



УКРАЇНА

(19) UA (11) 90233 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 9/08
A61K 31/185
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ СТАБІЛІЗАЦІЇ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ВОДНОГО РОЗЧИНУ СПОЛУКИ ПЛАТИНИ З ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕІНОВОЮ КИСЛОТОЮ

1

(21) а200906849
(22) 30.06.2009
(24) 12.04.2010
(46) 12.04.2010, Бюл.№ 7, 2010 р.
(72) ВОЛЧЕНСКОВА ІЛІМА ІЛІОДОРІВНА, МАЙ-
ДАНЕВИЧ НАДІЯ МИКОЛАЇВНА, СОКИРКО ОЛЕГ
СЕРГІЙОВИЧ
(73) СОКИРКО ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ
(56) UA а200814666 А С, 25.02.2009
RU 95108752 А1, 20.03.1997
SU 1 685 944 А1, 23.10.1991
Шалимов С.А., Волченскова И.И. и др. Примене-
ние оригинального производного платины для
лечения опухолевой язвы кожи при раке молоч-
ной железы, Онкология, 2006; 8(1): 74-77
Главатський О.Я., Волченскова І.І. та інш. Вплив
Pt-ДНК-III на виживаність культивованих клітин
пухлин головного мозку людини, Эксперимента-
льная онкология, 2001; (23): 209-212
Яценко Л.Д. Химиотерапия неоперабельных
опухолей органов грудной и брюшной полости,
Онкология, 2007; 9(1): 75-79
Gibbons GR, Page JD, Chanev SG.: "Treatment of
DNA with ammonium bicarbonate or thiourea can
lead to underestimation of platinum-DNA
monoadducts", Cancer Chemother Pharmacol.
1991;29(2):abstract
(57) 1. Спосіб стабілізації протиопухлинних засобів
на основі водного розчину сполуки платини з де-
зоксирибонуклеїновою кислотою (Pt-ДНК), який
відрізняється тим, що в як стабілізуючий агент
використовують суміш основи фторурацилу з

2

урацилом та сечовиною в мольному співвідно-
шенні Pt-ДНК, основи фторурацилу, урацилу та
сечовини, що складає 1:(6-12):(0,6-1,2):(0,6-1,2),
при зниженні концентрації протонів в розчині до
рН 8,4-9,9.
2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що кон-
центрація комплексу Pt-ДНК складає 1,30-
1,53мг/мл.
3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що за-
сіб додатково містить натрій хлористий в кілько-
сті 0,80-0,90мг/мл.
4. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що за-
сіб додатково містить натрій лимоннокислий в
кількості 0,40-0,53мг/мл.
5. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що за-
сіб додатково містить амоній хлористий в кілько-
сті 0,15-0,18мг/мл.
6. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що ви-
користовують терапевтично прийнятну ДНК, ви-
ділену з природних джерел або синтезовану ме-
тодами генної інженерії, з молекулярною масою
від 0,3-20млн. Дальтон.
7. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що для
доведення рН розчину в засобах до значення 8,4-
9,9 використовують або гідроксид натрію, або
гідроксид калію, або гідроксид амонію, або який-
небудь інший фармакологічно прийнятний регу-
лятор рН.
8. Протиопухлинний засіб на основі водного роз-
чину сполуки платини з дезоксирибонуклеїновою
кислотою, який стабілізований згідно зі способом
за п.1.

Винахід відноситься до медицини, а саме до
протиопухлинних засобів, які можуть бути викори-
стані в лікуванні злоякісних пухлин, і стосується
способів стабілізації протиопухлинних засобів на
основі водного розчину сполук платини.

Серед протиопухлинних засобів, які широко
застосовуються в медичній практиці одними з
найбільш ефективних є ті, що базуються на вод-
ному розчині мономерного комплексу дисплати-
ну. В якості активного агента в цих засобах ви-

(13) C2

(11) 90233

(19) UA

ступає іон платини, координований такими лігандами-носіями, які поглинаються пухлинними клітинами практично так само інтенсивно, як і нормальними. Тому засоби, що містять цисплатину, характеризуються не тільки високою протипухлинною активністю, але й високою токсичністю.

