



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 240 793** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 31/404, A 61 P 35/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2003135148/15, 02.12.2003

(24) Дата начала действия патента: 02.12.2003

(45) Дата публикации: 27.11.2004

(56) Ссылки: RU 2108100 C1, 10.14.1998. WO 91/58893 A1, 16.08.2001. СТРОКИН Ю.В. и др. Синтез и биологическая активность производных гидразидов гетерилуксусных и тиоуксусных кислот "Химико-фармацевтический журнал", 1990, т.24, №7, с. 45-48.

(98) Адрес для переписки:  
109544, Москва, ул.Школьная, 35, оф.5, ООО "ЮНТЭКС", пат.пов.Л.Е.Комарову

(72) Изобретатель: Гайдунь К.В. (RU),  
Лимонов В.Л. (RU)

(73) Патентообладатель:  
Лимонов Виктор Львович (RU)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

(57) Реферат:

Предложено: применение трис-(2-гидроксиэтил)аммониевой соли 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты, ранее известной как стабилизатор клеточных мембран, в качестве противоопухолевого

средства, а также средства, тормозящего метастазирование. Изобретение расширяет арсенал средств заявленного назначения, а также потенцирует терапевтический эффект других противораковых препаратов. 5 табл.

RU 2 240 793 C1

RU 2 240 793 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 240 793** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 31/404, A 61 P 35/00**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2003135148/15, 02.12.2003

(24) Effective date for property rights: 02.12.2003

(45) Date of publication: 27.11.2004

(98) Mail address:  
109544, Moskva, ul. Shkol'naja, 35, of.5, OOO  
"JuNTEhKS", pat.pov.L.E.Komarovu

(72) Inventor: Gajdul' K.V. (RU),  
Limonov V.L. (RU)

(73) Proprietor:  
Limonov Viktor L'vovich (RU)

(54) **ANTI-TUMOR AGENT**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, medicine, oncology, pharmacy.

SUBSTANCE: invention proposes applying 1-benzylindonyl-3-thioacetic acid tris-(2-hydroxyethyl)ammonium salt as an anti-tumor agent that is known early as a stabilizing agent of cellular membranes.

Also, this agent exerts inhibitory effect on metastasizing process. Agent potentiates therapeutic effect of other anti-cancer preparation.

EFFECT: valuable medicinal anti-tumor property of agent, expanded assortment of agents of claimed designation.

5 tbl, 3 ex

RU 2 240 793 C1

RU 2 240 793 C1

Изобретение относится к новым биологически активным веществам из класса алканкарбоновых кислот и может быть использовано в медицине и биологии в качестве основы для создания лекарственных препаратов.

Несмотря на существование в клинической практике более 60-ти противоопухолевых препаратов, эффективность большинства их них недостаточна и спектр онкологических заболеваний, чувствительных к химиотерапии, ограничен. Среди наиболее доступных и применяемых в настоящее время цитостатиков известны такие препараты, как цисплатин и 5-фторурацил, которые используются отдельно или в комплексной терапии рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака печени (гепатомы), меланомы и др. (Противоопухолевая химиотерапия.

Справочник/Под ред. Н.И.Переводчиковой. - М., 1996; Safit J.T., Bonavida V. //Cancer Res. 1992. V.52. P.630; Михайлов И.Б.// Настольная книга врача по клинической фармакологии - руководство для врачей. - СПб. - 2001. С. 615).

Как и большинство препаратов, используемых для лечения злокачественных заболеваний, цисплатин и 5-фторурацил обладают высокой токсичностью - при их применении, как правило, наблюдаются тошнота, рвота, выраженные нарушения функций почек, нарушения функций нервной системы, угнетение кроветворения и т.д. (Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М. - 2001. С. 425-428).

Разработка новых, более активных в отношении злокачественных новообразований лекарственных средств, эффективных при опухолях с первичной или приобретенной резистентностью к известным противораковым препаратам, является актуальным направлением научных исследований в области современной фармакологии и онкологии.

Целью изобретения является создание нового противоопухолевого средства.

В качестве противоопухолевого средства предлагается использовать гетероциклическое соединение - трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты, которое обладает свойствами стабилизатора клеточных мембран (Клиническая эффективность и безопасность цефалоспориновых антибиотиков производства ООО "АБОЛмед". - Сборник трудов НИИКИ, АГМУ и МКБ. - Новосибирск. - 2002 г., стр. 179).

Сущность изобретения заключается в том, что была изучена противоопухолевая активность трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты (далее по тексту - "соединение") в системе in vitro на клетках опухолей различного типа, а также в системе in vivo на линиях мышей, которым перевивали клетки опухолей.

