



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 188 054** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 N 7/00, A 61 K 31/40,
31/395, 31/555**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: **99126913/14, 17.12.1999**

(24) Дата начала действия патента: **17.12.1999**

(46) Опубликовано: **27.08.2002**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2106146 C1, 10.03.1998. RU 2065734 C1, 27.08.1996. ЧЕРЕШКИН Д.Г. и др. Фонофорез проспирина при папилломатозе гортани и трахеи у детей. Ультразвуковая медицинская аппаратура. - М., 1988, с.77-80. УШАКОВ А.А. Руководство по практической физиотерапии. - М.: АНМИ, 1996, с.95. ПАУЛЬ КАРРЕР. Курс органической химии. ГОСХИМИЗДАТ, 1961, с.992.

Адрес для переписки:
**103787, Москва, ГСП-3, ул. Б. Садовая, 1,
корп. 4, ГНЦ РФ "НИОПИК"**

(71) Заявитель(и):

Государственный научный центр РФ "НИОПИК"

(72) Автор(ы):

**Ворожцов Г.Н.,
Каля О.Л.,
Лужков Ю.М.,
Лукьянец Е.А.,
Андропова Н.В.,
Божевольнов В.Е.,
Герасимова Г.К.,
Мелихов И.В.,
Николаев А.Л.,
Торшина Н.Л.,
Трещалина Е.М.**

(73) Патентообладатель(ли):

Государственный научный центр РФ "НИОПИК"

(54) **СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, к онкологии и может быть использовано для подавления опухолевого роста. В опухолевую ткань вводят октакарбокситаллоцианин кобальта и аскорбиновую кислоту в мольном соотношении 1:3-

1:30 соответственно. Воздействуют на опухолевую ткань ультразвуком с частотой 0,5-3 МГц и интенсивностью 0,5-5 Вт/см². Способ позволяет повысить эффективность подавления опухолевого роста. 1 з.п.ф-лы, 2 ил., 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 188 054** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 N 7/00, A 61 K 31/40,
31/395, 31/555**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **99126913/14, 17.12.1999**

(24) Effective date for property rights: **17.12.1999**

(46) Date of publication: **27.08.2002**

Mail address:

**103787, Moskva, GSP-3, ul. B. Sadovaja, 1,
korp. 4, GNTs RF "NIOPIK"**

(71) Applicant(s):

Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr RF "NIOPIK"

(72) Inventor(s):

**Vorozhtsov G.N.,
Kalija O.L.,
Luzhkov Ju.M.,
Luk'janets E.A.,
Andronova N.V.,
Bozhevol'nov V.E.,
Gerasimova G.K.,
Melikhov I.V.,
Nikolaev A.L.,
Torshina N.L.,
Treshchalina E.M.**

(73) Proprietor(s):

Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr RF "NIOPIK"

(54) **METHOD OF TUMOR GROWTH SUPPRESSION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology. SUBSTANCE: tumor tissue is introduced with cobalt octacarboxyphthalocyanine and ascorbic acid at

molar ratio of 1:3 - 1:30, correspondingly. Tumor tissue is affected with ultrasound at 0.5-3 MHz frequency and 0.5-5 W/cm² intensity. EFFECT: higher efficiency of suppression. 1 cl, 2 dwg, 3 tbl

RU 2 1 8 8 0 5 4 C 2

RU 2 1 8 8 0 5 4 C 2

Изобретение относится к области биологии и медицины, а именно к способам подавления роста злокачественных опухолей.

Известно (Применение ультразвука в медицине. Ред. К. Хилл, пер. с англ., М., 1989), что ультразвук так называемого "терапевтического" диапазона частот и мощностей (до 4 МГц и 4-5 Вт/см² соответственно) применяется достаточно широко при лечении разнообразных видов патологии в качестве физиотерапевтического средства. Однако в отношении злокачественных новообразований "терапевтический" ультразвук как изолированное воздействие не обладает каким-либо лечебным эффектом. Более того, в эксперименте обнаружено стимулирующее опухолевый рост действие ультразвука. Так, в обширном исследовании (Sicard-Rosenbaum L. et al. Effects of continuous therapeutic ultrasound on growth and metastasis of subcutaneous murine tumors. Phys.Ther., 75, 1, 3-11, 1995) на модели индуцированной рабдомиосаркомы у крыс показано, что озвучивание опухоли в непрерывном режиме с параметрами частоты и мощности соответственно 3 МГц и 1,0 Вт/см² и экспозицией 5 мин ежедневно в течение 10 дней привело к увеличению ее объема почти вдвое по сравнению с контрольной группой животных. Объяснение результатов этой работы сводится к хорошо известному эффекту "терапевтического" ультразвука: умеренному нагреванию тканей, увеличению кровотока, активизации обмена веществ клеток и их регенерации, что неизбежно ведет к ускорению роста злокачественной опухоли.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ (международная заявка WO 97/03666, А 61 К 31/40, 97 г.), включающий последовательное введение в опухолевую ткань комплексов кобальта или железа с замещенными фталоцианинами или нафталоцианинами и биогенного восстановителя, в качестве которого использовали, в частности, аскорбиновую кислоту. При этом мольное соотношение комплекс: восстановитель составляет от 1:5 до 1:50, а разовая доза октакарбоксифталоцианина кобальта - 75-100 мг/кг. Рассматриваемый способ позволяет подавить рост довольно широкого круга злокачественных новообразований, что показано на примерах как *in vitro*, так и *in vivo*.

