



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92303 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 31/185
A61K 31/191 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

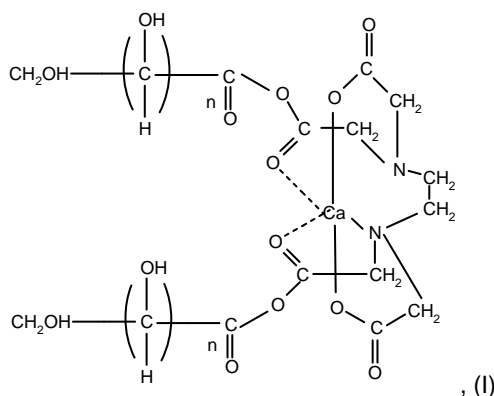
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПЛЕКСНА СІЛЬ Са-АЛЬДОНОВОЇ ТА АМІНОКАРБОНОВОЇ КИСЛОТ, ЩО ВІЯВЛЯЄ ПРОТИПУХЛИННУ ДІЮ, ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

1

(21) а201007936
(22) 24.06.2010
(24) 11.10.2010
(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.
(72) СУСЛОВ ЄВГЕНІЙ ІВАНОВИЧ
(73) СУСЛОВ ЄВГЕНІЙ ІВАНОВИЧ
(56) UA 77371 C2, 15.11.2006
US 6 335 023 B1, 01.01.2002
US 5 037 973 A, 06.08.1991
WO 2004/093722 A3, 04.11.2004
JP 2006070028 A, 16.03.2006
(57) 1. Комплексна сіль Са-альдонової та амінокарбонкової кислот, що виявляє протипухлинну дію, формули (I):

2

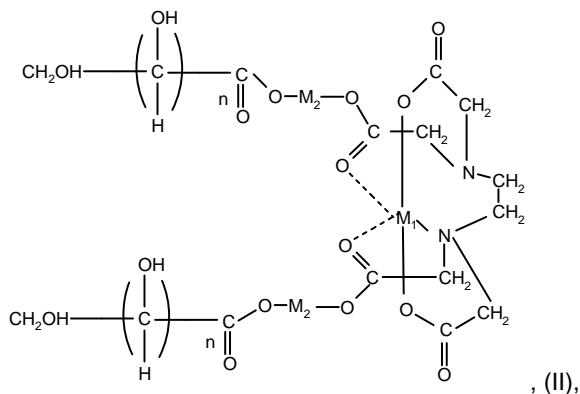


де n = 4.

2. Спосіб одержання комплексної солі Са-альдонової та амінокарбонкової кислот, що виявляє протипухлинну дію, формули (I) за п. 1, який відрізняється тим, що 0,026 Моля альдонату та 0,013 Моля амінокарбонату змішують при нагріванні, pH суміші доводять до 6,2-6,5.

Винахід відноситься до медицини, а саме до онкофармакології, також додатково відноситься до хімії нових комплексних сполук із альдоновою та амінокарбонковою кислотами та до способів їх синтезу, який проявляє протипухлинну активність. У зв'язку із дією цієї хімічної сполуки на генетичний апарат клітини, її було названо «Геносан».

Серед відомих протипухлинних засобів, найбільш близьким до рішення, що заявляється, є комплексна сіль лужноземельних металів («Сіль M₁M₂ альдонової та амінокарбонкової кислот, що виявляє протипухлинну дію», патент UA № 77371) загальної формули :



де M₁, M₂ - лужноземельний метал,
n = 4.

Хімічна формула відомої речовини:
C₂₂H₃₄N₂[M₁][M₂]₂O₂₂.

Однак відомому засобу (формула II) притаманні наступні недоліки:

(13) C2

(11) 92303

(19) UA

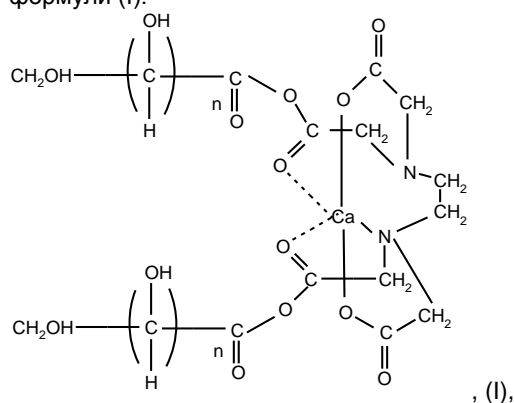
- складність синтезу;
- недостатня протипухлинна активність;
- надлишкова насиченість організму лужноземельним металом.

