



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2004 00890**

(22) Data de depozit: **10.04.2002**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2011** BOPI nr. **5/2011**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2005 BOPI nr. **9/2005**

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **NL 2002/00231**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 03/086424 25.10.2003**

(73) Titular:
• **KOMIPHARM INTERNATIONAL CO.,
LTD., 1 RA-107, SHIHWA INDUSTRIAL
COMPLEX, JUNGWANG-DONG,
SHIHUNG CITY, KYONGGI-DO KR**

(72) Inventatori:
• **LEE SANG BONG, 212-1103,
DAELIM APT. CHOWEON NAUL,
PYONGCHON-DONG, ANYANG CITY,
KYONGGI-DO KR;**

• **YANG YONG JIN, 254-4 SK TOWN
HOUSE, KUMI-DONG, BUNDANG-GU,
SEONGNAM-CITY, KYONGGI-DO KR**

(74) Mandatar:
**CABINET M.OPROIU - CONSILIERE ÎN
PROPRIETATE INTELLECTUALĂ S.R.L.
STR.POPA SAVU NR.42, PARTER,
SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 99/18798 A1; EP 0804928 A1

(54) **UTILIZAREA META-ARSENITULUI DE SODIU
PENTRU TRATAMENTUL TUMORILOR SOLIDE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru obținerea unor compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori solide, care poate fi tumoare de

colon, tumoare gastrică, tumoare mamară, tumoare ovariană, tumoare de prostată și tumoare renală.

Revendicări: 8



RO 123269 B1

1 Prezenta invenție se referă la utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru tratamentul
tumorilor solide.

3 Compozițiile farmaceutice care conțin arsen sunt cunoscute în terapia cancerului. De
exemplu, lucrarea lui Waxman S. și a colab. (*The Oncologist* 6 (supl.2), pp. 3-10 (2001))
5 descrie disulfura de arsen, trisulfura de arsen și trioxidul de arsen, utilizarea compoziției care
cuprinde o sare de meta-arsenit (AsO_2^-) și un auxiliar acceptabil farmaceutic.

7 Datorită toxicității lor inerente și apariției unor alternative bune, interesul față de
compușii cu arsen a rămas scăzut.

9 Din stadiul tehnicii se mai cunoaște documentul **EP 0804928 A1**, care face referire
la compoziții farmaceutice care conțin diclorură de mercur sau arsenit de potasiu sau
11 arseniat de sodiu, pentru utilizare ca imunomodulator și pentru reducerea disfuncției
proliferării celulare. Documentul menționează că acești compuși ar trebui utilizați cu un
13 diluant, cum ar fi zer sau vin alb, care are grupări libere SH- care pot bloca ionii de arsen sau
de mercur, pentru eliminarea toxicității.

15 Problema tehnică a prezentei invenții este de a furniza o compoziție farmaceutică
adecvată utilizării în terapia cancerului, care are ca scop tratamentul tumorilor solide.
17 Compoziția farmaceutică poate fi utilizată pentru tratamentul unor astfel de tumori pentru
care nu există tratament, sau ca o alternativă, sau ca un tratament suplimentar pentru astfel
19 de tumori solide.

Invenția se referă la utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru obținerea unei
21 compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori solide.

23 De preferință, invenția se referă la utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru
obținerea unei compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori solide aleasă din
grupul constând din tumoare de colon, tumoare gastrică, tumoare mamară, tumoare
25 ovariană, tumoare de prostată și tumoare renală.

27 Compoziția farmaceutică conform prezentei invenții cuprinde o sare de meta-arsenit
(AsO_2^-) și un auxiliar acceptabil farmaceutic și este o compoziție farmaceutică pentru
tratamentul unei tumori maligne solide aleasă din grupul care constă din tumora de colon,
29 tumora gastrică, tumora mamară, tumora ovariană, tumora de prostată și tumora renală.

31 S-a găsit că tipurile de tumori specificate sunt, în mod surprinzător, sensibile la sarea
de meta-arsenit. În sare, contra-ionul meta-arsenitului poate fi orice contra-ion acceptabil
farmaceutic.

33 În articolul lui Waxman se face referire la un articol al lui Tarnowski G. S. și al colab.
(*Cancer Research*, 26(2), pp. 181-206) în care au fost investigate 8 tipuri de tumori cu 14
35 substanțe chimice antitumorale diferite. Arsenitul de potasiu a afectat doar creșterea tumorii
de ascită Ehrlich. Referitor la acest tip de tumoră este de remarcat că este mai sensibil în
37 ascite față de forma solidă. Aceasta subliniază descoperirea surprinzătoare a prezentei
invenții.

39 Conform unei realizări preferate, sarea este o sare a unui metal alcalin sau alcalino-
pământos. Conform unei realizări preferate, sarea de metal alcalin este o sare de potasiu
41 sau sodiu, de preferință sodiu.