Недостатком прототипа является проявление противоопухолевой активности препаратов в дозе, близкой к максимально переносимой.

Задачей настоящего изобретения является изыскание эффективного и менее токсичного способа для подавления опухолевого роста.

Поставленная задача была решена путем использования октакарбоксифталоцианина кобальта и аскорбиновой кислоты в сочетании с воздействием ультразвука, что приводит к синергетическому эффекту. Причем соотношение октакарбоксифталоцианин кобальта (Терафтал):аскорбиновая кислота (АК) составляет 1: 3-1:30, а используемый ультразвук характеризуется частотой 0,5-3 МГц и интенсивностью 0,5-5 Вт/см².

Интервал соотношения вводимых количеств Терафтал:аскорбиновая кислота, равный 1: 3-1:30, необходим для обеспечения максимального целевого эффекта. При этом введение их в соотношении менее 1:3 нецелесообразно, поскольку не приводит к заметному подавлению роста опухолевой ткани. Применение же соотношения более 1:30 в сочетании с ультразвуковым воздействием может сопровождаться сильными токсическими эффектами.

Параметры ультразвука выбраны таким образом, чтобы обеспечить максимальный эффект. При этом при интенсивности менее 0,5 Вт/см² синергетический эффект воздействия на опухолевые ткани практически не наблюдается, а мощность выше 5 Вт/см² приводит к деструкции и здоровых тканей, особенно в областях, прилегающих к костям. Частота менее 0,5 МГц затрудняет фокусировку воздействия в очаге поражения и приводит к снижению эффективности, а частота более 3 МГц эффективна только при той мощности ультразвука, которая сопровождается ожогами здоровой ткани.

Определение противоопухолевой активности предложенного способа на мышах с перерываемыми опухолями (*in vivo*).

Все эксперименты по оценке эффективности предложенного изобретения проводили на

штаммах опухолей: аденокарцинома молочной железы Ca-755 (примеры 1-13) и карцинома Эрлиха (примеры 14 и 15).

5 Пример 1. Клетки аденокарциномы молочной железы Ca-755 инокулировали внутримышечно в количестве 50 мг опухолевой ткани на мышь. Начало лечения через 12 дней после перевивки опухоли. Введение Терафтала и аскорбиновой кислоты проводили внутривенно.

Результаты, полученные на мышах с опухолями, оценивали с помощью общепринятого показателя противоопухолевой активности - торможения роста опухоли (ТРО) при наличии в качестве контроля мышей, не получавших лечения.

10 ТРО рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = \frac{V_{\text{ср. контроля}} - V_{\text{ср. опыта}}}{V_{\text{ср. контроля}}} \cdot 100\%,$$

где $V_{\text{ср.}}$ - средний объем опухоли, рассчитанный как произведение трех измерений и выраженный в см^3 .

Эксперимент проводили следующим образом.

15 Животное с опухолью Ca-755 фиксировали на специальном пластмассовом столике и лапку с опухолью погружали в контактную среду (вода) с температурой 30°C . Затем вводили Терафтал в количестве 40 мг/кг внутривенно в объеме 0,2 мл физраствора. Через 40 минут после его введения вводили АК в количестве 88 мг/кг и через 20 минут проводили обработку ультразвуком в течение 10 минут. Мольное соотношение Терафтал: АК составляло таким образом 1:13. При этом параметры ультразвука были следующими: частота - 2 МГц, интенсивность - 4 Вт/см^2 . Опухоль облучали равномерно, перемещая излучатель по всей опухоли.

Аналогичным образом проводили сравнительные эксперименты по воздействию только ультразвука и Терафтала с аскорбиновой кислотой без ультразвука (по прототипу).

