



(19) KG (11) 712 (13) C1 (46) 30.10.2004

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)⁷ C08B 37/06; A61K 31/70
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20030061.1

(22) 09.06.2003

(46) 30.10.2004, Бюл. №10

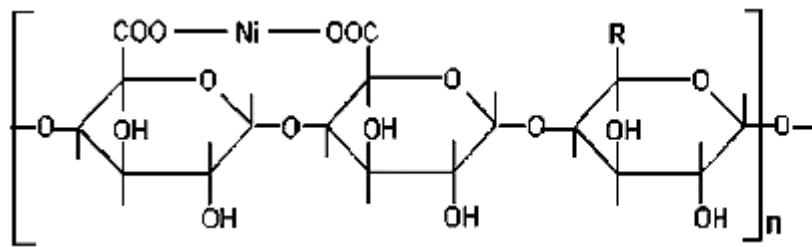
(71)(73) Институт химии и химической технологии НАН Кыргызской Республики (KG)

(72) Аймухамедова М.Б., Худайбергенова Э.М. (KG), Закумбаева Г.Д., Ушбаева Г.Г., Токтабаева Ф.М., Кабиева А. (KZ), Мокеева Б.Б., Акунова Д.А. (KG)

(56) А.с. SU, A, №1047130, кл. C07C 97/16; A61K 31/13, 1982

(54) Полигалактурониды Ni(II), обладающие химиосенсибилизирующими опухоль действием

(57) Изобретение относится к области медицины и химии природных физиологически активных веществ, конкретно - к полигалактуронидам никеля (II), формулы (I):



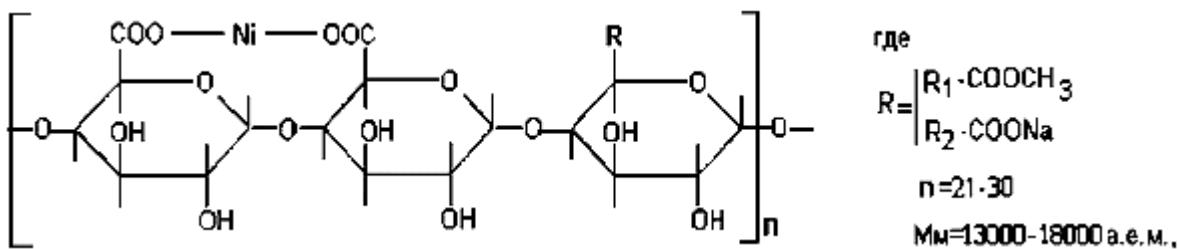
где
R= | R₁-COOCH₃
| R₂-COONa

n=21-30

M_w=13000-18000 а.е.м. (I)

эмпирическая формула [C₁₈H₂₁O₁₈RNi(II)]_n. Задачей изобретения является расширение арсенала природных, нетоксичных физиологически активных веществ пролонгированного действия для применения в качестве модификатора противоопухолевых препаратов и поиск новых соединений, обладающих высокими химиосенсибилизирующими опухоль свойствами. Поставленная задача решается синтезом и использованием соединений формулы (I) - полигалактуронидов никеля (II), обладающих химиосенсибилизирующими опухоль действием в сочетании с 5-ФУ и цис-ДДП - в отношении О. Эрлиха, ЛСП, С-45 и др. Способы получения исходных полигалактуронидов (пектиновых веществ - пектината Ni(II), пектата Ni(II)) и синтезы целевых никель (II) соединений - просты, проходят с высокими выходами как промежуточных, так и конечных целевых веществ. Для синтеза никельпроизводных полигалактуронидов не требуются необычные, малодоступные реактивы, аппараты, растворители и приборы. 2 пр.

Изобретение относится к области медицины и химии природных физиологически активных веществ, конкретно - к полигалактуронидам никеля (II), формулы (I):



Эмпирическая формула $[C_{18}H_{21}O_{18}RNi(II)]_n$.

Заявляемые соединения являются биологически активными, обладают высокой химиосенсибилизирующей опухоль (ХСО) способностью в сочетании с известными противоопухолевыми цитостатиками - 5-ФУ (5-фторурацил), ФТФ (фторафур), цис-диамино-ди-хлорплатиной (II) - цис-ДДП (цис-ДДП) и др. в отношении ЛСП (лимфосаркомы Плисса). О. Эрлиха (Опухоли Эрлиха), С-45 (Саркома-45) и др.