43 Astfel de săruri sunt ușor solubile și sunt ușor disponibile pentru exercitarea efectului
lor antitumoral.

45 Invenția se referă la utilizarea sării de meta-arsenit (As) pentru fabricarea unei
compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori maligne solide aleasă din grupul care
constă din tumora de colon, tumora gastrică, tumora mamară, tumora ovariană, tumora de
47 prostată și tumora renală.

RO 123269 B1

S-a găsit că tumora malignă solidă care aparține grupului constând din tumora de colon, tumora mamară, tumora de prostată și tumora renală au fost cel mai sensibile.	1
În continuare se prezintă exemple nelimitative care ilustrează invenția.	3
Exemplul 1. Comparație între activitatea antiproliferativă exercitată de meta-arsenitul de sodiu și cea exercitată de alți compuși de arsen.	5
Pentru a examina activitatea antiproliferativă a compușilor, s-a utilizat un test modificat cu iodură de propidiu. Pe scurt, celule au fost recoltate din culturi aflate în faza exponențială de creștere dezvoltate în RPMI 1640 suplimentat cu ser fetal de vițel 10% prin tripsinizare, numărate și întinse în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri (100 μl suspensie celulară, 1×10^5 și 1×10^4 celule/ml). După o recuperare de 24 h, pentru a permite celulelor să atingă din nou creșterea exponențială, au fost adăugați la godeuri 50 μl de mediu de cultură sau de mediu de cultură conținând medicamentul de testat. După 3-7 zile de incubare, în funcție de timpul de dublare al celulei, mediul de cultură a fost înlocuit cu un mediu proaspăt care conține iodură de propidiu (6 μg/ml). Plăcile de microtitrare au fost ținute la -18°C , timp de 24 h, rezultând o distrugere totală a celulelor. După decongelarea plăcilor, s-a măsurat fluorescența, utilizând un cititor microplat Millipore Cytofluor 2350 (excitare 530 nm, emisie 620 nm), cu scopul de a cuantifica numărul total de celule.	7 9 11 13 15 17
Inhibarea creșterii a fost exprimată ca tratat/martor $\times 100$ (T/C%). Valorile IC_{50} au fost determinate prin reprezentarea grafică a concentrației de compus în funcție de numărul de celule. Valorile IC_{50} medii au fost calculate conform formulei:	19 21
$\frac{\sum_{x=1}^n \log(\text{IC}_{50,70})_x}{n}$	23 25
$\text{IC}_{50,70}$ mediu = 10	
x = linie celulară specifică tumorii și	27
n = numărul total de linii celulare studiate.	
Dacă IC_{50} și IC_{70} nu au putut fi determinate în intervalul de doză determinat, s-a folosit pentru calcul concentrația cea mai mică sau concentrația cea mai mare.	29
Activitatea antiproliferativă a arsenitului de sodiu a fost comparată cu cea a trioxidului de arsen. Acest studiu a demonstrat că arsenitul de sodiu este de 18 ori mai puternic decât trioxidul de arsen. Valoarea IC_{70} medie pentru arsenitul de sodiu a fost 0,329 μg/ml, în comparație cu valoarea IC_{70} medie de 6,006 μg/ml pentru trioxidul de arsen.	31 33
Într-un studiu independent efectuat de către Oncotest GmbH (Freiburg, Germania) în care trioxidul de arsen a fost comparat cu arsenitul de potasiu, valoarea IC_{50} pentru trioxidul de arsen a fost $3,8 \times 10^{-6}$ M; valoarea IC_{50} pentru arsenitul de potasiu a fost de $4,9 \times 10^{-5}$ M, aproape de opt ori mai mică decât cea pentru trioxid de arsen. Aceste rezultate demonstrează clar că activitatea antiproliferativă a arsenitului de sodiu este în mod semnificativ mai mare decât cea a arsenitului de potasiu.	35 37 39
Într-un alt experiment, s-a analizat activitatea citotoxică a arsenitului de sodiu împotriva liniilor celulare tumorale umane în prezența clorurii de potasiu. Arsenitul de sodiu, singur și în prezență unei concentrații echimolare de KCl, a fost testat <i>in vitro</i> împotriva a cinci linii tumorale umane (două cancere mamare și trei melanoame). Celulele au fost supuse la test în mod continuu timp de patru zile la cinci concentrații diferite în intervalul 0,001 până la 10 μg/ml.	41 43 45

RO 123269 B1

1 Datele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos:

Tabelul 1

Linie celulară tumorală	Arsenit de sodiu IC ₇₀ µg/ml	Arsenit de sodiu plus KCl IC ₇₀ µg/ml
Mamar		
MCF7	0,861	3,014
MCF7	0,610	1,000
MAXF401NL	0,381	1,1519
MAXF401NL	0,739	0,587
Melanom		
MEXF276L	0,692	0,789
MEXF462NL	0,717	1,092
MEXF462NL	0,657	0,697
MEXF514L	0,727	0,969
Medie	0,658	1,058

17

19 Datele arată că influența arsenitului de sodiu a fost redusă cu aproximativ 30% în
21 prezența KCl, sugerând astfel că prezența potasiului în soluția de arsenit inhibă citotoxicitatea
23 arsenitului de sodiu. Aceste date sugerează că utilizarea meta-arsenitului de sodiu
25 are un efect neașteptat în comparație cu arsenitul de potasiu.

