



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) **UA** (11) **26321** (13) **C1**
(51) **A 61 K 35/78**ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕЧОВИНИ, ЯКА МАЄ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ, РЕЧОВИНА, ЯКА ОТРИМАНА ЦИМ СПОСОБОМ, ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇЇ ОСНОВІ

1

(21) 93004208
(22) 22.05.92
(24) 30.08.99
(31) RM 91 A 000372
(32) 29.05.91
(33) IT
(86) /IT92/ 00057 (22.05.92)
(46) 30.08.99. Бюл. № 5
(56) Патент SU № 448649, кл. A 61 K 35/78, 1976.
(72) Д'арріго Клаудіо (IT)
(73) Д'арріго Клаудіо (IT)
(57) 1. Способ получения вещества, обладающего противоопухолевой активностью, включающий экстракцию растительного сырья спиртом, упаривание, извлечения, очистку и сушку, отличающийся тем, что в качестве растительного сырья используют незрелые плоды растений семейства Pittosporaceae, экстракцию спиртом проводят методом мацерации с получением спиртового экстракта, полученный спиртовой экстракт встряхивают с хлороформом с получением хлороформ-спиртовой и водной фаз и после упаривания хлороформ-спиртовой фазы очистку проводят добавлением к концентрированной хлороформ-спиртовой фазе изопропилового спирта с образованием изопропил-спиртовой суспензии, фильтруют изопропил-спиртовую суспензию с получением осадка, сушат и измельчают осадок, солибилизируют его в смеси этиловый спирт: вода 4:1 с образованием раствора, очищают раствор активированным углем с последующей элюцией целевого продукта смесью этиловый спирт : вода 4:1 с получением прозрачного раствора, добавляют изопропиловый спирт к концентрированному раствору с получением изопропиловой суспензии, ее сушат и измельчают с получением порошка.

2

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанным спиртом на стадии мацерации является этанол.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что объемное отношение указанного спирта и указанных плодов растений семейства Pittosporaceae составляет от 1:10 до 10:1.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что мацерацию проводят в течение времени экстрагирования от 5 мин до 3 мес.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что мацерацию проводят при температуре от 5 до 100°C.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный спирт на стадии мацерации является этанолом, и указанный этанольный экстракт встряхивают с хлороформом с получением хлороформ-спиртовой фазы зеленого цвета и водной фазы красно-бордового цвета, причем указанное противоопухолевое вещество находится в указанной водной фазе.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанную водную фазу концентрируют упариванием в колбе на роторном испарителе, а указанную остаточную часть указанного осадка упаривают досуха с получением светло-розового порошка, тогда как прозрачную надосадочную часть упаривают с получением аморфного красного вещества.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанный светло-розовый порошок и указанное аморфное красное вещество кристаллизуют в виде красного порошка после суспендирования в метиловом спирте и изопропиловом спирте.

(19) **UA** (11) **26321** (13) **C1**

9. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанную водную фазу концентрируют в колбе для упаривания и указанную остаточную часть указанного обильного хлопьевидного осадка, суспендированного в изопропиловом спирте, сушат с образованием светло-розового порошка.

10. Противоопухолевое вещество, полученное экстракцией растительного сырья спиртом, упариванием экстракта и очисткой, отличающееся тем, что оно представляет собой вещество, полученное из плодов семейства Pittosporaceae очисткой спиртового экстракта хлороформом, упариванием хлороформспиртовой фазы, обработкой ее изопропиловым спиртом, очистки активированным углем и перекристаллизации из изопропилового спирта и представляющее собой водорастворимое вещество эмпирической формулы $C_{10}H_{10}O_4$ с температурой плавления 205–255 °C и имеющее времена удерживания, соответствующие величинам (в минутах) 1,131 и 1,551 при проведении анализа с использованием хроматографа Перкин-Элмер 250 с колонной 125 мм x 4 мм с подвижной фазой, состоящей из метанола при определении при длине волны 217 нм.

