



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94504 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 36/605 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ ОКСИРЕЗВЕРАТРОЛУ ЯК ПРОТИПУХЛИННОГО ЗАСОБУ

1

2

(21) а200909558

(22) 18.09.2009

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл. № 9, 2011 р.

(72) СОЛЯНИК ГАЛИНА ІВАНІВНА, СЛАСТЯ ЄВ-
ГЕН АНАТОЛІЙОВИЧ, ФЕДОРЧУК ОЛЕКСАНДР
ГРИГОРОВИЧ, ПЯСКОВСЬКА ОЛЬГА МИКОЛАЇВ-
НА, ДАСЮКЕВИЧ ОЛЬГА ЙОСИПІВНА, ГОРБИК
ГРИГОРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, КОЛЕСНИК ДЕНИС
ЛЕОНІДОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕ-
ЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇ-
НИ

(56) DE 10230961 A1, 12.02.2004

US 6 414 038 B2, 02.07.2002

US 5 747 536 A, 05.05.1998

Горбик Г.В., Федорчук О.Г., Соляник Г.І. ДОСЛІ-
ДЖЕННЯ ВПЛИВУ ОКСИРЕЗВЕРАТРОЛУ НА

РІСТ І МЕТАСТАЗУВАННЯ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ
ЛЬЮЇС LLC //Тези VIII конференції молодих онко-
логів з міжнародною участю «Сучасні проблеми
експериментальної та клінічної онкології». - К.: ДІА,
2007

Горбик Г.В., Федорчук О.Г., Соляник Г.І., Сластья
Є. ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ПРОТИПУХЛИН-
НОЇ ДІЇ ОКСИРЕЗВЕРАТРОНРОЛУ ПО ВІДНО-
ШЕННЮ ДО СОЛІДНОЇ ТА АСЦИТНОЇ ФОРМ КА-
РЦИНОМИ ЕРЛІХА У МИШЕЙ// Тези IX
Міжнародної конференції молодих онкологів «Су-
часні проблеми експериментальної та клінічної
онкології». - К.: ДІА, 2008

(57) Спосіб застосування оксирезвератролу як
протираковинного засобу на основі поліфенольних
сполук рослинного походження класу стилібенів,
який **відрізняється** тим, що водний розчин окси-
резвератролу застосовують метромомно перора-
льно в нецитотоксичних дозах.

Заявка належить до галузі медицини, а саме -
фармакології та онкології, і може бути використана
для виробництва протираковинних та антиметаста-
тичних лікарських засобів.

Низька специфічність фармакологічної дії про-
тираковинних препаратів та висока їх токсичність
відносно нормальних органів та тканин організму
гостро ставить питання щодо розробки нових ефе-
ктивних протираковинних засобів, спрямованих, в
першу чергу, на пригнічення метастазування як
основної причини загибелі онкологічних хворих.

Рослини є традиційним джерелом фармаколо-
гічно активних агентів, в тому числі і таких, які про-
являють протираковинну активність [1]. Серед за-
собів рослинного походження велику увагу в
останній час привертають стилібени, які належать
до поліфенольних сполук [2,3]. Вважається, що
стилібени виявляють антиоксидантну, протизапаль-
ну, кардіотропну та протираковинну активність [4-
7].

До одних з найбільш відомих у фармакології
стилібенів належать резвератрол та оксирезвера-

трол (ОХУ) [8]. На відміну від резвератролу, про-
тираковинна активність якого широко досліджува-
лась, вивчення фармакологічної активності ОХУ
було незначним, а спектр досліджень обмежував-
ся патологіями, не пов'язаними з онкологічним
процесом [9,10]. Між тим, в порівнянні з резверат-
ролом, ОХУ характеризується високою розчинніс-
тю у воді, суттєво вищою біодоступністю та мен-
шою цитотоксичністю щодо нормальних тканин.

