

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**  
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



(19) BY (11) 2462

(13) C1

(51)<sup>6</sup> A 61K 31/51,  
A 61K 31/725

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПАТЕНТНЫЙ  
КОМИТЕТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИВИТАМИННОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

(21) Номер заявки: 950092

(22) 23.02.1995

(46) 30.12.1998

(71) Заявители: Институт биохимии НАН Беларуси, Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета им. В.И.Ленина (BY)

(72) Авторы: Зиматкина Т.И., Юркштович Т.Л., Зиматкин С.М., Ларин Ф.С., Капуцкий Ф.Н. (BY)

(73) Патентообладатели: Институт биохимии НАН Беларуси, Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета им. В.И. Ленина (BY)

(57)

Способ получения препарата, обладающего противоопухолевой и антивитаминной активностью, путем сорбции окситиамина на полиангидроглюконовой кислоте, отличающийся тем, что связанный окситиамин дополнительно обрабатывают раствором метотрексата при массовом соотношении окситиамина:метотрексат, равном 1,0:0,016, с последующим высаждением целевого продукта органическим растворителем.

(56)

1. Химико-фармацевтический журнал, 1991, №1.-С. 4-7 (прототип).

Изобретение относится к биохимии, в частности к витаминологии и экспериментальной онкологии, и может быть использовано в экспериментальной практике.

Известен способ получения препарата-окситиамина, обладающего антивитаминной активностью, путем дезаминирования тиамина в кислой среде [1] (Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю.М.Островского.- Минск, 1979.-С. 219.)

Окситиамин является антагонистом тиамина (витамина B1) и при парентеральном введении в организм ингибирует активность тиаминзависимых ферментов в крови и различных органах (Островский Ю.М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике.- Минск, 1973.- С. 142-158). Кроме того, окситиамин хорошо зарекомендовал себя в экспериментальных исследованиях, обнаружив высокую антиblastomную активность в отношении многих штаммов опухолей (Требухина Р.В., Михальцевич Г.Н. // Экспериментальная онкология, 1982.-Т.4.-№6.-С. 39-43; Зиматкина Т.И., Опарин Д.А., Величко М.Г. и др. // Доклады АН БССР, 1986.-Т.30.-№9.-С. 850-852; Опарин Д.А., Забродская С.В. // Экспериментальная онкология, 1992.-Т.14.-№4.-С. 74-77). Достоинствами данного антиметаболита являются непроницаемость его через гематоэнцефалический барьер, меньшая по сравнению со многими известными цитостатиками токсичность (см. Островский Ю.М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике. Минск. 1973. С.142-158).

Известен также способ получения окситиамина путем гидролиза бромистоводородной соли тиамина в присутствии бромистоводородной кислоты (Опарин Д.А., Зиматкина Т.И., Островский Ю.М. // Вопр. мед. химии, 1987.-Т.33.-№1.-С. 70-71).

Недостатком окситиамина, полученного по известному способу, является низкое сродство его к тиамин-пирофосфокиназе, слабое связывание тканями и быстрое выведение из организма (Островский Ю.М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина.- Минск, 1975.-С. 140-209), в связи с чем препарат приходится вводить животным часто и в больших дозах.

Наиболее близким по совокупности признаков и получению требуемого технического результата (прототипом) к заявленному изобретению является способ получения препарата, обладающего антивитаминной активностью, путем сорбции окситиамина полиангидроглюконовой кислотой [1]. Иммобилизация окситиамина на

# BY 2462 С1

полиангидроглюкуроновой кислоте в определенном интервале концентрации антивитамина на полимерной матрице приводит к увеличению срока его специфического действия в организме. Максимальный антивитаминный эффект достигается при применении препарата с содержанием окситиамина 140-200 мг/г носителя.