11. Противоопухолевое вещество по п.10, отличающееся тем, что его выбирают из группы, состоящей из соли, соединения, комплекса и их комбинации.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая противоопухолевое вещество и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, отличающаяся тем, что противоопухолевым веществом является вещество, полученное способом по п.1.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она представлена в форме водного раствора для парентерального введения.

14. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она представлена в форме капсул для перорального введения.

15. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она представлена в форме суппозиториев для ректального введения.

16. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что

она представлена в форме овулей для вагинального введения.

17. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она представлена в форме мази, бальзама, крема или геля.

18. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что она изготовлена в ампулах, причем каждая ампула содержит 0,5–2,5 г указанного противоопухолевого вещества.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, отличающаяся тем, что каждая ампула содержит 1,2–1,7 г указанного противоопухолевого вещества.

20. Фармацевтическая композиция по п.14, отличающаяся тем, что она получена в форме капсул, и каждая капсула содержит 0,1–2,0 г указанного противоопухолевого вещества.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, отличающаяся тем, что каждая капсула содержит 0,8–1,2 г указанного противоопухолевого вещества.

22. Фармацевтическая композиция по п.15, отличающаяся тем, что она получена в форме суппозиториев для ректального введения, и каждый суппозиторий содержит 0,2–2,5 г указанного противоопухолевого вещества.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, отличающаяся тем, что каждый суппозиторий содержит 0,3–1,0 г указанного противоопухолевого вещества.

24. Фармацевтическая композиция по п.16, отличающаяся тем, что она получена в форме вагинальных овулей для введения во влагалище, каждый из которых содержит 0,1–2,5 г указанного противоопухолевого вещества.

25. Фармацевтическая композиция по п.24, отличающаяся тем, что каждый овуль содержит 0,5–2,5 г указанного противоопухолевого вещества.

26. Фармацевтическая композиция по п.17, отличающаяся тем, что она получена в форме мази, бальзама, крема или геля с наполнителем для наружного применения, каждый из которых содержит 0,5–12% указанного противоопухолевого вещества.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, отличающаяся тем, что указанный наполнитель для наружного применения содержит 3–7% указанного противоопухолевого вещества.

Изобретение относится к веществам и композициям, обладающим противоопухолевой активностью и экстрагированным из растений семейства Pittosporaceae; а также к фармацевтическим препаратам, изготовленным на основе, по крайней мере, одного из указанных веществ и композиций; и к способам экстракции указанных веществ, и, соответственно, к способам изготовления из этих веществ лекарственных препаратов.

Известно, что одним из многообещающих направлений исследований, которое, по крайней мере, с теоретической точки зрения, представляет собой достаточно простое средство, облегчающее поиски способов борьбы с опухолевыми заболеваниями, является противоопухолевая химиотерапия. Антипролиферативные средства, которые были выделены до настоящего времени, происходят из широкого спектра источников, и обладают гетерогенными химическими свойствами. Среди этих антипролиферативных средств имеются также некоторые вещества, экстрагированные из растений, например, такие, как колхицин и винкалейкобластин, причем, первый из них был экстрагирован из *Colchicum Autumnale*, а другой – из *Vinca Rosea*. Хотя указанные антипролиферативные агенты обладают более или менее специфической противоопухолевой активностью, однако, их селективность по отношению к дегенерированным клеткам обычно очень низка. Опасность их возможного вмешательства в метаболизм здоровых клеток является главным препятствием для более широкого их использования.

Настоящее изобретение позволяет преодолеть вышеуказанные ограничения путем использования химиотерапевтических противоопухолевых агентов на основе активных начал растительного происхождения, которые обладают высокоизбирательной противоопухолевой активностью и, по сравнению с другими противоопухолевыми лекарственными средствами, гораздо более низкой токсичностью.