Найбільш близьким аналогом є поліфенольна
сполука рослинного походження з класу стилібенів
резвератрол, який здатен суттєво пригнічувати
ріст та метастазування злоякісних новоутворень в
порівнянні з багатьма іншими стилібенами, проти-
раковинна активність яких досліджувалась [A.
Bishayee. Cancer Prevention and Treatment with
Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials //
Cancer Prevention Research. - 2009. - V.2. - P.409 -
418].

Позитивним у найближчого аналога є те, що
при низькій токсичності щодо нормальних органів

(13) C2

(11) 94504

(19) UA

та тканин він здатен пригнічувати ріст та метастазування деяких злоякісних пухлин.

Недоліком аналогу є нерозчинність у воді та неконтрольовано низька біодоступність, що створює труднощі в дозуванні резвератролу, обумовлює значну варіабельність його протипухлинної дії і, практично, унеможлиблює впровадження в клінічну онкологічну практику.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб застосування оксирезвератролу як протипухлинного засобу шляхом метрономного перорального введення його водного розчину в нецитотоксичних по відношенню до нормальних тканин дозах, що дасть можливість інгібувати ріст та метастазування злоякісних новоутворень.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

ОХУ отримують шляхом екстракції подрібненої деревини маклюри (*Madura pomifera*) та білої шовковиці (*Morus alba*), вміст ОХУ в яких складає 2 % від сухої ваги. Як екстрагент використовують ацетонітрил, який дає найкращі результати. Подрібнену сировину мацерують в екстрагенті при 50 °С протягом 24 годин та відділяють екстрагент. Упарений в вакуумі екстракт наносять на силікагель для колонкової хроматографії та проводять розділення в градієнтній системі, яка складається з полярного розчинника (діетиловий ефір, етилацетат, тетрагідрофуран, етанол, ацетонітрил) та неполярного (гексан, бензол, толуол). Найкращі результати дає використання системи ацетонітрил-бензол (1:1). Така система розчинників відрізняється від описаних раніше та забезпечує більш високу ефективність розділення та дозволяє отримувати безводний кристалічний ОХУ за рахунок видалення слідів води за допомогою азеотропної відгонки з бензолом при концентруванні.

Контроль чистоти отриманого ОХУ проводять методом вискоєфективної рідинної хроматографії на колонці Nucleosil C18 2*250 мм із зернінним сорбенту 5 мкм у градієнтному режимі елювання в системі вода-ацетонітрил. Пік ОХУ ідентифікують за характерним спектром в ультрафіолетовому діапазоні. Структура виділеного ОХУ підтверджується ЯМР-С13 та МАСС-спектрометрією.

Ефективність протипухлинної та антиметастатичної дії ОХУ досліджувалась:

- на мишах-самцях лінії С57/В16 з перещепленими внутрішньом'язово пухлинними клітинами двох варіантів карциноми легень Льюїса (вихідним варіантом LLC та ангиогенез-незалежним - LLC/R9);

- на білих безпородних мишах з перещепленою асцитною формою карциноми Ерліха;

- на щурах лінії Wistar з перещепленою інтрацеребральною гліомою.

Миші - віком 2- 2,5 міс., вагою 18-23 г. Щури - віком 1-1,5 міс., вагою 95-105 г.

Терапія мишей та щурів з експериментальних груп включає щоденне пероральне введення (метрономне введення) ОХУ в сумарній дозі 0,2 мг/грам ваги тіла тварин в 0,4 мл та 3 мл дистильованої води (для мишей та щурів, відповідно). Контрольні тварини отримують по відповідній схемі дистильовану воду. Кількість введення - 15.

Кожну третю добу росту пухлин LLC та LLC/R9 у кожної миші вимірювали об'єм пухлини. На 5-6 добу після закінчення терапії тварин з LLC та LLC/R9 декапітували під легким ефірним наркозом, видаляли легені та підраховували кількість метастазів (з урахуванням їх розміру).

Для мишей з асцитною формою карциноми Ерліха та для щурів з гліомою щоденно фіксували виживаність тварин.

