

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

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)<sup>7</sup> **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

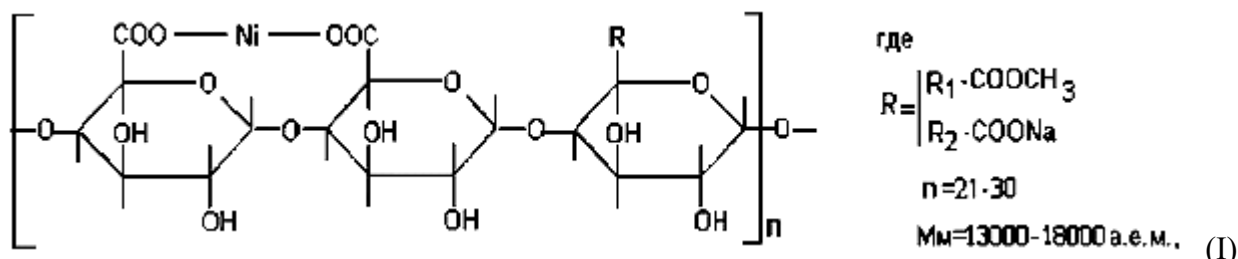
(71)(73) Институт химии и химической технологии НАН Кыргызской Республики (KG)

(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, А, №1047130, кл. C07C 97/16; A61K 31/13, 1982

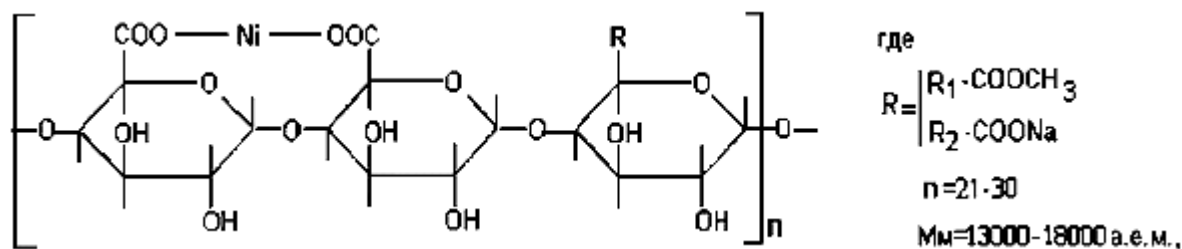
(54) **Полигалактурониды Ni(II), обладающие химиосенсибилизирующим опухоль действием**

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



эмпирическая формула  $[C_{18}H_{21}O_{18}RNi(II)]_n$ . 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 синтеза 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  $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{RNi(II)}]_n$ .

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 фторпиримидинов -5-ФУ, ФТФ и др.

Также известно водорастворимое производное колхицина, обладающее радиосенсибилизирующим, антимиотическим, 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 *Liliceae* - 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  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в расчете на безводный  $\text{NiCl}_2$ . 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, %: С - 38.13; Н - 4.02; О - 48.16; Ni - 9.70;

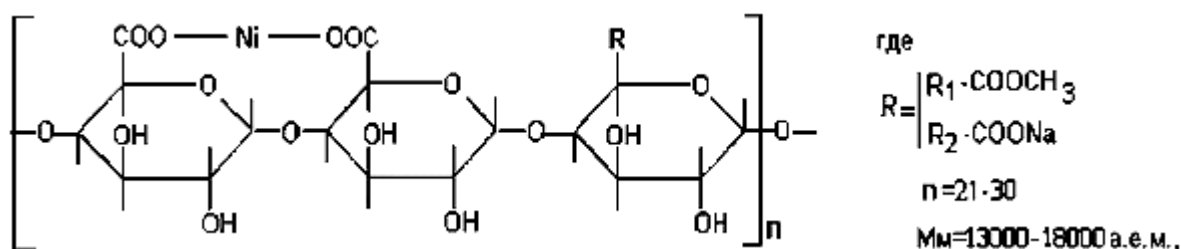
найденно, %: С - 39.00; Н - 4.34; О - 47.56; Ni - 8.90.

Функциональный анализ: свободных COOH-групп - 7.36 %; -OCH<sub>3</sub> групп - 5.20 %.

В ИК спектрах в области 3500-3000 см<sup>-1</sup> проявляются валентные колебания (ОН), (Н<sub>2</sub>О)-групп; 3000-2800 см<sup>-1</sup> - ν (СН); уменьшение интенсивности поглощения в области 1730 см<sup>-1</sup> обусловлены валентными колебаниями ν(С = О) сложно-эфирной группы

  
(-С-ОСН<sub>3</sub>), 1375 см<sup>-1</sup>-δ(-СН<sub>3</sub>) сложно-эфирной группы; в области 1620 см<sup>-1</sup> и 1425 см<sup>-1</sup> появляются интенсивные полосы ионизированных ν<sub>AS</sub> (COO<sup>-</sup>) и ν<sub>S</sub> (COO<sup>-</sup>)-карбоксигрупп; 1335 см<sup>-1</sup> - δ (СН)-карбоксигруппы: группа полос в области 1200 и 1000 см<sup>-1</sup> относятся к валентным колебаниям ν (С-С); ν (С-О); ν (С-О-С) - пиранозного цикла: 1260 см<sup>-1</sup> - ν (С-О-С) - сложно-эфирной группы.

