

(19) **KG** (11) **734** (13) **C1** (46) **31.12.2004**

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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20030112.1

(22) 29.09.2003

(46) 31.12.2004, Бюл. №12

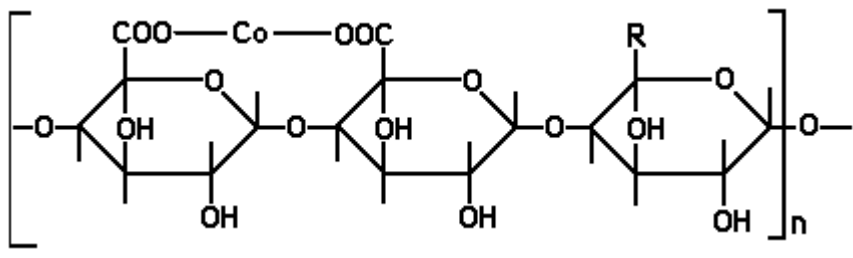
(71)(73) Институт химии и химической технологии НАН КР (KG)

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

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

(57) Изобретение относится к области медицины и химии природных физиологически активных веществ. Задача изобретения - расширение арсенала природных нетоксичных физиологически активных веществ пролонгированного действия для применения в качестве модификатора противоопухолевых препаратов и поиск новых соединений, обладающих химиосенсибилизирующим опухоль свойствами. Задача решается синтезом и использованием полигалактуронидов Со(II) формулы:



где

$$R = \begin{cases} R_1 - \text{COOH}_3 \\ R_2 - \text{COOH} \end{cases}$$

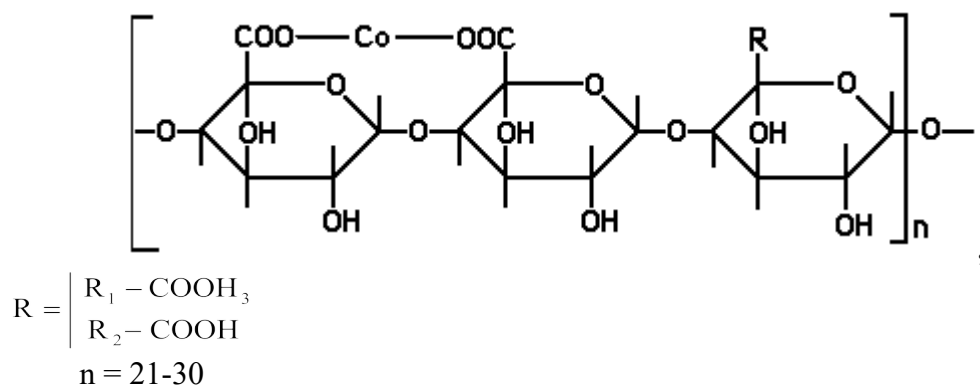
$$n = 21-30$$

Мм = 13000-18000 а.е.м. эмпирическая формула $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{RCo(II)}]_n$

Полигалактурониды (пектинат и пектат) Со(II) нетоксичны, обладают высокой химиосенсибилизирующей опухоль активностью. 2 пр.

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

где



Мм = 13000-18000 а.е.м. эмпирическая формула - $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{RCo(II)}]_n$.

Заявляемые соединения являются биологически активными веществами (БАВ), обладают высокой химиосенсибилизирующей опухоль способностью: повышают эффективность ряда известных противоопухолевых медпрепаратов, снижают или полностью снимают их отрицательное побочное действие, в частности, токсичность.

Аналогом полигалактуронидов Co(II) по строению является полирамногалактуронат меди (II), обладающий противоопухолевой активностью [ДСП, А.с. SU №1822166, кл. C08B 37/06, 1990].

Однако полирамногалактуронат меди (II) не обладает химиосенсибилизирующим опухоль (ХСО) действием, не повышает ингибирующее действие 5-фторурацила (5-ФУ) и других цитостатиков.

Аналогом изобретения является водорастворимое производное колхицина, обладающее радиосенсибилизирующим, антимиотическим и противоопухолевым действием [ДСП, А.с. SU №1047130, кл. C07C 97/16; A61K 31/13, 1982].