Основным предметом настоящего изобретения является способ получения веществ и/или композиций, обладающих противоопухолевой активностью, отличающийся тем, что части и/или продукты растений, происходящих от семейства Pittosporaceae (в любой стадии их развития или зрелости), подвергают, в основном, следующим операциям:

а) экстрагированию компонентов путем мацерации в органическом растворителе;

б) необязательному размещению или встряхиванию раствора, содержащего экстракт, с другим растворителем, который, по крайней мере, частично смешивается с первым растворителем, в целях распределения компонентов экстракта по образовавшимся фазам;

с) необязательной обработке каждой фазы независимо друг от друга с использованием, по крайней мере, еще одной органической жидкости, обладающей свойствами растворителя, по крайней мере, для одного из компонентов экстракта, с последующим фильтрованием любой образующейся суспензии, сбором твердой фазы, и ее последовательной очисткой;

д) необязательному разделению компонентов, находящихся в каждой жидкой фазе;

е) сбору выделенных компонентов, обладающих противоопухолевой активностью, и компонентов, не обладающих противоопухолевой активностью.

Экстракты могут быть осушены и очищены перед каждой последующей стадией данного способа.

Растения семейства Pittosporaceae являются предпочтительно растениями вида *Pittosporum*. Указанные растения могут быть выбраны, например, из группы, включающей в себя *Pittosporum undulatum*, *Pittosporum coriaceum*, *Pittosporum vidicolor*, *Pittosporum rhombopholium*, *Pittosporum uegenoides*, *Pittosporum crossifolium* и *Pittosporum Tobira* и их комбинации.

Растворителем может быть спирт. Хорошие результаты были получены с использованием этилового спирта.

Объемное отношение между органическими растворителем и обработанными частями растений составляет предпочтительно от 1:10 до 10:1.

Время обработки предпочтительно составляет от 5 мин до 3 мес. Температуры обработки могут варьироваться предпочтительно от 5 до 100°C.

Выделение компонентов из экстракта может быть осуществлено предпочтительно с использованием хроматографической техники. Хорошие результаты были получены с использованием хроматографии на колонке с силикагелем или на ЖХВР-препаративной колонке.

Экстракция может быть осуществлена с использованием этанола, и сбора компонентов, время удерживания которых при ЖХВР составляет около 1,157; 1,545; 1,883; 2,051; 2,273; 2,572 и 2,743.

[Следует отметить, что аналитические тесты при ЖХВР, как в данных случаях,

так и в последующих случаях, проводили с использованием хроматографа Perkin-Elmer серий 250 с колонкой RP 18 (125 мм x 4 мм), где подвижная фаза состояла из метанола и H₂O (80:20), а длина волны составляла 210 нм].

После экстрагирования этанолом, полученный таким образом раствор может быть смещен путем встряхивания с хлороформом с образованием двух фаз, фазы спирта-хлороформа интенсивной зеленой окраски и водной фазы оранжево-желтого цвета. В этом случае, компоненты, обладающие противоопухолевой активностью, обнаруживались в фазе спирта-хлороформа. Сбор компонентов, обладающих противоопухолевой активностью, осуществляли хроматографически после того, как их осушали от фазы спирта-хлороформа, а сорбат ресольбилизировали в метаноле. При осуществлении хроматографии на метаноловом растворе с использованием ЖХВР-техники, собирали те компоненты, времена удерживания которых составляли около 1,969; 2,296 и 2,756.

Хлороформ-спиртовой раствор может быть концентрирован путем выпаривания, после чего может быть добавлен изопропиловый спирт для образования суспензии, которую затем фильтруют, а твердую фазу подвергают горячей сушке и измельчению в ступе. После ресольбилизации в смеси воды и этанола, продукт может быть очищен на хроматографической колонке с активированным углем. Две твердые фракции (неочищенная и очищенная), растворенные в смеси этанола и воды или в метаноле, могут быть подвергнуты хроматографии с использованием ЖХВР-техники со сбором компонентов, времена удерживания которых составляют около 1,157; 1,545 и 1,264.

Настоящее изобретение также относится к веществам и композициям, полученным *per se*, и отличающимся тем, что они могут быть получены с использованием способа, описанного выше.

Предметом настоящего изобретения являются также вещества и композиции, обладающие противоопухолевой активностью, и отличающиеся тем, что они могут быть получены способом, описанным выше.