25 Результаты эксперимента по данному примеру приведены в таблице 1.

Примеры 2-5. Эксперименты проводили аналогично примеру 1, за исключением того, что соотношение Терафтал: АК варьировалось в пределах 1:3-1:30. Результаты экспериментов по примерам 2-5 также приведены в таблице 1.

30 Наблюдаемое среднее увеличение продолжительности жизни для мышей, подвергшихся лечению по предлагаемому способу (примеры 1-5), составляет 140% в сравнении с прототипом. Гибели животных от острой токсичности не наблюдалось.

Примеры 6-13. Эксперименты проводили аналогично примеру 1, но частота и интенсивность ультразвука варьировалась в пределах 0,5-3 МГц и 0,5-5 Вт/см^2 соответственно. Результаты, полученные по данным примерам, приведены в таблице 2.

Пример 14. Клетки карциномы Эрлиха прививают мышам линии Balb-C внутримышечно в заднюю лапку. Далее эксперимент проводят аналогично примеру 1, за исключением того что соотношение Терафтал:АК составляет 1:24 при дозах 5 мг/кг и 20 мг/кг соответственно, а частота ультразвука составляла 0,88 МГц при интенсивности 1 Вт/см^2 .

40 Через двадцать дней после окончания лечения по описанному примеру животных забивали и проводили морфологические исследования опухолевых тканей.

Данные по морфологии, соответствующие примеру 14, приведены в таблице 3.

Пример 15. Эксперимент проводят аналогично примеру 14, однако соотношение Терафтал: АК составляет 1:30 при дозах 5 мг/кг и 25 мг/кг соответственно. Данные по морфологии, соответствующие примеру 15, приведены также в таблице 3.

45 На фиг. 1 приведена микрофотография карциномы Эрлиха до лечения, а на фиг.2 - подвергшейся лечению по примеру 14.

50 Как видно из анализа представленных данных (таблица 3 и фиг.1 и 2) об эффективности предложенного решения свидетельствуют выявленные морфологические изменения в ткани опухоли: обширные типичные по расположению апоптозно-некротические массы; присутствие деструктивных васкулитов в строме опухоли; ярко выраженная десмопластическая реакция и замещение опухолевой ткани на жировую ткань. Таким образом, выявленные морфологические изменения в ткани опухоли коррелируют с

торможением ее роста у леченных предлагаемым способом животных.

Из вышеприведенных данных следует, что использование предлагаемого способа позволяет эффективно подавить рост ряда злокачественных опухолей, а именно добиться торможения роста опухоли, а также уменьшения общей токсичности способа за счет
5 значительного снижения дозы октакарбокситалоцианина кобальта и количества биогенного восстановителя - аскорбиновой кислоты по сравнению с прототипом.

Формула изобретения

1. Способ подавления опухолевого роста, включающий введение в опухолевую ткань
10 октакарбокситалоцианина кобальта и аскорбиновой кислоты, отличающийся тем, что вышеуказанные компоненты берут в мольном соотношении октакарбокситалоцианин кобальта: аскорбиновая кислота 1:3-1:30 и дополнительно воздействуют на опухолевую ткань ультразвуковым облучением.

2. Способ подавления опухолевого роста по п.1, отличающийся тем, что используют
15 ультразвук с частотой 0,5-3 МГц и интенсивностью 0,5-5 Вт/см².

20

25

30

35

40

45

50

Таблица 1. Зависимость торможения роста аденокарциномы молочной железы Са-755 мышей от соотношения Терафтал : АК при дополнительном воздействии ультразвуком (УЗ) (частота 2 МГц , интенсивность 4,0 Вт/см²).*

Фактор воздействия	Доза Терафтал + АК (мг/кг)	Соотношение ТФ : АК	ТРО, %
УЗ	-	-	10
Пример 1			
Терафтал + АК	40 + 88	1 : 13	25
Терафтал+АК+ УЗ	40 + 88	1 : 13	70
Пример 2			
Терафтал + АК	40 + 20	1 : 3	15
Терафтал+АК+ УЗ	40 + 20	1 : 3	50
Пример 3			
Терафтал + АК	30 + 66	1 : 13	20
Терафтал+АК+ УЗ	30 + 66	1 : 13	68
Пример 4			
Терафтал + АК	40 + 180	1 : 30	24
Терафтал+АК+ УЗ	40 + 180	1 : 30	65
Пример 5			
Терафтал + АК	30 + 90	1 : 18	23
Терафтал+АК+ УЗ	30 + 90	1 : 18	60

* Данные по ТРО приведены на 19-й день после трансплантации опухоли.