Протипухлинну дію ОХУ оцінювали за відсотком гальмування росту первинної пухлини та по збільшенню середньої тривалості життя тварин. Антиметастатичну дію ОХУ оцінювали за відсотком гальмування метастазування (як за кількістю метастазів, так і за об'ємом метастатичного ураження).

Антиметастатична активність ОХУ проявляється в значному зменшенні як кількості метастазів, так і об'єму метастатичного ураження легень. Так, у мишей з LLC кількість метастазів зменшується у середньому на 42 %, а об'єм метастатичного ураження легень - на 70 % ($p < 0,05$) в порівнянні з відповідними показниками контрольних тварин.

На відміну від ОХУ, резвератрол в суттєво більших дозах зменшує кількість метастазів в легенях мишей з LLC на 40 % [12].

Високу антиметастатичну активність ОХУ проявляє і щодо експериментальної пухлини LLC/R9, зменшуючи статистично достовірно кількість метастазів на 82 %, а об'єм метастатичного ураження - на 78 %.

Застосування водного розчину ОХУ приводить до інгібування росту первинної пухлини LLC на 37 % ($p < 0,05$).

ОХУ суттєво подовжує тривалість життя тварин з пухлинами. Так, середня тривалість життя мишей з асцитною формою карциноми Ерліха після терапії ОХУ на 27 % вища ($p < 0,01$), ніж тривалість життя мишей контрольної групи.

ОХУ проявляє значну протипухлинну активність щодо агресивних та вкрай резистентних до традиційної хіміотерапії пухлин. До таких пухлин належать гліоми. Введення ОХУ щурам з інтрацеребральною гліомою подовжує тривалість життя тварин більш ніж на 25 % в порівнянні як з контрольними тваринами, так і з тваринами, що отримували протигліомний препарат Темодал в терапевтичній дозі.

На відміну від ОХУ, який проявляє таку антигліомну дію при сумарній дозі 0,28 мг/грам ваги тварин, резвератрол здатен подовжувати тривалість життя щурів з гліомою в сумарних дозах, значно вищих за 2,0 мг/грам [13].

Прикладами конкретного виконання даного способу можуть бути протоколи 4-х доклінічних досліджень.

І. Протипухлинну та антиметастатичну дію ОХУ визначали відносно високометастатичної експериментальної пухлинної моделі LLC. Наступного дня після інюляції пухлинних клітин мишей лінії С57/В1₆ розподіляли на 2 групи - контрольну та експериментальну. Експериментальні тварини отримували щоденно перорально водний розчин ОХУ протягом 15 діб в сумарній дозі 0,2 мг/грам

ваги тварин. Контрольні миші отримували дистильовану воду в тому ж об'ємі та по такій же схемі. На шосту добу після перещеплення пухлин оцінювали протипухлинну та антиметастатичну дію ОХУ.

Застосування ОХУ привело до статистично достовірного пригнічення росту та метастазування

LLC (Табл. 1). ОХУ зменшував як об'єм первинної пухлини на 37 %, так і кількість метастазів в легенях - на 42 %. Найбільш суттєво ОХУ впливав на об'єм метастатичного ураження, інгібуючи його на 70 % ($p < 0,01$).

Таблиця 1

Протипухлинна та антиметастатична дія ОХУ щодо LLC

Групи тварин	Об'єм первинної пухлини (мм ³)	Кількість легеневих метастазів	Об'єм метастазів (мм ³)
Контрольна	606,7±127,9	38,3±7,8	217,8±42,9
ОХУ	379,3±72,3*	21,8±6,4*	65,1±20,4*

Примітка. В цій та подальших таблицях знак * вказує на значущу ($p < 0,05$) відмінність від відповідного показника у контролі.

