчину в дозі 100 мг/кг № 10 на курс для в/в введення. Хворі одержали по 3 курси внутрішньовенних введення глюкофору протягом 3-х - 5-х міс з наступним моніторингом онкотестування по слині (8,9) кожні 4 тижня. У 80% хворих спостерігалась стійка ремісія онкопроцесу, у 18% - часткова регресія і у 2% - повторна регресія. Токсичної дії засобу під час прийому ні в одному випадку не спостерігалось (ні нудоти, ні блювоти, ні випадання волосся, зубів, ні головної болі та змін у формулі крові). Протипухлинна та антиметастатична дія засобу глюкофору як в експерименті, так і в клініці у хворих на недрібноклітинний рак легенів виявилась набагато сильнішою, ніж дія відомих хіміотерапевтичних препаратів. Відомо, що на теперішній час недрібноклітинний рак легенів маже не піддається хіміотерапії.

Курс лікування злоякісних пухлин залежить від багатьох причин, в тому числі від виду пухлини, тяжкості захворювання, віку, супутніх захворювань та ін.

Винахід пояснюється прикладами конкретного виконання.

Приклад 5

Хвора Г-ец, 78 р. Діагноз - недрібноклітинний рак правої легені з метастазами в хребет, в ребра, в печінку, III-IV ст. Історія хвороби № 185. Були різноманітні скарги, хвора не вставала з ліжка. Після 4 введення глюкофору пацієнтка самостійно встала з ліжка. Через 3 курси лікування при рентгенологічному дослідженні тіні раку легень не виявлено. Метастази значно зменшені в об'ємі, склерозовані та зарубцьовані.

Приклад 6

Хвора М-ец, 50 р. Стан після мамектомії з приводу аденокарциноми молочної залози III-IV ст. пройшла декілька курсів звичайної хіміотерапії з цисплатином. Метастазування раку молочної залози в регіонарні лімфатичні вузли. Скарги на болі в місцях метастазування, облісіння, нудоту, та ін. Після 5 введення глюкофору нудота та болі в області молочної залози зникли, лімфатичні вузли значно зменшились у об'ємі та порозм'якувались. Натепер у пацієнтки протягом 3-х років після всього одного курсу лікування глюкофором ремісія А.

Приклад 7

Хворий М-ла, 45 р. Діагноз-аденокарцинома печінки, III-IV ст з метастазами в стегно. Приймав 3 курсів лікування глюкофором, починаючи з 10.02.04. При УЗД печінки пухлина не визначена.

При онкотестуванні слини через 30 діб після останнього введення препарату реакція від'ємна.

Оцінка загального стану до та після лікування за критеріями ВОЗ була 4-2.

Таким чином при аналітичному порівнянні антипроліферативних (протипухлинних) можливостей запропонованого та відомому засобів встановлено: у глюкофору антипроліферативна дія відносно ракових та лейкозних клітин майже у три рази ефективніша. В цілому, глюкофорс в клінічних дослідженнях виявив значну протипухлинну і протиметастазну дію, знеболюючий, антигістамінний та протизапальний ефект. Технологія його виготовлення в зв'язку з використанням синтезованої речовини з хімічно детермінованою молекулярною формулою набагато простіша ніж у прототипу. Виражена припухлинна дія глюкофору юбула показаною в клініко-експериментальних дослідженнях. Препарат гальмує ріст клітин в культурі пухлинних клітин лінії А-549, отриманих з недоброякісного раку легені людини на 75% при критерії значності >25%, та в культурі пухлинних клітин мієломи мишей лінії BALB/c/ на 75 % при критерії значності >25% (4)

Висока протипухлинна і антиметастатична активність глюкофору визначена при лікуванні добровольців у останньої стадії злоякісних пухлин, у лікуванні яких в державних установах було відмовлено.

Вважаємо, що протипухлинний засіб глюкофорс має велике майбутнє.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ:

1. Березов Т.Г., Коровин Б.Ф. Биологическая химия. - Москва: Медицина. 1990. -543 с
2. Противоопухолевая химиотерапия. Справочник под ред. Н.И. Переводчиковой. - Москва: Медицина, 1996. -222 с.
3. Новый представитель группы бифосфонатов (доклинические исследования). Кудрявцева Г.И., Шарикина Н.И., Кацаруба Т.А. и др.// Онкология. -Т. 6. № 3. - с. 193-198.
4. Пат. № 40714UA, МПК⁷ А 61К31/3275.
5. Суслев Е.И., Подгаевская Т.П. и соавт. Роль ДНК-протеин-Са²⁺-комплексов в канцерогенезе. Методы их определения для ранней диагностики злокачественных опухолей легких // Журн. АМН України.- 1997.-Т.3, № 2-с. 282-290.
6. Суслев Е.И., Подгаевская Т.Н. Новая концепция канцерогенеза и перспективы лечения рака// Укр. биохим. журн. - 2000.- № 4. -с. 566.
7. Чекман И.С., Горчакова Н.А. Магний в медицине. - Кишинев: Штинце, 1992.-С. 101.
8. Пат. № 64427, UA
9. Суслев Е.И., Підгаєвська Т.П. Гістонові і негістонові ядерні білки клітин злоякісних пухлин - основа онкотестування //Журн. АМН України,- 2003. -№ 2. - 210-215.