Эти вещества и композиции, обладающие противоопухолевой активностью, могут быть обработаны в целях получения солей, соединений или комплексов, чтобы сделать их водорастворимыми.

Кроме того, настоящее изобретение включает в себя фармацевтические пре-

параты, отличающиеся тем, что они содержат, в качестве, по крайней мере, одного из своих активных начал вещество или композицию, выбранных из группы веществ или композиций, которые обладают противоопухолевой активностью и которые могут быть получены описанным выше способом, или их комбинаций.

Фармацевтический препарат может быть выбран из группы, включающей в себя водный раствор для парентерального введения, капсулы для перорального введения, суппозитории для ректального введения, овулы для введения во влагалище, а также мази, бальзамы, кремы и гели.

Водный раствор может быть изготовлен в ампулах. Каждая ампула содержит 0,1–2,5 г активного компонента, предпочтительно 0,1–1,5 г, а более предпочтительно 0,2–1,0 г активного компонента.

В случае фармацевтического препарата, изготовленного в виде капсул, каждая капсула содержит 0,2–2,0 г активного компонента, а предпочтительно 0,8–1,2 г активного компонента.

В случае фармацевтического препарата, изготовленного в виде суппозитория для ректального использования, каждый суппозиторий содержит 0,2–2,5 г, а предпочтительно 0,3–1,0 г или 1,2–1,7 г активного ингредиента.

В случае, если фармацевтический препарат изготовлен в виде вагинальных овулей, то каждый из этих овулей содержит 0,1–2,5 г, предпочтительно 0,5–2,5 г, а более предпочтительно 0,3–1,7 г активного ингредиента.

В случае, если фармацевтический препарат изготовлен в виде мазей, бальзама, крема или геля, то данный наполнитель содержит 0,5–12%, а предпочтительно 3–7% активного ингредиента.

Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию компонентов, которые могут быть получены с помощью описанного выше способа экстракции, выделения и сбора, либо отдельно, либо в комбинации, в целях получения лекарственных средств для лечения различных заболеваний, не относящихся к злокачественным опухолям.

Таким образом, выше было приведено описание настоящего изобретения в общих чертах. Для более ясного понимания основных особенностей, преимуществ и методов осуществления настоящего изобретения, ниже, с помощью конкретных примеров, приводится более подробное его описание.

Пример 1. Способ экстракции и очистки активных компонентов.

1 кг неспелых плодов *Pittosporum Tobira* тонко измельчали и настаивали при комнатной температуре с некоторым количеством этилового спирта (95°), достаточного для покрытия измельченных плодов (приблизительно 1:1, по объему). Полученную смесь оставляли для замачивания, по крайней мере, на 30 дней, а затем фильтровали. 1000 мл спиртового экстракта, полученного как описано выше, вливали вместе с таким же объемом хлороформа в разделительную воронку. После размешивания в течение некоторого количества времени начало происходить разделение фаз, которое завершилось через 24 ч после начала размешивания; при этом в нижней части разделительной воронки отделялся раствор спирта-хлороформа интенсивной зеленой окраски; а в верхней части воронки – водный раствор желто-оранжевой окраски (оранжевая растворимая фракция = ОРФ), образовавшийся при экстракции водорастворимых веществ из воды, изначально присутствовавшей в плодах. ОРФ присутствует приблизительно в количестве 20% (по объему) и образуется почти исключительно из компонентов, которые имеют RT (время удерживания) при ЖХВР, равное 1,141 (площадь 3,45%); 1,440 (площадь 24,46%) и 1,593 (площадь 61,93%). ОРФ-вещество, составляющее приблизительно 73% по массе сухого вещества от полного спиртового экстракта, образуется в виде желто-белого порошка, который не только не является полностью неактивным в отношении экспериментальных опухолей, но даже способствует их более быстрому развитию. Поэтому указанное вещество удаляли. Оставшийся хлороформ-спиртовой раствор выпаривали при 30°C в роторном испарителе и осушали. Полученное аморфное вещество темно-зеленого цвета, которое после ресольubilизации в метаноле (1 мг/мл), анализировали с помощью ЖХВР, показало заметную концентрацию активных пиков со временами удерживания в интервале от 1,969 (площадь 7,83%) до 2,296 (площадь 40,12%) и до 2,756 (площадь 1,47%).