Препарат с лабораторным шифром АТ-10-4 (содержание окситиамина 141 мг/г полиангидроглюкуроновой кислоты), полученный по известному способу, обладает также и противоопухолевым действием (Зиматкина Т.И., Зиматкин С.М., Титова С.П., и др. Доклады АН Беларусь? 1992.-Т.36.- №6.-С. 552-557). Недостатком известного способа является то, что полученный препарат при однократном введении его в организм животного обладает недостаточно сильным и длительным канцеростатическим действием.

Заявляемое изобретение направлено на решение задачи, заключающейся в получении препарата, обладающего более высоким противоопухолевым и антивитаминным действием.

Указанная задача решается тем, что в известном способе получения препарата, обладающего противоопухолевой и антивитаминной активностью, путем связывания окситиамина с полиангидроглюкуроновой кислотой, согласно изобретению, связанный с полиангидроглюкуроновой кислотой окситиамин, дополнительно обрабатывают раствором метотрексата с последующим высаждением целевого продукта органическим растворителем.

Примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения с получением положительного эффекта при использовании всей совокупности признаков изобретения, указанной в его формуле.

**Пример 1.** К 2 г. полиангидроглюкуроновой кислоты приливают 18 мл водного раствора, содержащего 800 мг гидроокиси натрия ( $\text{pH}=14$ , отношение массы полиангидроглюкуроновой кислоты к объему раствора 1:9), тщательно перемешивают в течение 2-х часов, добавляют 1н раствор соляной кислоты до  $\text{pH}=6,5$ . К полученной смеси приливают 20 мл водного раствора, содержащего 1г окситиамина (весовое отношение окситиамина : полиангидроглюкуроновая кислота 1:2), выдерживают в течение 2-х часов при постоянном перемешивании и приливают 35 мл ацетона. Выпавший осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают ацетоном, эфиром и высушивают на воздухе. Затем готовят раствор метотрексата. Для этого берут 10 мл физиологического раствора (0,9%  $\text{NaCl}$ ) и растворяют 5 мг метотрексата. Приготовленным раствором, содержащим 5 мг метотрексата, обрабатывают, связанный с полиангидроглюкуроновой кислотой, окситиамин методом простого смешивания (весовое отношение окситиамина : полиангидроглюкуроновая кислота : метотрексат 1,0:6,25:0,016). Полученную смесь выдерживают в течение 2-х часов при постоянном перемешивании и приливают 10 мл ацетона. После этого образец переносят на воронку Бюхнера, промывают ацетоном, эфиром и высушивают при комнатной температуре до воздушного состояния. Содержание окситиамина и метотрексата в образце составляет соответственно 160 мг/г и 0,6 мг/г.

Исследования биологической активности заявляемого препарата проводили на беспородных белых мышах-самках массой 18-21г с быстрорастущими, высокозлокачественными опухолями. Асцитный рак Эрлиха (АРЭ) прививали животным внутрибрюшинно, а саркому 180 (С-180) подкожно от мышей дононоров по общепринятым методикам (Чернов В.А. Методы экспериментальной химиотерапии / Под ред. Г.Н.Першина.-М., 1971.-С. 357-382). Через сутки после прививки опухолей контрольным животным вводили однократно подкожно персиковое масло, а мышам опытных групп заявляемый препарат (лабораторный шифр АТ-10-11) с дозами окситиамина (ОТ) и метотрексата (МТ) 200:0,75 мг/кг. Мышей с АРЭ декапитировали на 5,9 и 12-е, а с С-180 на 5, 10 и 15-е сутки после прививки опухоли, что соответствовало начальному, интенсивному и терминальному периодам роста неоплазмы у контрольных животных (Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов.-М., 1977.-С. 45-134). Асцитную жидкость у животных с АРЭ собирали в пробирки с гепарином, опухолевые клетки отделяли низкоскоростным центрифугированием (1500 об/мин). Измеряли объем асцита и осадка опухолевых клеток; у мышей с С-180 определяли массу опухоли. На основании полученных данных и значений средней массы тела животных в группах к концу определяемого срока рассчитывали индексы торможения роста неоплазмы ( $I_t$ ), коэффициенты противоопухолевой активности ( $K_a$ ) и индексы эффективности препаратов ( $I_e$ ) (Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов.-М., 1977.-С. 45-134; Чернов В.А. Методы экспериментальной химиотерапии / Под ред. Г.Н.Першина.-М., 1971.-С. 357-382). Определяли митотическую активность онкоцитов. Для этого в случае АРЭ каплю асцитной жидкости от каждого животного использовали для приготовления мазков, которые подсушивали на воздухе, фиксировали метанолом, окрашивали гематоксилином и эозином, обезвоживали и помещали в полистирол. В каждом препарате обсчитывали не менее 1000 клеток, исключая из подсчета клетки крови и мезотелия. В качестве показателя пролиферативной активности онкоцитов использовали митотические индексы (МИ), подсчитывая количество митотически делящихся клеток на 1000 из общего числа подсчитанных онкоцитов. В отдельном эксперименте исследовали время жизни животных, рассчитывали среднюю продолжительность и показатели времени жизни ( $\alpha$ ) опытных мышей по сравнению с контрольными. (см. Эмануэль Н.М. Кинетика эксперимен-