При ретельному аналізі результатів синтезу хімічної речовини згідно прототипу було встановлено, що лужноземельні метали були використані для синтезу в зв'язку з даними літератури про те що вони, а саме магній, у кількості до одної третини від вмісту кальцію стимулюють протипроліферативну дію останнього, а при більшій концентрації ці метали гальмують антипроліферативну дію кальцію (Чекман І.С. Магній в медицині - Кишенею, 1992, 101 а). У результаті остаточного синтезу згідно прототипу отримали хімічну речовину із значно більшим вмістом лужноземельного металу, а саме магнію. Про це свідчать дані хімічного аналізу солі М1, М2 альдонової і амінокарбонової кислот випробувальної аналітичної лабораторії. (Протокол № 25 від 2006р. Київського національного університету). Було встановлено, що в речовині міститься 6,2% магнію і лише 5,2% кальцію. Застосування відомої комплексної солі лужноземельних металів показало недостатню її ефективність для профілактики та лікування хворих з онкологічних хвороб.

Задачею винаходу є створення активної речовини з більшою протипухлинною дією на злоякісні клітини, яка забезпечує високу ефективність профілактики та лікування онкологічних хвороб на всіх стадіях ракової прогресії.

Задачею винаходу є також створення ефективного способу одержання речовини з високою протипухлинною дією на злоякісні клітини.

Поставлена задача вирішується запропонованою комплексною сіллю Са-альдонової та амінокарбонової кислот, що виявляє протипухлинну дію, формули (I):



де $n = 4$.

Хімічна формула: $C_{22}H_{34}N_2CaO_{20}$.

Поставлена задача вирішується також запропонованою технологією: способом одержання зазначеної комплексної солі Са-альдонової та амінокарбонової кислот, що виявляє протипухлинну дію, формули (I), наведеною вище, в якому 0,026 Моля альдоната та 0,013 Моля амінокарбонату змішують при нагріванні, рН суміші доводять до 6,2-6,5.

Передумовою для його створення стала концепція Сулова Є.І про металобілковозалежну регуляцію детермінації диференціювання клітин, 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. Для підтримки молекулярної архітектури та стабільності біохімічних мембран особливо важливою є здібність іонів Са наближувати молекули за рахунок сил електростатичного тяжіння. Автором була встановлена необхідна кількість і форма певного лужноземельного металу у певній комплексній солі.

Для одержання активної речовини за формулою (I), яка в силу присутності властивостей його окремих складових може бути засобом для лікування злоякісних пухлин, здійснюють синтез комплексної сполуки.

Синтез здійснювали шляхом змішування при нагріванні розчинів солей альдонової та амінокарбонової кислот. Дослідницьким шляхом встановлено оптимальне молярне співвідношення інгредієнтів у 100 мл розчину, при якому молекула солі амінокарбонової кислоти повністю поєднується з молекулою солі альдонової кислоти, при цьому досягається оптимальний протипухлинний ефект та зникають токсичні прояви розчину. Таке оптимальне співвідношення досягається при наявності у суміші 0,026 моля Са-солі альдонової кислоти та 0,013 моля солі амінокарбонової кислоти. При зростанні молярності Са - солі альдонової кислоти до 0,027 моля і більш відносно молярності солі амінокарбонової кислоти знижується розчинність суміші та протипухлинний ефект. При зростанні молярності солі амінокарбонової кислоти до 0,014 і більш зменшується протипухлинний ефект, виникають прояви токсичності розчину. Дослідним шляхом також встановлено, що максимальний протипухлинний ефект досягається при рН 6,2-6,5. При зменшенні рН до 6,1 і менші, а також зростанні більш 6,6 розчин стає нестабільним, а ефект лікування ненадійним.

Після висушування комплексна сіль, що виділена, має наступний кількісний склад(% мас): С:Н:Н:Са=27:9:12:18. Індивідуальність нової речовини підтверджена спектроскопічно, методами рентгенівського фазового аналізу та інфрачервоної спектроскопії. Склад речовини доведено методом елементного аналізу на основні компоненти.

Приклад реального синтезу, що не обмежує винахід, запропонованої комплексної солі: 50,0 мл 0,026 моля водного розчину Са-глюконата змішують при нагріванні із 50 мл 0,013 моля водного розчину динатрію едетата, рН суміші доводять до 6,5. Отримують комплексну сіль Са-глюконата із динатрієм едетатом.

Розроблена комплексна сполука (винахідником названа як Геносан) формули (I) є засновником нового класу комплексних препаратів з альдоновою та амінокарбоновою кислотами. Вона є комплексоном (лігандом), сіллю Са-альдонової та амінокарбонової кислот. Геносан виявився малотоксичним на живі здорові клітини. Нами була визначена його хімічна формула: $C_{22}H_{34}N_2CaO_{20}$. Встановлено, що це зовсім нова сполука, яка забезпечує протипухлинний (антипроліферативний) ефект на злоякісні клітини в експерименті на культурі клітин недрібноклітинного раку легень шляхом блокування процесу їх проліферації.