Существенным недостатком аналога по назначению является высокая токсичность алкалоидов ряда колхицина и большой вклад в повышение токсических свойств противоопухолевых препаратов, сложность, 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 %, в цветах безвременника (*Colchicum*) иногда 0.8 % по весу сырья; во-вторых, сложность направленного синтеза целевых соединений - водорастворимых хлоргидратов - производных колхицина, и, наконец, очень высокая стоимость как исходного алкалоида - колхицина, и, следовательно, целевых производных - модификаторов противоопухолевых соединений 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 Co(II) , обладающих ХСО действием в сочетании с 5-ФУ и др.

Способы получения новых ХСО полигалактуронидов Co(II) приведены в примерах 1,2.

Пример 1. Синтез пектината Co(II) : 10 г свекловичного пектина (полигалактуронида) растворяют в 1 л дистиллированной воды, фильтруют или центрифугируют, раствор обрабатывают 80 мл 5 %-ного раствора хлорида кобальта (II), реакционную смесь оставляют на ночь в холодильнике для полноты осаждения и стабилизации осадка пектината Co(II) . Осадок центрифугируют, отмывают до отрицательной реакции от хлор-ионов, затем промывают изопропиловым спиртом, сушка осадка - воздушная, выход 71.3%.

Пектинат Co(II) представляет собой порошок сиреневато-коричневого цвета, хроматографически однороден, без запаха.

Элементный анализ:

рассчитано, %: С - 38.06; Н - 4.00; О - 48.09; Со - 9.85;

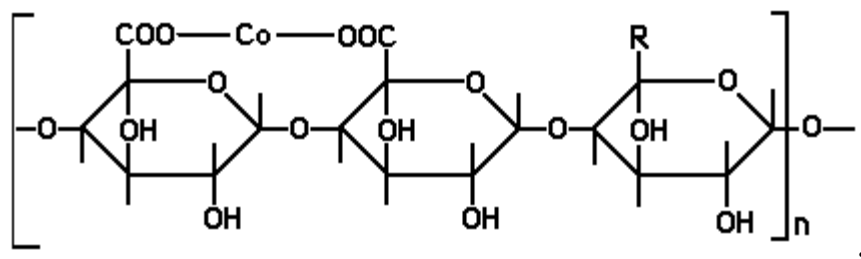
найденно, %: С - 39.10; Н - 4.60; О - 46.17; Со - 10.13.

Функциональный анализ: COOH-групп - 5.40 %; OCH₃-групп - 6.39 %.

ИК спектры полигалактуронидов Со(II) сняты на приборе ИКС-29, щель - 6; усиление - 6; скорость развертки - 3; образцы готовили прессованием с бромистым калием (KBr), таблетки диаметром 20 мм, толщина 2 мм.

При рассмотрении ИКС пектината Со(II), снятых в области 545 и >3500 см⁻¹ видно, что в области 3530 см⁻¹ и 3420 см⁻¹ проявляются валентные колебания ν(OH) и ν(H₂O): 3300 см⁻¹ - валентные колебания ν(NH); в области 3000 и 2800 см⁻¹ - ν(CH)-групп; уменьшение интенсивности поглощения в области 1740 см⁻¹ обусловлены валентными колебаниями ν(C=O) - сложноэфирной группы; 1635 см⁻¹ - β (H₂O). У пектината Со(II) только в области 1652 см⁻¹ и 1410 см⁻¹ появляются интенсивные полосы ионизированных карбоксильных групп - ν_{as}(COO⁻) и ν_s(COO⁻); в области 1440 см⁻¹ - асимметрические колебания - ν_{as}(CH₃)-сложноэфирных групп; 1320-1290 см⁻¹ - деформационные колебания - δ(CH) кольца и δ(OH)-групп; 1380 см⁻¹ - деформационные колебания δ(CH₃) сложноэфирных групп. В области 1332-1355 см⁻¹ - деформационные колебания - δ(CH) пиранозного кольца, в области 1220 см⁻¹ - четко выраженные валентные колебания - ν(C-O-C) сложноэфирной группы; в области 1180 см⁻¹ и 1165 см⁻¹ - валентные колебания - ν(C-O-C); 1125 см⁻¹ - валентные колебания - ν(C-C), ν(C-O) - пиранозного кольца; 995 см⁻¹ - деформационные колебания - δ(COO⁻); 970 см⁻¹ - внеплоскостные деформационные колебания - γ(OH)-группы.