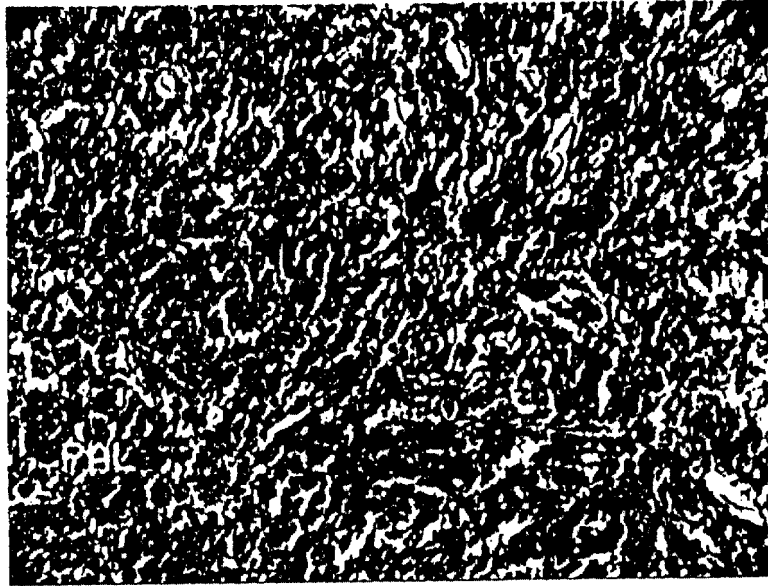
Таблица 2. Зависимость торможения роста аденокарциномы молочной железы Са-755 мышей от частоты и интенсивности и времени воздействия ультразвука при его сочетании с Терафталом и АК.*

NN примера	Время воздействия УЗ, мин	Частота ультразвука, МГц	Интенсивность ультразвука, Вт/см ²	ТРО, %
6	10	0,5	1	34
7	10	3	1	53
8	20	2	1	55
9	20	1	1	51
10	10	2	0,5	50
11	10	2	5	71
12	15	2	2	54
13	15	2	3	68

* Доза Терафтала - 40 мг/кг, доза АК - 88 мг/кг, соотношение Терафтал : АК = 1 : 13.

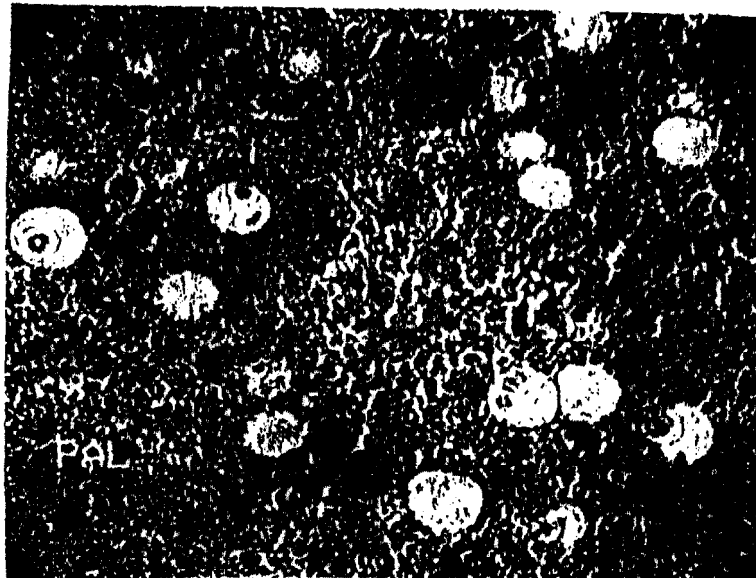
Таблица 3. Результаты морфологического исследования опухолевой ткани карциномы Эрлиха, подвергшейся совместному воздействию Терафтала, аскорбиновой кислоты и УЗ, согласно предложенному способу.

NN примера	Фактор воздействия	Повреждения (некроз + апоптоз) %	Апоптоз %	Повреждение стромы, %	Повреждение сосудов, %
14	Терафтал + АК + УЗ	90	90	90	60
15	Терафтал + АК + УЗ	82	90	90	60
контроль	УЗ	25	60	60	30



Микрофотография карциномы Эрлиха до лечения.
Окраска - гематоксилин-эозин.
Увеличение - 100.

Фиг.1



Микрофотография карциномы Эрлиха после
лечения по примеру 14.
Окраска - гематоксилин-эозин.
Увеличение - 100.

Фиг.2