Известен полирамногалактуронат меди (II), обладающий противоопухолевой активностью (А.с. SU, А 1, №1822166, кл. C08B 37/06, 1990). Однако, полирамногалактуронат меди (II) не обладает химиосенсибилизирующей опухоль активностью, не повышает ингибирующее действие фторпиrimидинов -5-ФУ, ФТФ и др.

Также известно водорастворимое производное колхицина, обладающее радиосенсибилизирующим, антимитотическим, противоопухолевым действием (А.с. SU, А, №1047130, кл. C07C 97/61; A61K 31/13, 1982).

Существенным недостатком аналога по назначению является высокая токсичность алкалоидов ряда колхицина и их большой вклад в повышение токсичности противоопухолевых препаратов, сложность, многостадийность, во-первых, получения самого алкалоида из растения - содержание алкалоида в эндосперме и оболочке семян, клубнях осеннего безвременника - *Colchicum autumnale* L и лилейных *Lilaceae* - составляет всего лишь 0.28-0.30 %, редко - в цветах безвременника (*Colchicum*) - 0.8 % по весу сырья; во-вторых, сложность направленного синтеза целевых соединений (гидрохлор производных колхицина), и, наконец, очень высокая стоимость исходного алкалоида и, следовательно, производных, модификаторов противоопухолевых препаратов из него.

Задача изобретения - расширение арсенала природных, нетоксичных физиологически активных веществ пролонгированного действия для применения в качестве модификатора противоопухолевых препаратов и поиск новых соединений, обладающих высокими ХСО свойствами.

Поставленная задача решается синтезом и использованием соединений формулы (I) - полигалактуронидов никеля (II), обладающих ХСО действием в сочетании с 5-ФУ и цис-ДДП - в отношении О. Эрлиха, ЛСП, С-45 и др.

Способ получения новых ХСО полигалактуронидов Ni(II) приведен в примерах 1 и 2.

Пример 1. Способ получения пектината Ni(II): 10 г свекловичного пектина заливают 1000 мл дистиллированной воды, раствор отфильтровывают и обрабатывают 100 мл 5 %-ного раствора $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ в рассчете на безводный $NiCl_2$. Реакционную колбу с осадком пектината Ni(II) помещают в холодильник для уплотнения и стабилизации осадка, затем осадок отфильтровывают, промывают 70 %-ным изопропиловым спиртом до отрицательной реакции на Cl^- -ионы, затем - чистым этанолом. Сушка осадка - воздушная. Выход пектината Ni(II) - 76.5 %.

Пектинат Ni(II) представляет собой порошок болотного цвета, хроматографически однороден, без запаха.

Элементный анализ:

рассчитано, %: C - 38.13; H - 4.02; O - 48.16; Ni - 9.70;

найдено, %: C - 39.00; H - 4.34; O - 47.56; Ni - 8.90.

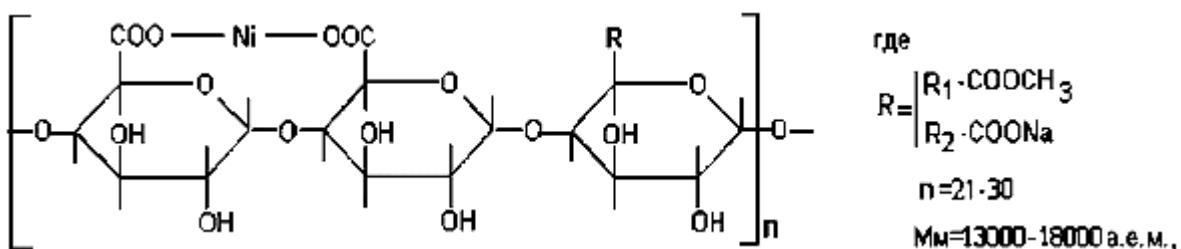
Функциональный анализ: свободных COOH-групп - 7.36 %: -OCH₃ групп - 5.20 %.