Пектинат Со(II) - эмпирическая формула - [C₁₈H₂₁O₁₈R₁Co(II)]_n или [C₁₉H₂₄O₁₈Co(II)]_n, структурная формула:



где

R = R₁-COOH₃

n = 21-30

Мм = 13000-18000 а.е.м.

Способность пектината Со(II) повышать ингибирующий эффект известных, принятых цитостатиков, как 5-ФУ (5-фторурацил), ДДП - цис-диамино-дихлор Pt(II) и др. 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 линии СВА, массой 20-22 г. Острая токсичность препарата изучена на мышах в дозах 500, 750, 1000 мг/кг при однократном введении per os, гибели животных не наблюдалось.

Противоопухолевая активность исследована на животных с ЛСП (лимфосаркомой Плисса), С-45 (саркомой-45), О. Эрлиха (опухолью Эрлиха, солидный вариант), полученных из банка штаммов Российского онкологического научного центра РАМН, г. Москва.

Пектинат Со(II) в дозе 150 мг/кг при введении per os ингибирует рост ЛСП, С-45 и О. Эрлиха на 47-59 %. Наиболее эффективный режим применения пектината Со(II) - в комбинации с цитостатиками с введением его за 2 часа до цитостатика. Один 5-ФУ ингибирует рост О. Эрлиха на 35 %; ЛСП - 44, С-45 - на 50 %.

Торможение роста указанных опухолей при комбинации цитостатика с пектинатом Со(II) составляет 78.2; 93.1 и 90.3 %, соответственно, т.е. ингибирующее действие 5-

ФУ при сочетании с пектином кобальта (II) возрастает в отношении указанных опухолей в 2.23; 2.11; 1.80 раза, соответственно. Токсическое действие комбинированной терапии не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются.

Таким образом, в условиях эксперимента пектин кобальта (II) при пероральном применении за 2 часа до введения цитостатика - 5-ФУ повышает его эффективность и снижает побочное действие - пектин Co(II) обладает химиосенсибилизирующей опухоль активностью.

Акт испытания - № 1-12-574 от 12.09.2001 - токсичности, умеренной противоопухолевой активности (в дозе 150 мг/кг, при введении рег ос ингибирует ЛСП, С-45 и О. Эрлиха на 47-59 %) и химиосенсибилизирующей опухоль способности, получен в лаборатории химиотерапии опухолей Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ Республики Казахстан.

Пример 2. Способ получения полигалактуроната - пектата кобальта (II):

10 г свежесочного пектина обрабатывают 1000 мл (1 л) 0.1N NaOH, раствор центрифугируют и оставляют на ночь для омыления сложноэфирных групп, в основном - метоксильных. Затем раствор пропускают через катионит КУ-2 в динамическом цикле со скоростью 3-4 мл/мин. При этом pH раствора - 3 или 4 по лакмусу.

Фильтрат вновь обрабатывают раствором NaOH до pH~6, затем - 100 мл 5 %-ного CoCl_2 и реакционную смесь с осадком пектата - полигалактуроната Co(II) оставляют в холодильнике на ночь для осаждения и уплотнения, стабилизации осадка. Затем осадок центрифугируют, отмывают от хлор-ионов дистиллированной водой, в конце - пропиловым спиртом, этанолом, высушивают на воздухе.

Выход пектата - полигалактуроната Co(II) - 88.6%.

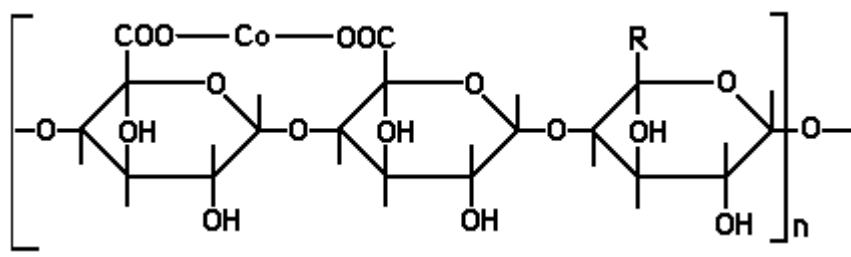
Полигалактуронат Co(II) представляет собой порошок сиреневато-коричневого цвета, хроматографически однороден, без запаха.