# BY 2462 С1

тальных опухолевых процессов.-М., 1977.-С. 35). Сравнительную количественную оценку эффективности противоопухолевого действия соединений проводили комплексно на основании всех перечисленных выше показателей, а также на основании сроков жизни опухоленосителей. Результаты расчетов сведены в таблицы 1 и 2.

В таблицах 1 и 2 приведены данные исследований препарата, полученного по заявляемому способу (лабораторный шифр AT-10-11), в сравнении с контролем, прототипом (лабораторный шифр AT-10-4-окситиамин, связанный с полиангидроглюконовой кислотой) и сочетанным использованием AT-10-4 и МТ. Среднее время жизни мышей контрольной группы с С-180 составило  $20,8 \pm 0,5$  сут., а с АРЭ-13,8 ± 0,5 сут. При применении AT-10-11 срок жизни опухоленосителей возрастал в 2,3-3,2 раза и был выше, чем в случае использования AT-10-4 или его комбинации с МТ (табл.1).

AT-10-11 более значительно, в сравнении с прототипом и сочетанным применением AT-10-4 и МТ, подавлял процесс деления опухолевых клеток. МИ препарата был соответственно в 6 и 4 раза ниже, чем у AT-10-4 или комбинации AT-10-4 с МТ (табл.1). Сопоставление силы и длительности антибластомного действия препаратов по величинам It и Ка (табл.2) говорит о том, что полученный препарат обладает выраженным пролонгированными противоопухолевыми свойствами и вызывает значительное торможение роста обоих опухолевых штаммов, особенно с 1-х по 10-е сутки. Анализ противоопухолевого действия препаратов по величине I<sub>э</sub>, как критерию, учитывающему также увеличение времени жизни опухоленосителей, указывает на большую эффективность AT-10-11 и по этому критерию. Установлено, что исследуемое соединение вызывало ингибирование транскетолазы в опухолевой и других тканях животных. В таблице 3 представлена динамика изменения активности данного фермента в опухоли, крови и печени мышей с АРЭ после введения им соединений. Самое сильное угнетение транскетолазы наблюдалось в опухолевой ткани, затем шла кровь, для которой также характерно наличие апоформы фермента. Значительно меньшие эффекты были отмечены в печени и других тканях, то есть ингибирование транскетолазы в опухоли под действием ОТ и его аналогов, как видим, превалировало над другими тканями. AT-10-11 вызывал более значительное, в сравнении с прототипом или сочетанным применением AT-10-4 и МТ, угнетение активности фермента в злокачественных клетках (табл.3). Обнаружена сильная прямая связь между степенью ингибирования транскетолазы в опухоли и канцеростатическим действием препарата. Показано, что величины It, Ка и I<sub>э</sub> AT-10-11 изменяются симбатно со степенью угнетения им активности фермента в неоплазме (коэффициенты корреляции составили соответственно 0,998; 0,996 и 0,966). Высокие статистические показатели выявленной корреляционной зависимости свидетельствует о том, что антитиаминовое действие соединения (в частности ингибирование транскетолазы) является одним из определяющих в механизме его антибластомного действия.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что новый комбинированный препарат, полученный заявлением способом, более эффективен как противоопухолевое и антивитаминное средство в сравнении с прототипом, а также сочетанным применением AT-10-4 и МТ, т.к. проявляет более сильную антитиаминовую и канцеростатическую активность при минимальном токсическом воздействии на организм опухоленосителей.