В качестве контрольных препаратов для проверки противоопухолевой активности соединения использовались цисплатин и 5-фторурацил.

Проведенные исследования показали, что исследуемое соединение проявляет в системе in vitro и in vivo выраженные

противоопухолевые свойства.

В работе использовали клеточные опухолевые линии (P 815, B16, L1210, Г27) и здоровых половозрелых животных - мыши С57В1/6 и СВА обоего пола, 8-, 10-недельного возраста, массой тела 18-20 г (разбор в группах животных по исходной массе тела не превышал ±10%). Контрольные и опытные животные были получены одновременно из одного питомника ("Рассвет", г.Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей в одной клетке) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром).

Пример 1. Оценка противоопухолевых свойств соединения in vitro

Оценка противоопухолевых свойств соединения проводилась <sup>3</sup>H-тимидиновым методом на клетках мастоцитомы P 815, меланомы B16, лимфомы L1210 и гепатомы Г27. Клетки засеивали в концентрации 10 × 10<sup>3</sup> лунку, инкубировали с соединением в течении 24 часов, за 6 часов до конца инкубации вносили 1 мКи <sup>3</sup>H-тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на стекляннно-волоконистые фильтры ("Flow Lab") с помощью аппарата Harvester ("Titertek"). Результаты выражали в имп/мин включенного тимидина на 10 × 10<sup>3</sup> клеток (средние данные по триплету). Степень подавления роста опухолевых клеток под влиянием тестируемого соединения вычисляли по формуле: N=(опыт/контроль).100%. В таблицах представлены данные по ингибции пролиферативной активности опухолевых клеток под действием соединения относительно контрольных значений пролиферативной активности этих клеток.

Соединение испытывалось в дозах 5, 25, 50, 75, 100, 150 и 300 мкг/мл. В качестве контрольного противоопухолевого препарата использовали 5-фторурацил (5-ФУ) в дозе 5, 25 и 50 мкг/мл.

В таблице 1 и 2 представлены данные по цитотоксическому эффекту соединения in vitro на опухолевые клетки различного генеза.

Таблица 1  
Цитотоксический эффект соединения in vitro на опухолевые клетки меланомы B16 и гепатомы Г27.

Препарат	Дозы (мкг/мл)	B16		Г27	
		(% ингибции)		(% ингибции)	
Соединение	5	30%	17%		
	25	41%	17%		
	50	94%	34%		
	150	96%	64%		
	300	96%	99%		
5-ФУ	5	12%	1%		
	25	36%	6%		
	50	59%	13%		

Таблица 2  
Цитотоксический эффект соединения in vitro на опухолевые клетки лимфомы L1210 и мастоцитомы P815.

Соединение	Дозы (мкг/мл)	L1210		P815	
		(% ингибции)		(% ингибции)	
Соединение	25	20%	30%		
	50	49%	61%		
	75	63%	83%		
	100	72%	93%		
	150	89%	99%		

Установлено, что в системе in vitro соединение оказывает дозозависимый цитотоксический (ингибирующий) эффект в отношении роста опухолевых клеток всех 4-х типов, причем максимальный эффект (89-99% подавления клеточного роста) наблюдался при дозах соединения 150-300 мкг/мл. В

диапазоне доз от 5 до 50 мкг/мл соединение проявляло значительно больший ингибирующий эффект в отношении клеточных линий В17 и Г27, по сравнению с известным препаратом - 5-фторурацилом.

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований в системе *in vitro* можно утверждать, что трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты является новым высокоэффективным средством, ингибирующим рост опухолевых клеток, которое в сравнимых дозах значительно превышает аналогичное действие 5-фторурацила.

Пример 2. Оценка противоопухолевых свойств соединения *in vivo*.

1. Влияние соединения на метастазирование клеток меланомы.

Клетки меланомы В16 внутривенно переливали мышам С57BL/6 в дозе  $200 \times 10^3$ мл.

Соединение в разных дозах вводили в течение 10-ти дней один раз в сутки внутривенно ежедневно (начиная с 1-го дня после перевивки меланомы В16). Проводили учет метастазов в легких на 15 день после перевивки клеток опухоли. В таблице 3 представлены данные по влиянию соединения на метастазирование клеток меланомы В16 в легкие.

Таблица 3

Доза соединения (мг/кг)	Кол-во Животных	M mts*	% ингибиции
Контроль	9	106,7	
10	9	89,2	16,0%
25	10	71,6	33,0%

\* - среднее число метастазов в легких.