Не менш активними, але значно менш токсичними є протипухлинні засоби, які базуються на водному розчині полімерного комплексу платини з дезоксирибонуклеїновою кислотою (Pt-ДНК). Цей комплекс представляє собою продукт реакції цисплатини та ДНК, в якому один із лігандів-носіїв іону платини є нуклеотидом, вбудованим в структуру двохнитчатих спіралей макромолекул ДНК, які інтенсивно поглинаються тільки пухлинними клітинами, що швидко розмножуються і, як наслідок, протипухлинні засоби, що містять сполуку Pt-ДНК, з високим ступенем вибіркової вражають пухлинні тканини при несуттєвому враженні нормальних тканин [Лечение неоперабельных опухолей органов брюшной полости. С.А.Шалимов и др.1998, стр.103].

Мономерний комплекс цисплатин та полімерний комплекс Pt-ДНК, які є основними речовинами в засобах, недостатньо розчинні і хімічно нестабільні в воді, тому в засоби, які створені на їх водних розчинах, вводять фармацевтичні добавки. В якості добавок використовують фармакологічно прийнятні солі, регулятори рН і інші стабілізуючі агенти, переважно такі, які за рахунок власної біологічної активності, яка виявляється одночасно зі здатністю підвищувати розчинність та хімічну стійкість основної речовини, дозволяють забезпечити ефективність лікування при кращій переносимості.

Відомий спосіб стабілізації протипухлинного засобу на основі водного розчину цисплатини з концентрацією 0,1-1,0 мг/мл, в якому використовують натрій хлористий в кількості 1-20 мг/мл, соляну кислоту до рН2,0-3,0 та маніт (діуретик) в кількості 2-150 мг/мл [Пат. СССР 1192596 А, публ. 15.11.85].

Відомі водні розчини сполуки Pt-ДНК, стабілізовані натрієм хлористим та натрієм лимоннокислим (засобом, що попереджує згортання крові) в кількостях, які відповідають мольному співвідношенню платини, фосфору ДНК, натрію хлористого та натрію лимоннокислого 4:6:30:3 [Пат. України 60597, публ.15.07.05; 61543, публ. 15.08.05; 66476 А, публ. 17.05.04].

Найбільш ефективні і найменш токсичні з відомих протипухлинних засобів на основі водного розчину сполуки Pt-ДНК стабілізують натрієм хлористим, натрієм лимоннокислим, амонієм хлористим (засобом, що викликає відхаркуючу дію і підсилює дію діуретиків) та додатково стабілізуючим агентом, який являє собою натрієву сіль фторурацилу, при співвідношенні компонентів в розчині, мас. %.

сполука Pt-ДНК	0,130-0,153
натрій хлористий	0,080-0,090
натрій лимоннокислий	0,040-0,053
амоній хлористий	0,015-0,018
натрієва сіль фторурацилу	0,025-0,370.

[Пат. України 70456, публ. 15.10.05].

Натрієва сіль фторурацилу підсилює протипухлинний та послаблює токсичний ефекти основної речовини, так як вона має здатність виступати, як в ролі модулятора фармакологічної дії макромолекул Pt-ДНК в організмі, так і в ролі стабілізатора концентрації макромолекул Pt-ДНК в водному розчині засобу.

Проте водний розчин сполуки Pt-ДНК в відомих засобах має рН6,5-7,5, при якому використання натрієвої солі фторурацилу дозволяє стабілізувати концентрацію Pt-ДНК в розчині при температурі вище 35°C. Зниження температури сприяє виділенню з розчину макромолекул сполуки Pt-ДНК в вигляді пухкого осаду та натрієвої солі фторурацилу в вигляді кристалів основи фторурацилу, що викликає зменшення концентрації основної речовини та стабілізуючого агенту в розчині дозованої лікарської форми засобу і негативно впливає на його протипухлинну активність і терапевтичну ефективність. Крім того, випадання осаду обмежує умови зберігання таких препаратів і можливість їх транспортування з метою їх реалізації в аптечній мережі. До того ж вказаний недолік обмежує застосування водних препаратів Pt-ДНК місцевими апплікаціями та внутрішньоочеревинними інфузіями, виключаючи внутрішньовенні та внутрішньоартеріальні інфузії, ендолімфатичні ін'єкції та інтерстиціальний шлях введення.