Элементный анализ: рассчитано, %: C - 36.92; H - 3.76; Co - 10.09; O - 49.23; найдено, %: C - 37.01; H - 4.00; Co - 10.16; O - 48.89.

Функциональный анализ, %: K_{COOH} - 0.69 %; K_{OCH_3} - 2.1; K_O - 2.79; OCH_3 -групп - 1.45.

При рассмотрении ИКС пектовой-полигалактуронової кислоты и полигалактуроната-пектата Co(II), снятых в области 545 и $>3500 \text{ см}^{-1}$ видно, что наибольшие изменения наблюдаются в области, характерной для (C=O) карбоксильной (COOH)-группы, которая в случае пектовой-полигалактуронової кислоты расположена в области 1740 см^{-1} , а в данном случае - полигалактуроната-пектата-Co(II) - смещена в более низкочастотную часть спектра. В области 1635 см^{-1} - деформационные колебания $\delta(\text{H}_2\text{O})$; 1600 см^{-1} - $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$; 1440 см^{-1} - слабовыраженные [более слабые, чем у вышеописанного пектината Co(II)] $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ - сложноэфирной группы; 1380 см^{-1} - $\nu_s(\text{CH}_3)$ - сложно-эфирной группы; в области 1320 см^{-1} - $1322\text{-}1355 \text{ см}^{-1}$ - $\delta(\text{CH})$ пиранозного кольца; 1220 см^{-1} - слабовыраженные валентные колебания - $\nu(\text{C-O-C})$ сложно-эфирной группы; в области $1165\text{-}1185 \text{ см}^{-1}$ и 1125 см^{-1} - $\nu(\text{C-O-C})$; $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ пиранозного кольца; 970 см^{-1} - $\gamma(\text{OH})$ -внеплоскостные деформационные колебания о кс и группы.

Полигалактуронат-пектат Co(II) - эмпирическая формула - $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{R}_2\text{Co(II)}]_n$, структурная формула:



где

$R = R_2 - \text{COOH}$

$n = 21-30$

$M_m = 13000-18000$ а.е.м.

Изучение токсичности и противоопухолевых свойств, в том числе химиосенсибилизирующей опухоль активности, полигалактуроната - пектата Со(П) проведены в лаборатории экспериментальной фармакологии Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК на мышах белых беспородных линии СВА, интактных и с перевиваемой опухолью Эрлиха (солидный вариант). Полигалактуронат Со(П) - не токсичен.

Полигалактуронат Со(П) вводили внутривентрикулярно с помощью зонда ежедневно в дозе 150 мг/кг в течение 5 дней. Интервал между введением пектата Со(П) и противоопухолевого препарата 5-ФУ (5-фторурацила) составлял 2 часа. Противоопухолевая активность у полигалактуроната (пектата) Со(П) не обнаружена.

При комбинации его с 5-ФУ получены следующие результаты: наиболее эффективный режим лечения - введение пектата-полигалактуроната Со(П) за 2 часа до цитостатика - 5-ФУ. Один 5-ФУ в разовой дозе -12 мг/кг ингибирует рост О. Эрлиха всего на 49 %, торможение роста опухоли в сочетании с полигалактуронатом Со(П) составляет 96.1 %, вес опухолей почти в 2 раза меньше, чем при воздействии одним 5-ФУ, токсическое действие названной сочетанной терапии не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов нормализуются. В случае обратной последовательности применения данных агентов противоопухолевый эффект — слабее.

Таким образом, в условиях эксперимента полигалактуронат (пектат) Со(П) при внутривентрикулярном применении за 2 часа до введения 5-ФУ повышает его эффективность и снижает побочное действие, полигалактуронат-пектат-Со(П) обладает химиосенсибилизирующей опухоль активностью.