Пример 2. Способ очистки активных компонентов.

Хлороформ-спиртовой раствор, оставшийся после операций, проведенных в примере 1 (состоящий из полного спиртового экстракта минус ОРФ) выпаривали при 45°C в колбе, помещенной в роторный испаритель, до тех пор, пока не был

получен концентрированный раствор объемом примерно 30 мл (приблизительно 1/35 от полного исходного спиртового экстракта). На этой стадии, в колбу добавляли изопропиловый спирт в количестве, равном 30% от полного исходного спиртового экстракта (300 мл). В результате этого, получали суспензию в виде части веществ, содержащихся в полном спиртовом экстракте минус ОРФ, которая растворялась в этаноле и в метаноле, но уже не растворялась в изопропанолe.

Полученную таким образом суспензию фильтровали на быстро фильтровальной бумаге. Осадок, осажденный на бумаге, подвергали горячей сушке при 45°C. После сушки этот осадок тонко измельчали в фарфоровой ступке. Таким образом получали приблизительно 1500 мг желто-зеленоватого порошка. Этот порошок (который в дальнейшем будет обозначаться как CIDI), солюбилизированный в метаноле и проанализированный обычным ЖХВР-методом, показал RT (время удерживания) 1,157 (площадь 78,83%); 1,545 (площадь 16,25%) и 2,264 (площадь 4,91%).

Альтернативно, с использованием LC-NH₂-5 мкм – сферической колонки Supelcosil, подвижной фазы CH₃CN-H₂O (3:1) со скоростью потока 1,5 мл/м и УФ-детектора при 217 нм, получали следующие значения RT : 1,889 (концентрация 53,88); 2,640 (20,89); 3,145 (4,61); 3,420 (5,08); 3,942 (6,16); 4,722 (4,53); 5,255 (3,253); 6,287 (0,90) и 6,982 (0,66).

На RP 18-10 мкм – нерегулируемой колонке Chromopack – Lichrosorb (с теми же самыми элюентом, потоком и маркером), были получены следующие пики: 1,460 (концентрация 65,98); 1,965 (20,87); 2,535 (1,86); 2,704 (2,05); 3,097 (1,74); 3,395 (3,38); 4,324 (0,85); 4,609 (0,93); 9,597 (0,88); 10,017 (1,42).

Вещество CIDI дает остаток в 3,17% после кальцинирования. Элементный анализ (не принимая в расчет остаток) для минимальной эмпирической формулы близкой к C₁₅H₂₅O₉ показал, мас. %: C 54, 25; H 7,58; O 38,17 и т.пл. (с разл.) 196–222°C. ИК-спектр (ИК-спектрофотометр Perkin-Elmer Мод. 683) в KBr-среде (концентрация 1 мг/100 мг) показал следующие видимые линии: 3400 см⁻¹ OH-ассоциированное валентное (колебание); 2960 см⁻¹ валентное CH₃ асимметричное; 1720 см⁻¹ валентное C=O; 1610 см⁻¹ валентное C=O COO⁻ асимметричное; 1460 см⁻¹ деформационное CH₃; 1380 см⁻¹ деформационное CH₃ (типичный ОСОСН₃); 1250 см⁻¹

деформационное OH; 1150, 1080 и 1040 см⁻¹ валентное C-O.

УФ-спектр (спектрофотометр УФ-виз. Perkin-Elmer мод. Лямбда 5):

1) раствор в CH₃OH-H₂O (4:1), концентрация 6·10⁻² мг/мл:

– максимум абсорбции при 202 нм; затем абсорбция быстро снижается вплоть до 260 нм, в диапазоне 260–330 нм она остается постоянной, а затем снова уменьшается;

2) раствор в CH₃CN-H₂O (3:1), концентрация 6·10⁻² мг/мл:

– абсорбция быстро снижается от 200 до 260 нм; остается почти постоянной в диапазоне 260–330 нм, а затем снова уменьшается.