Задача винаходу полягає в створенні способу стабілізації протипухлинних засобів на основі водного розчину комплексу Pt-ДНК. Така стабілізація забезпечить підвищену вибіркочну специфічну дію комплексу Pt-ДНК та його підвищену терапевтичну ефективність. Також будуть забезпечені розширені умови зберігання засобів та розширений діапазон їх застосування, при яких макромолекули вказаного комплексу не виділяються з розчину в вигляді осаду при температурах нижче 35°C.

Поставлена задача вирішується за рахунок використання в якості стабілізатора суміші основи фторурацилу, урацилу та сечовини, а також за рахунок використання розчину з пониженою концентрацією протонів.

В відповідності з винаходом для стабілізації протипухлинних засобів на основі водного розчину сполуки платини з дезоксирибонуклеїновою кислотою, які додатково можуть вміщувати натрій хлористий, натрій лимоннокислий та амоній хлористий або будь-які інші прийнятні розчинники та наповнювачі, в якості стабілізуючого агенту використовують суміш основи фторурацилу з урацилом та сечовиною в мольному співвідношенні Pt-ДНК, основи фторурацилу, урацилу та сечовини, що складає 1:(6-12):(0,6-1,2):(0,6-1,2), при зниженні концентрації протонів в розчині до рН8,4-9,9.

В складі засобу макромолекули Pt-ДНК можуть вміщувати одну з ДНК, виділену з природних джерел або синтезованих методами генної інженерії з молекулярною масою, не обмежуючись цим, 0,3-20 млн. дальтон.

Для доведення рН розчину в засобах до 8,4-9,9 використовують або гідроксид натрію, або

гідроксид калію, або гідроксид амонію, або який-небудь інший фармакологічно прийнятний регулятор рН.

Відоме використання основи фторурацилу як структурного фрагменту тегафуру - попередника фторурацилу в організмі - для виготовлення протипухлинної композиції, яка вміщує тегафур та урацил в мольному співвідношенні 1:4 [Пат. США 5534513].

Відоме використання сечовини як діуретика, кератолітика, засобу, що знижує внутрішньочерепний та внутрішньочеревний тиск [М.М. Туркевич. Фармацевтична хімія, 1973, стор.45], а також як ексціпієнта, який додають в тверді дозовані лікарські форми для перорального введення.

Відоме застосування високих концентрацій сечовини і підвищення рН більше, ніж до 11, для розкручування спіралізованих нитей природної двох-ланцюгової ДНК [А.Ленинджер. Биохимия. 1976, стр.737].

Про використання основи фторурацилу, урацилу та сечовини окремо або в вигляді суміші, а також про використання регуляторів рН в якості агентів, які перешкоджають виділенню з розчину макромолекулярних сполук металів з ДНК в вигляді осаду, в рівні техніки відомості відсутні. Також не відомо про використання сечовини в дозованих лікарських формах для панентерального введення.

Ефективні інтервали концентрацій і співвідношення основної речовини і солей в водному розчині, стабілізованому за способом, що заявляється, відповідають концентраціям і співвідношенням, встановленим при розробці відомого способу одержання сполуки Рт-ДНК в водному розчині для внутрішньо-очеревинних, внутрішньовенних та внутрішньо артеріальних інфузій, які мають рН6,6-7,5 і видержуються при температурі 35-40°C. Інтервали концентрацій основи фторурацилу, урацилу та сечовини детерміновані мольним співвідношенням нуклеотиду Рт-ДНК,

основи фторурацилу, урацилу та сечовини, що складає 1:(6-12):(0,6-1,2):(0,6-1,2). Інтервали концентрації регулятора рН обмежені низу значеннями, які виключають можливість кристалізації основи фторурацилу, а зверху - фармацевтичними вимогами.