В ИК спектрах в области 3500-3000 см⁻¹ проявляются валентные колебания (OH), (H₂O)-групп; 3000-2800 см⁻¹ - ν (CH); уменьшение интенсивности поглощения в области 1730 см⁻¹ обусловлены валентными колебаниями ν(C = O) сложно-эфирной группы



(-C-OCH₃), 1375 см⁻¹-δ(-CH₃) сложно-эфирной группы; в области 1620 см⁻¹ и 1425 см⁻¹ появляются интенсивные полосы ионизированных ν_{as} (COO⁻) и ν_s (COO⁻)-карбоксигрупп; 1335 см⁻¹ - δ (CH)-карбоксигруппы: группа полос в области 1200 и 1000 см⁻¹ относятся к валентным колебаниям ν (C-C); ν (C-O): ν (C-O-C) - пиранозного цикла: 1260 см⁻¹ - ν (C-O-C) - сложно-эфирной группы.

Пектинат Ni(II) - брутто формула -C₁₉H₂₄O₁₈RNi(II) структурная формула:



Способность пектината Ni(II) повышать ингибирующий эффект 5-ФУ, цис-ДДП - изучали в лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК.

Опыты поставлены на белых беспородных крысах массой 100-130 г. и мышах белых, беспородных и линии СВА, массой 20-22 г. Острая токсичность препарата изучена на мышах в дозах 750, 1000 и 1500 мг/кг при однократном введении per os, гибели животных не наблюдалось. Противоопухолевая активность исследована на животных с ЛСП, О. Эрлиха (солидный вариант), полученных из банка штаммов Российского онкологического научного центра РАМН, г. Москва.

Пектинат Ni(II) в дозе 150 мг/кг при внутрижелудочном введении ингибирует рост ЛСП на 50 %. Наиболее эффективный режим применения пектината Ni(II) - комбинация с цитостатиками (цис-ДДП, 5-ФУ) - введение пектината Ni(II) за 2 часа до цитостатиков. Один 5-ФУ ингибирует рост О. Эрлиха на 34.9 %; ЛСП - 44 %. Торможение роста опухолей при комбинации с пектинатом Ni(II) составляет 73.1 и 90.5 %, соответственно. Самостоятельное применение цис-ДДП - ингибирует рост О. Эрлиха на 48.8 %, при комбинации с пектинатом Ni(II) - достигает 59.5 %.

Токсическое действие комбинированной терапии не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются.

Таким образом, в условиях эксперимента пектинат Ni(II) при пероральном применении за 2 часа до введения 5-ФУ цис-ДДП повышает их эффективность и снижает побочное действие - пектинат Ni(II) обладает химиосенсибилизирующей опухоль активностью.

Акт испытания токсичности, противоопухолевой и химиосенсибилизирующей опухоль свойств пектината Ni(II), проведенный в лаборатории химиотерапии опухолей Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК от 12.02.2001 г., за № 1-12-571 - прилагается.

Пример 2. Способ получения пектата-полигалактуроната Ni(II):10 г. свекловичного пектина растворяют в 1000 мл 0.1 н NaOH и оставляют на ночь для омыления, затем щелочной раствор пропускают через колонку с КУ-2 со скоростью 3-4 мл/мин. Фильтрат с

колонками КУ-2-кислый, раствор пектовой кислоты обрабатывают 1 н NaOH до pH~7 и затем - 96 мл 5 %-ного раствора $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в рассчете на безводный NiCl_2 .

Реакционная смесь с осадком пектата - полигалактуроната Ni(II) оставляют в холодильнике для уплотнения и стабилизации осадка. Затем осадок отфильтровывают, отмывают от хлор-ионов дистиллированной водой - в конце чистым пропиловым спиртом, этанолом, высушивают па воздухе.

Полигалактуронат-пектат-Ni(II) представляет собой порошок светло-болотного цвета, без запаха, хроматографически однороден.