Порошок CIDI нерастворим в ацетоне, бензоле, хлороформе, этиловом эфире, петролейном эфире, этиловом спирте, изопропиловом спирте, и растворим в метаноле и воде.

Водный раствор CIDI имеет pH 6,5.

ID₅₀ для мышей CrI: CD-1 (ICR) BR составляет 1274,9 мг/кг (опорные пределы 1041,2–1561,0 мг/кг) при пероральном введении и 25 мг/кг (опорные пределы 23,0–27,2 мг/кг) при внутрибрюшинном введении.

П р и м е р 3. Способ очистки активных компонентов, вариант.

10 г порошка CIDI, полученного в соответствии с описанием в примерах 1 и 2, солюбилизировали в 1000 мл раствора этилового спирта и воды (4:1), в результате чего получали 1%-ный раствор зеленого цвета. Для эксперимента использовали хроматографическую колонку диаметром 4,5 см, снабженную пористым сепаратором. На этот сепаратор клали слой хлопчато-бумажной ваты, а затем слой песка высотой примерно 3 см. После этого на него выливали суспензию, содержащую 35 г активированного угля в этаноле. После того как активированный уголь был плотно упакован, через хроматографическую колонку пропускали раствор порошка CIDI (солюбилизированного, как описано выше). Затем, после того, как весь CIDI-раствор был пропущен через хроматографическую колонку, эту колонку промывали, пропуская через нее 1000 мл лишь одного растворителя (этиловый спирт – вода, 4:1).

В результате этого получали прозрачный бесцветный раствор, который затем концентрировали до его максимального предела в роторном испарителе при 45°C.

Затем остаток кристаллизовали путем добавления изопропилового спирта. Пос-

ле сушки в роторном испарителе и измельчения в ступке, получали белый порошок, который затем был идентифицирован как чистый CIDI (60 мас.%).

Чистый порошок CIDI, солюбилизированный в метаноле и проанализированный с помощью ЖХВР, обнаружил два главных пика с RT, равными 1,131 (площадь 87,54%) и 1,551 (площадь 6,16%).

Напротив, ЖХВР с УФ-детектором при 217 нм, подвижной фазой CH₃CN-H₂O (3:1), скоростью потока 1,5 мл/м, показала следующие RT (главные пики):

1) на LC-NH₂-5 мкм – сферической колонке Supercosil: 1,885 (конц. 19,60); 16,259 (конц. 67,51);

2) на RP18-10 мкм – иррегулярной колонке Chrompack-Lichrosorb 1,617 (конц. 87,74); 1,985 (3,69) и 2,134 (2,20).

Чистый CIDI представляет собой белое водорастворимое твердое вещество, которое после кальцинирования имеет остаток 3,05%.

Элементный анализ (без учета остатка) дал следующие результаты, мас.%. С 48,82; Н 7,06; О 44,12 (для минимальной эмпирической формулы, близкой к C₆H₁₀O₄), и т.пл. (с разлж.) 205–255°C.

ИК-спектр был практически идентичен вышеописанному спектру продукта CIDI.

УФ-спектр (спектрофотометр УФ-виз. Perkin-Elmer мод. Лямбда 5):

1) раствор в CH₃-OH-H₂O (4:1), концентрация 6·10⁻² мг/мл:

– максимум абсорбции при 203 нм; затем абсорбция быстро снижается, выше 260 нм абсорбция практически не наблюдалась;

2) раствор в CH₃CN-H₂O (3:1), концентрация 6·10⁻² мг/мл:

– абсорбция быстро снижается в диапазоне от 200 до 260 нм, а затем остается постоянной на уровне, близком к нулю.

Растворимость чистого CIDI является такой же, как и растворимость CIDI, и pH водного раствора также имеет аналогичное значение.

LD₅₀ чистого CIDI при внутрибрюшинном введении мышам CrI: CD-1 (ICR) BR составляет 20,2 мг/кг (опорные пределы 17,8–22,0 мг/кг).