Запропонований спосіб стабілізації не дозволяє виділятися з розчину макромолекулам Рт-ДНК та молекулам основи фторурацилу, що в свою чергу забезпечує отримання протипухлинних засобів з такими концентраціями компонентів, які не змінюються в їх дозованих лікарських формах при температурі витримання готового продукту в інтервалі 25-5°C при тривалому зберіганні.

Спосіб стабілізації, що заявляється, був застосований в технології одержання протипухлинних засобів, перелікованих в таблиці 1, які відрізнялися один від одного природою ДНК, що передувала сполуці Рт-ДНК.

На практиці спосіб стабілізації протипухлинних засобів здійснювали наступним чином. В водний розчин, який вміщував сполуку Рт-ДНК, натрій хлористий, натрій лимоннокислий, амоній хлористий, вводили водний розчин додаткового стабілізуючого агенту, що містив суміш основи фторурацилу, урацилу та сечовини. Одночасно разом з водним розчином стабілізуючого агенту додатково вводили водний розчин регулятора рН, який вміщує натрію гідроксид до рН11-12, яким в розчині цільового засобу рН доводили до 8,4-9,9.

Конкретні умови способу стабілізації протипухлинних засобів, наведених в таблиці 1, із зазначенням кількості вихідних компонентів в розчині основної речовини, в розчині додаткового стабілізуючого агенту і в розчині регулятора рН наведені в таблиці 2, де приклади 1-9 стосуються способу, що заявляється, а приклади 10 і 11 - відомого способу.

Таблиця 1

Непротипухлинного засобу	Характеристика ДНК-попередниці сполуки Рт-ДНК		
	Походження	Співвідношення Г+Ц А+Т	Молекулярна маса, млн. дальтон
1	Генно-інженерна ДНК філадельфійської хромосоми	1,38	0,3-0,5
2	Молоки лососевих и осетрових риб	1,43	0,3-0,5
3	Селезінка щура	1,43	3-4
4	Селезінка великої рогатої худоби, марки Б	1,36	4-7
5	Селезінка поросяти, марки Б	1,43	5-6
6	Пухлина печінки людини	1,54	18-20
7	Лейкозна пухлина Швеця щура	1,04	17-18
8	Селезінка великої рогатої худоби, марки А	1,36	7-14
9	Селезінка поросяти, марки А	1,43	12-16

Позначення в таблиці: А - аденін, Т - тимін, Г - гуанін, Ц - цитозін.

Таблица 2

Неприкладу	Непротипухлинного засобу	Умови виконання способу								
		Кількість вихідних компонентів, г/л								
		в розчині основної речовини				в розчині стабілізуючого агента				в розчині регулятора pH
		Pt-ДНК	NaCl	Na ₃ Cyt	NH ₄ Cl	NaFu	Fu	Ura	Urea	NaOH
1	1	1,30	0,83	0,53	0,17		2,75	0,236	0,127	0,75
2	2	1,53	0,87	0,50	0,15		3,23	0,255	0,149	0,73
3	3	1,48	0,80	0,46	0,18		3,12	0,224	0,132	0,80
4	4	1,50	0,90	0,48	0,15		2,38	0,205	0,122	0,63
5	5	1,30	0,85	0,45	0,16		2,06	0,158	0,106	0,68
6	6	1,30	0,80	0,40	0,15		1,37	0,118	0,063	0,60
7	7	1,40	0,85	0,46	0,16		1,47	0,147	0,080	0,70
8	8	1,53	0,90	0,53	0,18		1,62	0,139	0,099	0,80
9	9	1,48	0,88	0,42	0,17		2,34	0,157	0,108	0,75
10	8	1,50	0,90	0,50	0,18	1,89				
11	9	1,48	0,80	0,53	0,15	1,82				

Позначення в таблиці: NaCl - натрій хлористий; Na₃Cyt - натрій лимоннокислий; NH₄Cl - амоній хлористий; NaFu - натрієва сіль фторурацилу; Fu - основа фторурацилу; Ura - урацил; Urea - сечовина; NaOH - натрію гідроксид.