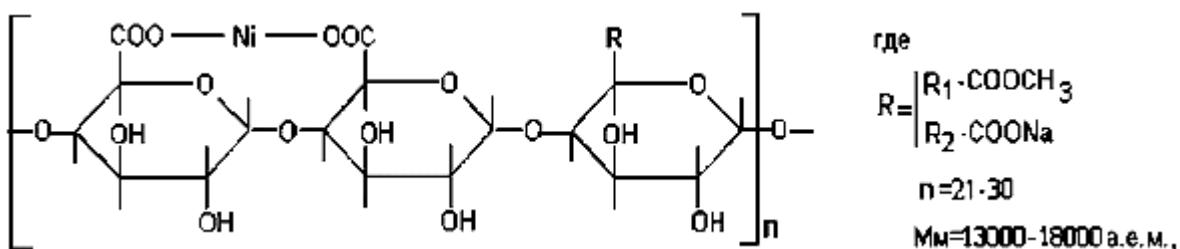
Элементный анализ:

рассчитано, %: C - 35.64; H - 3.47; O - 47.52; Ni-9.57; Na-3.80,
найдено, %: C - 36.50; H - 3.56; O - 47.05; Ni + Na- 15.40.

Функциональный анализ: COOH-групп - 6.62 %; OCH₃-групп - 0.31 %.

В ИК-спектрах в области 1620 cm^{-1} и 1425 cm^{-1} появляются интенсивные полосы $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ и $\nu_s(\text{COO}^-)$; группа полос в области 1200 cm^{-1} и 1000 cm^{-1} относятся к валентным колебаниям $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-O-C})$ пиранозного цикла.

Полигалактуронат - пектат Ni(II), брутто формула $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{Ni}(\text{II})\text{Na}]_n$, структурная формула:



Токсические, противоопухолевые и химиосенсибилизирующие опухоль (ХСО) свойства полигалактуроната - пектата Ni(II) изучали в лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК. Опыты поставлены на белых беспородных крысах массой 100-130 г и мышах, белых, беспородных и линии СВА массой 20-22 г. Противоопухоловую и ХСО активность изучали на опухолевых штаммах крыс - ЛСП, Саркоме-45 и мышей - О. Эрлиха (солидный вариант), полученных из банка штаммов Российского онкологического научного центра РАМН, г. Москва.

Острая токсичность препарата в дозах 750, 1000, 1500 мг/кг, при однократном внутрижелудочном введении гибель животных не наблюдалась.

Противоопухоловая активность полигалактуроната-пектата Ni(II) исследована по методике Мороз Л.В., Сыркин А.В. / Бюллетень информации по терапии опухолей, 1995.- Т. 10.-№2.-С.9-21.

Полигалактуронат Ni(II) обладает умеренной противоопухоловой активностью в отношении ЛСП, С-45; О. Эрлиха: в дозе 150 мг/кг при внутрижелудочном введении ингибирует рост ЛСП, С-45, О. Эрлиха в пределах 39.4-50.0 %.

Наиболее эффективный режим применения полигалактуроната Ni(II) - в комбинации с цитостатиками - введением его за 2 ч до цитостатика.

Один 5-ФУ ингибирует рост О. Эрлиха на 34.9 %, ЛСП - на 44.0 %. Торможение роста указанных опухолей при комбинации с полигалактуронатом - пектатом Ni(II) составляет 85.7; 81.4 %, соответственно.

Самостоятельное применение цис-ДДП - ингибирует рост О. Эрлиха на 48.8 %; при комбинации с полигалактуронатом Ni(II) - торможение роста О. Эрлиха достигает 61.3%.

Токсическое действие комбинированной терапии - не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются. Применение полигалактуроната никеля (II) не ухудшает гематологических показателей у мышей при

терапии циклофосфамидом.

Таким образом, полигалактуронат-пектат-Ni(II) при пероральном применении за 2 ч до введения 5-ФУ; цис-ДДП - повышает их эффективность и понижает побочное действие, полигалактуронат-пектат-Ni(II) обладает химиосенсибилизирующей опухоль активностью.

Акт испытания полигалактуроната-пектат-Ni(II) в Каз.НИИ онкологии и радиологии от 12.09.2000 г., № 1-12-572 - прилагается.

Преимуществом полигалактуронидов RNi(II) является их высокая химиосенсибилизирующая опухоль (ХСО) активность: самостоятельно цис-Pt(II)-ДДП-, 5-ФУ ингибируют рост ЛСП, О. Эрлиха на 34.9; 44.0; 48.8 %. При комбинированном применении дис-ДДП, 5-ФУ с полигалактуронидами RNi(II) торможение роста указанных опухолей достигает 85.7; 81.4; 90.5, соответственно.