Пектинат Ni(II) - брутто формула -C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>18</sub>RNi(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. свежесквашенного 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 расчете на безводный  $\text{NiCl}_2$ .

Реакционная смесь с осадком пектата - полигалактуроната  $\text{Ni(II)}$  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- $\text{Ni(II)}$  представляет собой порошок светло-болотного цвета, без запаха, хроматографически однороден.

Элементный анализ:

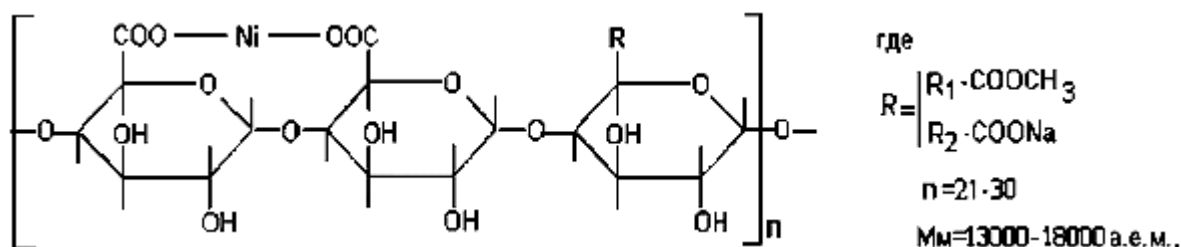
рассчитано, %: C - 35.64; H - 3.47; O - 47.52; Ni-9.57; Na-3.80,

найденно, %: C - 36.50; H - 3.56; O -47.05; Ni + Na- 15.40.

Функциональный анализ:  $\text{COOH}$ -групп - 6.62 %;  $\text{OCH}_3$ -групп - 0.31 %.

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

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



Токсические, противоопухолевые и химиосенсибилизирующие опухоль (ХСО) свойства полигалактуроната - пектата  $\text{Ni(II)}$  изучали в лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК. Опыты поставлены на белых беспородных крысах массой 100-130 г и мышях, белых, беспородных и линии СВА массой 20-22 г. Противоопухолевую 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.

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

Полигалактуронат  $\text{Ni(II)}$  обладает умеренной противоопухолевой активностью в отношении ЛСП, С-45; О. Эрлиха: в дозе 150 мг/кг при виутрижелудочном введении ингибирует рост ЛСП, С-45, О. Эрлиха в пределах 39.4-50.0 %.

Наиболее эффективный режим применения полигалактуроната  $\text{Ni(II)}$  -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  $\text{Ni(II)}$  составляет 85.7; 81.4 %, соответственно.

Самостоятельное применение цис-ДДП - ингибирует рост О. Эрлиха на 48.8 %; при комбинации с полигалактуронатом  $\text{Ni(II)}$  - 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<sub>50/30</sub> 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 мкг/кг; 15 мкг/кг и 0.3 мкг/кг; соответственно, на 54.0 %; 33.0 %; 13.8 %; при этом вводимые (переносимые) дозы, во-первых, исчисляются в мкг/кг – 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-7</sup> г, вместо мг/кг, т. е. 10<sup>-3</sup> 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, СД<sub>50</sub> (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.

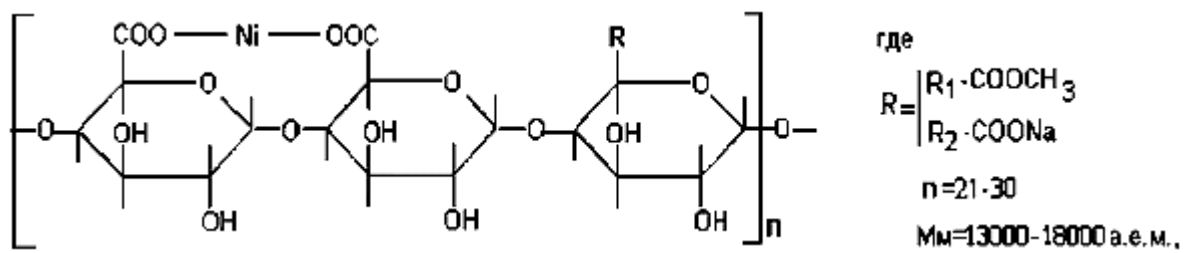
В случае предлагаемых полигалактуронидов Ni(II) гибели животных не происходит, весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются.

В отличие от прототипа, способы получения исходных полигалактуронидов (пектиновых веществ - пектината Ni(II), пектата Ni(II)) и синтеза 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, 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 [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>18</sub>RNi(II)]<sub>n</sub>, обладающие химиосенсибилизирующим опухоль действием.



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