Характеристики способу, що заявляється, в залежності від умов виконання та температури витримування засобу порівнювали з характеристиками відомого способу по даним, наведеним в

таблиці 3, де приклади 1-9 стосуються способу, що заявляється, а приклади 10 і 11 - відомого способу.

Таблица 3

Неприкладу	Непротипухлинного засобу	Характеристика способу								
		температура витримування засобу, °C	концентрація компонентів в розчині засобу, мг/мл							Мольне співвідношення нуклеотиду Pt-ДНК, Fu, Ura і Urea
			Pt-ДНК	NaCl	Na ₃ Cyt	NH ₄ Cl	NaFu	Fu	NaOH до досягнення pH	
1	1	25	1,30	0,87	0,53	0,17		2,75	9,5	1:12:1,2:1,2
2	2	20	1,53	0,83	0,50	0,15		3,22	9,4	1:12:1,1:1,2
3	3	20	1,48	0,80	0,46	0,18		3,12	9,8	1:12:1,1:1,1
4	4	15	1,50	0,90	0,48	0,15		2,37	8,7	1:9:0,9:1,0
5	5	10	1,30	0,85	0,45	0,16		2,05	8,8	1:9:0,8:1,0
6	6	5	1,30	0,80	0,40	0,15		1,37	8,5	1:6:0,6:0,6
7	7	5	1,40	0,84	0,45	0,17		1,47	8,9	1:6:0,7:0,7
8	8	20	1,53	0,90	0,53	0,18		1,62	9,9	1:6:0,6:0,8
	8	15	1,53	0,87	0,51	0,16		1,62	9,9	1:6:0,6:0,8
	8	10	1,53	0,90	0,52	0,17		1,62	9,8	1:6:0,6:0,8
9	9	15	1,48	0,88	0,42	0,16		2,32	9,2	1:9:0,7:0,9
	9	10	1,48	0,87	0,40	0,15		2,32	9,3	1:9:0,7:0,9
	9	5	1,48	0,88	0,41	0,16		2,32	9,1	1:9:0,7:0,9
10	8	38	1,50	0,90	0,50	0,18	1,89		7,0	
	8	15	1,04	0,90	0,50	0,18	1,47		6,8	
11	9	38	1,48	0,85	0,53	0,15	1,82		8,0	
	9	10	0,63	0,85	0,53	0,15	1,19		7,6	

Відмінності в характеристиках способу, що заявляється і відомого, підтверджуються різними інтервалами значень pH, виміряними потенціометричне, та відсутністю температурної залежності концентрацій основної речовини і додаткового стабілізуючого агента, які контролюються методами кількісного аналізу. Відмінності в концентраціях, які виникають при температурі нижче 35°C в

відомому способі, підтверджуються в прикладах таблиці зменшенням концентрації сполуки Pt-ДНК від 1,50мг/мл до 1,04мг/мл, тобто на 30,7%, а NaFu від 1,89мг/мл до 1,47мг/мл, тобто на 22% в водному розчині засобу, витриманому при 15°C. При витримуванні засобу біля 10°C концентрація зменшується для Pt-ДНК від 1,48мг/мл до 0,63мг/мл, тобто уже на 57,4%, а для NaFu від 1,82мг/мл до

1,19мг/мл, тобто на 34,4%. Концентрації основної речовини і додаткового стабілізуючого агенту в прикладах способу, що заявляється, відповідають концентраціям в розчинах, витриманих при температурах вище 35°C, що підтверджує можливість способу забезпечити умови, при яких макромолекули Рт-ДНК та молекули основи фторурацилу не виділяються з розчину при витримуванні цільового продукту в інтервалі температур 25-5°C.