II. Антиметастатичну активність ОХУ досліджували щодо експериментальної пухлинної моделі LLC/R9. Пухлинні клітини інокулювали мишам лінії C57/B1₆ внутрішньом'язово. На другу добу тварин розподіляли на 2 групи - контрольну та експериментальну. Експериментальні тварини отримували щоденно перорально водний розчин ОХУ протягом 15 діб в сумарній дозі 0,2 мг/грам

ваги тварин. Контрольні миші отримували дистильовану воду в тому ж об'ємі та по такій самій схемі. На шосту добу після перещеплення пухлин оцінювали протипухлинну та антиметастатичну дію ОХУ.

Метронормне пероральне введення водного розчину ОХУ привело до значного пригнічення процесу метастазування (Табл. 2).

Таблиця 2

Антиметастатична дія ОХУ щодо LLC/R9

Групи тварин	Кількість легеневих метастазів	Об'єм метастазів (мм ³)
Контрольна	6,4±2,0	9,8±3,4
ОХУ	1,1±0,4*	2,1±0,7*

Кількість метастазів у тварин експериментальної групи зменшувалась на 82 %, а об'єм метастатичного ураження - на 78 % в порівнянні з відповідними показниками контрольної групи.

III. Протипухлинну дію ОХУ щодо асцитного варіанту карциноми Ерліха визначали, оцінюючи збільшення тривалості життя тварин після терапії. Для індукції злоякісного процесу 10⁶ пухлинних клітин карциноми Ерліха вводили внутрішньочеревно в 0,3 мл фізіологічного розчину на мишу.

ОХУ екстреного розчиняли в дистильованій воді та вводили перорально щоденно протягом 15 діб в сумарній дозі 0,2 мг на грам ваги миші. Фіксували динаміку виживаності мишей на фоні терапії ОХУ.

Основним параметром терапевтичного ефекту протипухлинної дії ОХУ при асцитному варіанті карциноми Ерліха слугував відсоток збільшення середньої тривалості життя мишей.

Встановлено, що середня тривалість життя мишей після терапії ОХУ становить 23,7±2,7 доби, що на 27 % більше ($p < 0,01$), ніж тривалість життя мишей контрольної групи (Фіг. 1).

IV. Протипухлинну дію ОХУ щодо агресивних злоякісних пухлин із низькою чутливістю до дії традиційних протипухлинних препаратів досліджували з використанням експериментальної пухлин-

ної моделі гліоми після перещеплення 10⁶ клітин інтрацеребрально щурам вагою 100 грамів.

Починаючи з другої доби тваринам експериментальної групи зондом вводили щоденно перорально 3 мл водного розчину ОХУ в дозі 0,013 мг/грам на добу. Контрольним тваринам за тією ж схемою вводили дистильовану воду. Досліджували виживаність тварин на фоні терапії ОХУ.

Застосування водного розчину ОХУ обумовило статистично достовірне ($p < 0,01$) подовження тривалості життя щурів з гліомою (Фіг. 2).

Середня тривалість життя щурів контрольної групи становила 16,8±1,5 доби, а у тварин експериментальної групи - 21,3±2,2 доби, що на 26,8 % більше. Середня сумарна доза ОХУ, що обумовила такий протипухлинний ефект, складала 0,28 мг/грам.

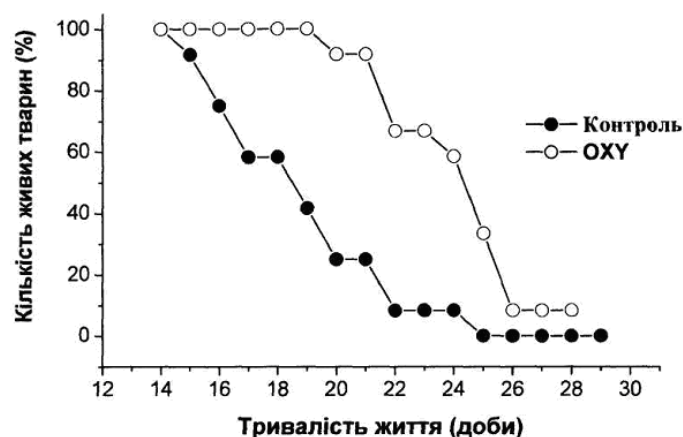
Таким чином, застосування водного розчину ОХУ в не цитотоксичних дозах приводить до значного антиметастатичного та протипухлинного ефекту та суттєво подовжує тривалість життя тварин з пухлинами.