Как видно из представленных в таблице 3 данных, соединение проявляет выраженные антиметастатические свойства в отношении клеток меланомы В16 в дозе 25 мг/кг.

2. Влияние соединения на метастазирование клеток гепатомы Г27 в сравнении с цисплатином

Мышам линии СВА внутривенно вводили клетки гепатомы Г27 в дозе  $100 \times 10^3$ /мл. Учет метастазов в легких проводили на 26 день после перевивки опухоли. Для ингибиции процесса роста метастазов использовали цисплатин в дозе 5 мг/кг и соединение в дозе 10, 25 и 100 мг/кг. Цисплатин и соединение вводились один раз в сутки внутривенно ежедневно в течение 6 дней подряд, начиная со дня перевивки опухоли.

Таблица 4

Влияние соединения на метастазирование клеток гепатомы Г27 в сравнении с цисплатином.

Группы	Дозы соединения	N*	M mts**	% ингибиции
Контроль		9	3,4	
Цисплатин	5 мг/кг	10	2,6	23,5%
Соединение	10 мг/кг	10	4,6	
	25 мг/кг	10	2,2	35,3%
	100 мг/кг	10	2,1	38,2%

\*число животных

\*\* среднее число метастазов в легких

Как видно из таблицы 4, соединение в дозе 25 и 100 мг/кг, вводимое ежедневно внутривенно в течение 6 дней на 35% и 38% соответственно ингибирует процесс образования метастазов клеток гепатомы Г27 в легких, в то время как цисплатин в равнозначной терапевтической дозе (исходя из LD50 однократная доза цисплатина 5 мг/кг

соответствует однократной дозе изучаемого соединения 100-250 мг/кг ) тормозит образование метастазов на 23,5% (т.е. в 1,6 раза менее эффективно).

3. Влияние комбинированного применения соединения с цисплатином на процесс метастазирования меланомы В 16 в легких

Клетки меланомы В16 внутривенно переливали мышам С57BL/6 в дозе  $100 \times 10^3$ /мл. При введении комбинации цисплатин + соединение использовали следующие дозы для каждого препарата (2,5 мг/кг цисплатина + 50 мг/кг соединения). Комбинацию препаратов вводили ежедневно один раз в сутки в течение 6-ти дней, начиная с первого дня после перевивки опухоли. В качестве альтернативы комбинации использовали цисплатин в дозе 5 мг/кг, а соединение в дозе 100 мг/кг.

Учет количества метастазов в легких проводили на 15 день после перевивки клеток опухоли. В таблице 5 представлены данные по влиянию комбинации цисплатин + соединение на процесс метастазирования клеток меланомы В16 в легких.

Таблица 5

Влияние комбинированного применения соединения с цисплатином на метастазирование меланомы В16.

	В16 ( $100 \times 10^3$ /мышь )		
	К-во Мышей	M mts*	% ингибиции
Контроль	10	23,3	
Цисплатин (5 мг/кг)	10	11,8	49,4%
Соединение (100 мг/кг)	11	17,2	26,2%
Цисплатин + Соединение	12	7,2	69,1%

\* среднее число метастазов в легких

Как видно из представленных в табл. 5 данных, введение цисплатина в дозе 5 мг/кг на 49% тормозит метастазирование меланомы В 16 в легкие; введение соединения в дозе 100 мг/кг - на 26% соответственно, а комбинация цисплатина с соединением в половинных дозах - на 69% соответственно. Т.е. на модели метастазирования меланомы В 16 в легкие выявляется потенцирующий эффект комбинированного применения широко используемого в клинической онкологии препарата цисплатин и нового соединения - эффект комбинации меньше суммарного эффекта обоих комбинатов, но выше, чем при введении каждого из них. Учитывая то, что в изученной комбинации, доза высокотоксичного цисплатина была в два раза меньше по сравнению с терапевтической, предлагаемое соединение можно рассматривать в качестве перспективного противоопухолевого соединения для сочетанного применения с известными противораковыми средствами с целью уменьшения их терапевтической дозы (т.е. уменьшения вероятности проявления нежелательных побочных эффектов) и одновременного повышения противоопухолевого действия.

Проведенные в системах *in vitro* и *in vivo* исследования позволяют констатировать наличие у трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты наличие выраженной противоопухолевой активности. Данное соединение перспективно как самостоятельное противоопухолевое

средство нового класса, так и как средство для комбинированного использования с другими противораковыми препаратами с целью потенцирования терапевтического эффекта.

### Формула изобретения:

Применение трис-(2-гидроксиэтил)аммониевой соли 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты в качестве противоопухолевого средства.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-5-

RU 2240793 C1

RU 2240793 C1