Акт испытания полигалактуроната-пектата-Со(П) получен в лаборатории экспериментальной фармакологии Казахского НИИ онкологии и радиологии за №2-12-482 от 08.12.2000.

Преимуществом полигалактуронидов кобальта (П) является их высокая химиосенсибилизирующая опухоль активность: самостоятельно 5-ФУ ингибирует рост О. Эрлиха на 35 %; ЛСП (лимфосаркомы Плисса) на -44; С-45 (саркомы-45) - на 50 %. Торможение роста указанных опухолей при комбинации 5-ФУ с пектином Со(П) составляет соответственно, 78.2; 93.1; 90.3 % при сочетании с полигалактуронатом пектатом-Со(П) торможение роста О. Эрлиха возрастает с 49 до 96.1 %, т. е. противоопухолевый эффект при сочетании 5-ФУ с полигалактуронидами Со(П) выше в 2.23; 2.12; 2.01; ~ 2.0 раза и равен полному исчезновению опухоли, выздоровлению, вес опухолей в 2 и более раз меньше, токсическое действие комбинированной терапии не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов - нормализуются.

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 Со(П) - нетоксичны: острая токсичность изучена на мышах в дозах 500; 750; 1000; 1500 мг/кг при однократном введении - гибели животных не наблюдалось. Токсическое действие комбинированной терапии 5-ФУ с полигалактуронидами Со(П) - не увеличивается, а весовые показатели организма и внутренних органов, как указывается в актах за №№1-12-574 (12.09.2001) и 2-12-482 (08.12.2000), нормализуются. Полигалактурониды Со(П) - нетоксичны, переносимые, вводимые дозы - 150 мг/кг, торможение роста опухолей, т.е. ХСО активность выше в 2.23; 2.12; 2.01 и 2.0 раза, и составляет 78.2; 93.1; 90.3 и 96.1 %; наконец, SD_{50} (смертельная доза) колхицина (III) и его производных (I, II), при дозах 1.25; 12.0 и 80 мг составляют 3.9 мг/кг: 37 мг/кг и 250 мг/кг веса животного, выживаемость при этом - 50; 22.0 и 0 %, соответственно.

соответственно.

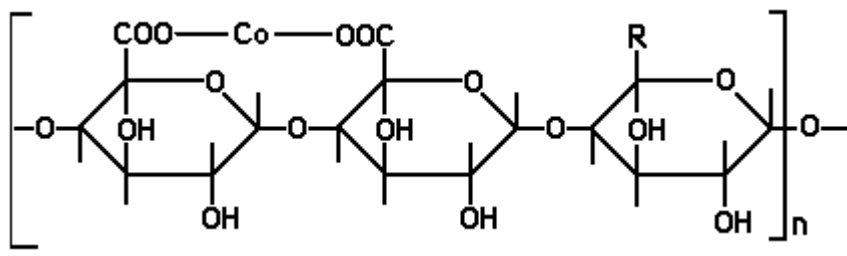
В случае предлагаемых полигалактуронидов Со(II) при дозах 750; 1000; 1500 мг/кг веса животного гибели животных не происходит, весовые показатели организма и внутренних органов нормализуются.

В отличие от прототипа, способы получения исходных полигалактуронидов (пектиновых веществ), пектината Со(II), пектатаполигалактуроната Со(II) - просты, проходят с высокими выходами как промежуточных, так и конечных целевых веществ, для синтезов не требуются необычные, малодоступные реактивы, растворители, приборы и аппараты.

Важнейшим преимуществом полигалактуронидов Со(II), в отличие от прототипов - производных алкалоидов колхицина (I, II), является также доступность, широкий выбор и сконцентрированный промышленный масштаб сырьевых источников 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 -промышленных отходов указанных предприятий.

Формула изобретения

Полигалактурониды Со(II) формулы $[C_{18}H_{21}O_{18}RCo(II)]_n$:



где

$$R = \begin{cases} R_1 - COOH_3 \\ R_2 - COOH \end{cases}$$

$n = 21-30$

$M_m = 13000-18000$ а.е.м.

обладающие химиосенсибилизирующим опухоль действием.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Бакеева С.К.
Арипов С.К.

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