Протипухлинну активність, яку здатні забезпечити засобом спосіб стабілізації, що заявляється, та відомий спосіб, досліджували в тесті цитотоксичності на моделі адаптованих для культивування клітин злоякісної астроцити головного мозку людини. Клітини підтримували в поживному середовищі Ігла з додаванням ембріональної телячої сироватки, глюкози та інсуліну при постійному режимі газового складу і температурі 36,5°C в інкубаторі. В період інтенсивного росту клітини конт-

рольної культури обробляли фізіологічним розчином, а клітини експериментальних культур розчинами засобів, стабілізованих по способу, що заявляється, і по відомому способу, які попередньо витримували при температурі 10°C. Протипухлинну активність оцінювали по цитотоксичності, яку характеризували відносною по відношенню до контролю кількістю клітин, що загинули через 24 години після обробки засобами. Результати підрахунку відносної кількості клітин, що загинули, поданого в відсотках, наведені в таблиці 4, де під №1 приведені показники контрольної культури клітин, оброблених фізіологічним розчином, під №2-5 - показники експериментальних культур, оброблених розчинами засобів, стабілізованих по способу, що заявляється, під №6 - показники експериментальної культури, оброблених розчином засобу, стабілізованого по відомому способу.

Таблиця 4

Культура клітин №№п/п	Температура витримання засобу, °C	Засіб	Кількість мл засобу на 1л середовища культивування	Концентрація Рт-ДНК в середовищі культивування	Відсоток клітин, що загинули
1	10	Фізіологічний розчин	0,02		1,7
2	10	Засіб №8, стабілізований по способу в прикладі 8	0,02	30,6	86,4
3	10	Засіб №9, стабілізований по способу в прикладі 9	0,02	29,6	80,4
4	10	Засіб №5, стабілізований по способу в прикладі 5	0,02	26,0	78,8
5	10	Засіб №3, стабілізований по способу в прикладі 3	0,02	29,6	82,1
6	10	Засіб №9, стабілізований по способу в прикладі 9	0,02	12,6	32,2

Дані таблиці 4 свідчать про те, що при порівнянні кількісної оцінки протипухлинної активності в тесті цитотоксичності спосіб стабілізації, що заявляється, суттєво перевищує відомий. Витримані при однаковій температурі 10°C та застосовані в однакових об'ємах 0,02мл з однаковими кількостями 1,48мг/мл Рт-ДНК при температурі вище 35°C водні розчини засобу, стабілізованого по відомому способу, після введення в середовище культивування об'ємом 1л створюють в ній концентрацію основної речовини всього 12,6мг/л, яка викликає загибель тільки 32,2%, тоді як водні розчини засобу, стабілізованого по способу, що заявляється, після введення в середовище культивування створюють в ній концентрацію Рт-ДНК 29,6мг/л, яка викликає загибель 80,4-82,1% клітин.

Таким чином, запропонований спосіб стабілізації зберігає високу протипухлинну активність та терапевтичну ефективність засобів на основі водного розчину сполуки Рт-ДНК навіть при температурах 25-5°C, що значно спрощує його зберігання,

транспортування та розширює можливості використання.

Протипухлинні засоби, стабілізовані по способу, що заявляється, можуть бути використані в різних дозованих формах.

Досвід клінічного застосування протипухлинних засобів, стабілізованих по способу, що заявляється, показав, що їх використання в дозованих формах, як для внутрішньо очеревинного і місцевого шляхів введення, так і для внутрішньовенного, внутрішньо артеріального, ендолімфатичного та інтерстиціального, підвищує ефективність терапії первинних та метастатичних пухлин, локалізованих в області голови, ший, легень, нирок, органів травлення та опорно-рухового апарату. Підвищення ефективності виражається в збільшенні тривалості життя хворих та покращання якості їх життя, як під час проведення курсів лікування, так і в віддалений після лікування період часу. При цьому яких-небудь тяжких клінічних або лабораторних проявів побічних ефектів у хворих не було виявлено.