ЯМР-спектры CIDI и чистого CIDI:

ЯМР-спектроскопию осуществляли на приборе Bruker AC200 при 200 МГц (протон) и 50 МГц (углерод). Образцы получали путем растворения 90 мг продукта в 0,6 мл DMSO-d₆ с добавлением 10 мг натриевой соли 3-триметилсилил пропан-

сульфоновой кислоты (DSS) в качестве внутреннего стандарта.

Для ^1H -спектра аккумулялировали 1000 переходов с использованием импульса 30° ; FID подвергали гауссовой мультипликации для увеличения разрешения. Обмен мобильных протонов проводили путем добавления $\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOH}$.

Для ^{13}C -спектра аккумулялировали 6200 переходов C1D1 и 14900 переходов чистого C1D1 с использованием импульса 90° с этеронуклеарным расщеплением в CPD.

В результате оценки ^1H -спектров было установлено присутствие нескольких мобильных протонов в пределах 3–5 ppm. Наблюдалось присутствие ряда протонов алкильного типа, причем при более низких диапазонах наблюдается снижение алкиловых протонов. Возможно присутствует виниловый протон и отсутствуют ароматические протоны. Что касается присутствия большого количества более или менее замещенного алкильного углерода, то ^{13}C -спектры подтверждают вышеуказанные данные. Отмечалось наличие некоторых пиков в виниловом диапазоне и нескольких пиков в карбонильном диапазоне, причем карбонильные группы принадлежали к кислотному или сложноэфирному типу.

Оценка спектров не обнаружила различия между этими двумя смесями. Возможно имеется различие в процентном соотношении различных компонентов.

Пример 4. Способ хроматографического разделения активных компонентов.

Хлороформ-спиртовой раствор, полученный в соответствии с описанием в примере 1, осушали на ротаторном испарителе и ресольбилизировали в небольшом количестве метанола (100 мл). Используя указанный раствор, осуществляли хроматографическое разделение как на колонке с силикагелем, так и (с особой тщательностью) на ЖХВР-препаративной колонке. Как было указано выше, полученные таким образом чистые фракции соответствовали пикам 1,157; 1,545; 1,883; 2,051; 2,273; 2,572 и 2,743.

Пример 5. Испытания для иллюстрации противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo*.

Соединения и/или композиции, полученные в соответствии с описанием в вышеприведенных примерах и являющиеся либо растворимыми, либо солюбилизированными в воде с использованием поверхностно-активных веществ (Полисорбато 80 или Geropon), показали значительную противоопухолевую активность наряду с приемлемыми уровнями токсичности и отсутствием иммуносупрессорной активности. Заметная избирательная противоопухолевая активность в отношении опухолевых клеток была продемонстрирована на гистологическом уровне как *in vitro*, так и *in vivo*, очевидными изменениями опухолевых клеток, которые выражаются в увеличении объема, конглоутации, выворачивании и разрушении клеточной мембраны, чрезмерной вакуолизации и опустошении цитоплазмы, при этом наблюдается гипохромия ядерного хроматина и чрезмерная бледность ядер. Высокая избирательность этих веществ подтверждается тем фактом, что все перечисленные выше поражения опухолевых клеток полностью отсутствуют в нормальных клетках, подвергнутых аналогичной обработке.

In vivo – испытания противоопухолевой активности вышеуказанных веществ проводили на мышах (Swiss, Sa 180), используя дозу от 2 до 25 мг/кг (лет) активного вещества, которое вводили внутривентриально в течение 8 дней непрерывно, начиная со следующего дня после трансплантации. По сравнению с контрольными животными, для которых средний коэффициент выживания составлял 25,8 дней, у 90% обработанных животных наблюдалось отторжение опухоли, и на этом основании, эти особи рассматривались как явно выжившие.

Для терапевтического применения вещества настоящего изобретения, а также их соли, соединения или комплексы предпочтительно использовать в виде водных растворов для внутримышечных, внутривенных или внутримышечных инъекций.

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор М.Самборська

Замовлення 501

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