Таблица 1

## Показатели времени жизни животных-опухоленосителей ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ ) и митотические индексы онкцитов (МИ, 9-е сут.) после введения соединений

Препараты	АРЭ		$\alpha_2$
	$\alpha_1$	МИ, %	
Контроль	1,00	$24,5 \pm 5,0$	1,00
AT-10-4	2,46	$12,1 \pm 1,0^*$	1,87
AT-10-4 + МТ	3,07	$8,0 \pm 2,0^*$	2,33
AT-10-11	3,80	$2,0 \pm 1,0^*$	2,70

\* - достоверные ( $P < 0,05$ ) по отношению к контролю значения

# BY 2462 C1

Таблица 2

## Параметры противоопухолевого действия соединений

Препараты	I <sub>T</sub> , %	K <sub>a</sub> , %	I <sub>s</sub> , %
<u>5-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	87,5	86,4	212,5
AT-10-4 + MT	87,5	86,3	264,9
AT-10-11	90,0	88,1	289,0
<u>9-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	74,1	75,5	183,3
AT-10-4 + MT	85,2	80,5	247,1
AT-10-11	86,2	80,8	265,0
<u>12-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	66,7	53,3	131,1
AT-10-4 + MT	72,2	58,6	179,9
AT-10-11	79,5	69,3	227,3
<u>5-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	71,2	70,1	131,1
AT-10-4 + MT	82,0	80,6	187,8
AT-10-11	95,2	95,1	257,7
<u>10-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	54,1	52,2	97,6
AT-10-4 + MT	60,2	57,9	134,9
AT-10-11	75,4	74,3	201,4
<u>15-е сутки</u>			
Контроль (АРЭ)	0	0	0
AT-10-4	44,0	42,7	79,8
AT-10-4 + MT	54,3	51,5	120,0
AT-10-11	61,8	57,8	156,6

# BY 2462 С1

Таблица3

**Величины приведенной активности транскетолазы (нмоль седугентулозо-7-фосфата/мл крови или мг ткани/мин) у мышей с АРЭ после введения соединений**

Препараторы	Активность фермента		
	Печень	Кровь	Опухолевые клетки
		<u>5-е сутки</u>	
Контроль (АРЭ)	100,0±1,8	100,0±4,3	100,0±3,7
AT-10-4	53,6±2,5*	45,3±1,7*	30,07±2,3*
AT-10-4 + МТ	52,8±3,3*	40,2±2,2	-
AT-10-11	52,3±2,2*	38,2±2,6	-
		<u>9-е сутки</u>	
Контроль (АРЭ)	100,0±1,8	100,0±3,9	100,0±4,1
AT-10-4	70,2±3,1*	50,2±2,0*	26,1±1,2*
AT-10-4 + МТ	65,1±1,9*	47,5±2,3	20,3±2,0*
AT-10-11	60,0±1,2*	44,3±3,1*	14,0±1,5*
		<u>12-е сутки</u>	
Контроль (АРЭ)	100,0±2,0	100,0±4,8	100,0±2,9
AT-10-4	79,6±1,7*	68,7±3,5*	71,2±1,9*
AT-10-4 + МТ	78,0±1,5*	63,5±4,1*	56,3±1,6*
AT-10-11	74,1±2,0*	59,1±5,6*	45,8±1,3*

\*- достоверные ( $P<0,05$ ) по отношению к контролю значения.

Составитель Г.Н. Бажина  
Редактор В.Н. Позняк  
Корректор Т.Н. Никитина