Фіг. 1. Динаміка виживаності мишей з карциномою Ерліха на фоні терапії ОХУ.

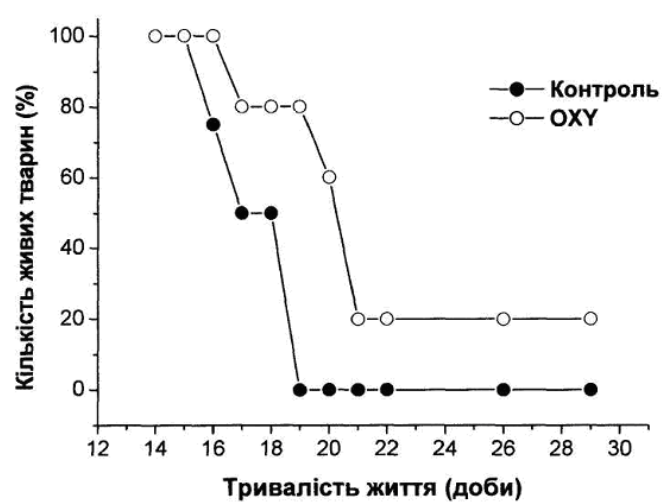
Фіг. 2. Динаміка виживаності щурів з інтрацеребрально перещепленою гліомою на фоні терапії ОХУ.

Джерела інформації

1. Kimura Y. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants // *In Vivo*. - 2005. - V. 19. - P. 37 - 60.
2. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic / K. A. Roupe, C. M. Remsberg, J. A. Yanez, et al. // *Current Clinical Pharmacology*. - 2006. -V. 1. - P.81-101.
3. Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects/ J. C. Jung, E. Lim, Y. Lee, et al. // *Eur. J. Med. Chem.* - 2009. - V. 4. - P. 3166 - 3174.
4. Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: influence of the solvent, radical, and substitution/ Y. J. Shang, Y. P. Qian, X. D. Liu, et al. // *J. Org. Chem.* - 2009. - V. 74. - P. 5025 - 5031.
5. In vitro inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes/ C. C Celimene, D. R. Smith, R. A. Young, et al. // *Phytochemistry*. - 2001. - V. 56.-P. 161-165.
6. Aburjai TA. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of *Rheum palaestinum* // *Phytochemistry*. - 2000. - V. 55. - P. 407 - 410.
7. Kimura Y, Sumiyoshi M, Baba K. Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action. // *Cancer Sci.* - 2008. - V. 99. - P. 2083 - 2096
8. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells / P. Lorenz, S. Roychowdhury, M. Engelmann, et al. // *Nitric Oxide*. -2003.-V. 9. - P. 64-76.
9. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia / S. A. Andrabi, M. G. Spina, P. Lorenz, et al. // *Brain Res.* - 2004. - V. 1017. - P.98-107.
10. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice / T. Chuanasa, J. Phromjai, V. Lipipun, et al. // *Antiviral Res.* - 2008. - V. 80. - P. 62 - 70.
11. A.Bishayee. Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials // *Cancer Prevention Research*. - 2009. - V.2. - P. 409 - 418 (прототип).
12. Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model / S.Busquets, E.Amettler, G.Fuster, et al. // *Cancer Lett.* - 2007.-V. 245. - P. 144-148.
13. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats /S.-H. Tseng, S.-M. Lin, J.-C. Chen, et al. // *Clin.Cancer Res.* - 2004. - V.10.-P. 2190-2202.



Фіг. 1



Фіг. 2