В прототипе - хлорпроизводных (I, II) исходного колхицина (III), радиомодифицирующие свойства при LD_{50/30} составляют, соответственно 625; 750; 740 Р; ФИД (фактор изменения дозы) - 0.78; 0.93; 0.95 и выживаемость при 800 Р - 0 %; 22 % и 50 %, соответственно.

Полигалактурониды никеля - нетоксичны: острая токсичность изучена на мышах в дозах 750; 1000; 1500 мг/кг при однократном введении - гибели животных не наблюдалось. Токсическое действие комбинированной терапии цис-ДДП-, 5-ФУ с полигалактуронидами RNi(II) - не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются. Полигалактурониды RNi(II) не ухудшают гематологических показателей при терапии с циклофосфамидом.

В прототипе и исходный алкалоид колхицин (III) и хлоргидраты его производных (I, II) тормозят рост перевиваемых опухолей С-45; О. Эрлиха, при введении в дозах 12 мк/кг; 15 мк/кг и 0.3 мк/кг; соответственно, на 54.0 %; 33.0 %; 13.8 %; при этом вводимые (переносимые) дозы, во-первых, исчисляются в мк/кг – 10⁻⁶ и 10⁻⁷ г, вместо мг/кг, т. е. 10⁻³ г, как в предлагаемых полигалактуронидах RNi(II); во-вторых, в предлагаемом вводимые (переносимые) дозы - 150 мг/кг, торможение роста опухолей, т. е. ХСО активность комбинированной терапии - выше и составляют, как показано выше, 85.7 %; 81.4 %; 61.3 %; 73.1 %; 90.5 %; 59.4 %; наконец, СД₅₀ (смертельная доза) колхицина (III) и его производных - препаратов II и I (прототип), при дозах веществ 1.25 мг; 12.0 мг: и 80.0 мг составляют 3.9 мг/кг; 37.0 мг/кг и 250 мг/кг веса животного, выживаемость при этом - 50 %; 22 %; 0 %, соответственно.

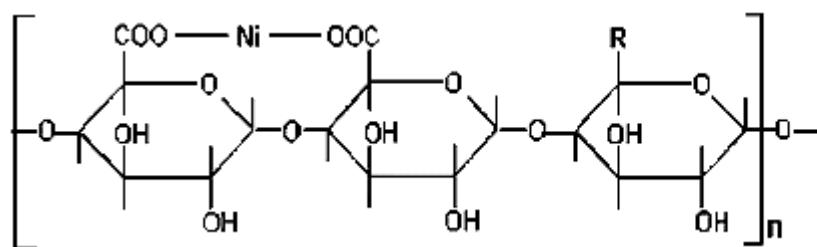
В случае предлагаемых полигалактуронидов Ni(II) гибели животных не происходит, весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются.

В отличие от прототипа, способы получения исходных полигалактуронидов (пектиновых веществ - пектината Ni(II), пектата Ni(II)) и синтезы целевых никель (II) соединений - просты, проходят с высокими выходами как промежуточных, так и конечных целевых веществ. Для синтеза никельпроизводных полигалактуронидов не требуются необычные, малодоступные реагенты, растворители и приборы, аппараты.

Не менее важным преимуществом предлагаемых полигалактуронидов Ni(II) является доступность, широкий выбор и сконцентрированный промышленный масштаб сырья для их производства - жом сахарной свеклы, всевозможные выжимки соко- и виновырабатывающих предприятий, содержание полигалактуронидов в которых колеблется в пределах 25-30 и 10.0 - 15.0 % от сухого веса сырья.

Формула изобретения

Полигалактурониды Ni(II) формулы [C₁₈H₂₁O₁₈RNi(II)]_n, обладающие химиосенсибилизирующим опухоль действием.



где

$$R = \begin{cases} R_1 \cdot COOCH_3 \\ R_2 \cdot COONa \end{cases}$$

$$n = 21 \dots 30$$

$$M_n = 13000 \dots 18000 \text{ а.е.м.}$$

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03