Комплексна сіль Геносан за фізичними властивостями є білою дрібнокристалічною речовиною у вигляді порошку солоного смаку, без запаху, добре розчиняється у воді при нагріванні, при довгостроковому збереженні не змінює колір. Складові частини Геносану 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 цитоплазмі клітин; Ca^{+2} входить до структури білків ДНП, зв'язує нуклеотиди ДНК. Здорові клітини не потребують молекулярної корекції. Ракові клітини мають дефіцит Ca^{+2} , обумовлений дисбалансом геному, спрямованого на синтез атипових злоякісних клітин. Розроблений протипухлинний засіб Геносан є донатором Ca^{+2} в ДНП пухлинних клітин шляхом їхніх носіїв - комплексонів, а саме залишків альдонової та амінокарбонової кислот, які сприяють внутрішньоядерній інкорпорації Ca^{+2} , безпосередньо впливаючи на процес гальмування клітинного циклу пухлинних клітин та їхньої проліферації з перепрофілюванням проліферації на апоптоз.

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

Вивчення протипухлинної активності Геносану проводили на культурі пухлинних клітин А-549, отриманих з недрібноклітинного раку легень людини. Для порівняння використовували 10 % розчин препарату-прототипу протипухлинного засобу [за патентом UA №77371]. Одночасно в одну частину культури пухлинних клітин вносили засіб Геносан, в другу - засіб-прототип в розведенні від 10^{-1} до 10^{-4} . Результат реєстрували через 24, 48 і 72 години.

Приклад 1

Засіб-прототип вводили в культуру пухлинних клітин недрібноклітинного раку в розведенні від 10^{-1} до 10^{-4} , і на 24, 48 та 72 години, урахували результат дослідження. Максимальне блокування проліферації ракових клітин спостерігалось на 48 години і досягало 90,0 % від загалу клітин культури.

Приклад 2

Запропонований протипухлинний засіб Геносан, 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 Геносаном спостерігалось на 48 години і сягало до 100,0 %

Виразений протипухлинний ефект Геносану був підтверджений також шляхом визначенням Z-потенціалу культури пухлинних клітин методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Метод

здійснювали при застосуванні дози 200 мг/кг. Під впливом засобу в пухлинних клітинах А-549 визначено зменшення від'ємного та збільшення позитивного потенціалу відносно контролю.

Протипухлинна дія розробленого засобу була перевірена в експерименті на 100 мишах лінії С57BL 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 прототипу і Геносан в дозах 200 мг/кг ваги тіла тварини, який вводився внутрішньочеревно.

Приклад 3

При лікуванні мишей препаратом згідно прототипу у дозі 200 мг/кг ваги тіла, який вводився 10 разів на протязі 21 доби з перервою на добу після кожного введення засобу, спостерігалось зменшення розмірів первинної пухлини в середньому на 64,0% в порівнянні з контролем - нелікованими мишами.

Приклад 4

При лікуванні мишей Геносаном в дозі 200 мг/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 95,0 % в порівнянні з контролем - нелікованими мишами.

Приклад 5

При лікуванні мишей препаратом згідно з прототипом у дозі 200 мг/кг ваги тіла, який вводили 10 разів протягом 21 доби з перервою на добу після кожного введення засобу. Апоптичний індекс дорівнював 16,5 %.

Приклад 6

При лікуванні мишей препаратом Геносан у дозі 200 мг/кг ваги тіла, який вводили 10 разів протягом 21 доби з перервою на добу після кожного введення засобу. Апоптичний індекс дорівнював 35,5 %.

При аналітичному порівнянні антипроліферативних (протипухлинних) можливостей запропонованого та засобу-прототипу встановлено: у Геносану антипроліферативна дія відносно ракових клітин на 10,0 % ефективніша. Дія нового запропонованого препарату ще більш значна на зменшення розмірів первинної пухлини і при цьому зменшення розмірів останньої після дії Геносану відносно прототипу досягає 31,0 %, що пов'язано із зростанням активності апоптозу у два рази.

Таким чином, створена і забезпечено синтез нової активної речовини з оптимально можливою протипухлинною ефективністю, усунена надлишкова насиченість організму пацієнта лужноземельним металом. У зв'язку з спрощенням процедури синтезу препарату зменшена його собівартість. Це свідчить про велику перспективу розробленого протипухлинного засобу особливо для лікування недрібноклітинного раку легень людини, для терапії якого до теперішнього часу немає надійних хіміотерапевтичних препаратів.