27 **Exemplul 2. Activitatea antiproliferativă a meta-arsenitului de sodiu asupra liniilor
29 celulare tumorale umane.**

31 Au fost dezvoltate diferite celule tumorale umane la 37°C într-o atmosferă umidificată
33 (95% aer, 5% CO₂) în culturi unistrat pe mediu RPMI 1640 cu roșu de fenol (Life
35 Technologies, Karlsruhe, Germany) suplimentat cu 10% ser de vițel fetal. Vițeeii au fost
37 tripsinizati și menținuți săptămânal.

39 **Testul de citotoxicitate**

41 Pentru examinarea activității antiproliferante a compusului studiului s-a folosit un test
cu iodură de propidiu modificat (bazat pe W.A. Dengler și colab., Anti-Cancer Drugs, 6, pag.
522-532 (1995). Pe scurt, celulele vor fi recoltate din culturi în faza exponențială de creștere
pe mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser de vițel fetal prin tripsinizare, numărate și
întinse pe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri cu fund plat (140 µl suspensie celulară,
8x10⁴ celule/ml). După 24 h de regenerare, pentru a permite celulelor să-și recapete
creșterea exponențială, s-au adăugat în godeuri 10 µl mediu de cultură (6 godeuri martor pe
placă) sau mediu de cultură conținând medicamentul de testat. Fiecare concentrație de
medicament a fost plasată de trei ori (triplată). După 4 zile de incubare, mediul de cultură a
fost înlocuit cu o soluție apoasă de iodură de propidiu (6 µg/ml). Plăcile de microtitrare au
fost păstrate la -18°C timp de 24 h, ceea ce a dus la distrugerea totală a celulelor. După
dezghețarea plăcilor, s-a măsurat fluorescența, folosind un cititor de microplăci Millipore
Cytofluor 2350 (excitare 530 nm, emisie 620 nm) cu scopul de a cuantifica numărul total de
celule. Testul a inclus martori netratați și pozitivi (5-FU și vindesine).

RO 123269 B1

Inhibarea creșterii este exprimată ca $\text{Tratat/Martor} \times 100$ (sau T/C%). Valorile IC_{50} și IC_{70} s-au determinat prin raportarea concentrației compusului la numărul de celule. Valorile medii ale IC_{50} și IC_{70} s-au calculat conform formulei:

$$\text{Media } IC_{50,70} = \frac{\sum_{x=1}^n \log(IC_{50,70})_x}{10^n}$$

cu x = linie celulară specifică tumorii și
 n = numărul total de linii celulare studiate.

Dacă IC_{50} și IC_{70} nu au putut fi determinate cu intervalul de doză examinat, s-au folosit pentru calcul concentrația cea mai joasă și cea mai ridicată.

Testele au fost considerate corecte numai dacă martorul pozitiv (5-FU) a indus o inhibare a creșterii tumorale de $T/C < 30\%$ și dacă celulele martor tratate ca vehicul au avut o intensitate a fluorescenței > 500 unități.

Rezultate

Rezultatele au fost rezumate în tabelul 2, care indică faptul că în special liniile celulare ale tipului de tumoră gastrică, tumoră ovariană și, în special tumora de prostată, tumora mamară, renală și tumora de colon au fost sensibile la compusul meta-arsenit de sodiu. Prin comparație, leucemia promielocită, care se cunoaște că răspunde la trioxidul de arsen, a indicat o valoare IC_{70} de 6,82 $\mu\text{g/ml}$. Deci, celulele tumorale la care se referă prezenta invenție sunt de 2 până la 20 de ori mai sensibile la compusul meta-arsenit sodiu conform prezentei invenții.

Tabelul 2

Tumoră	Linie celulară	IC_{70} ($\mu\text{g/ml}$)
De colon	DLD1	0,48
Gastrică	GXF251L	3,08
Mamară	MXAF401NL	0,32
Ovariană	OVCAR3	3,02
De prostată	PC3	0,85
Renală	RXF486L	0,63

Revendicări

1

3 1. Utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru obținerea unei compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori solide.

5

7 2. Utilizarea meta-arsenitului de sodiu pentru obținerea unei compoziții farmaceutice pentru tratamentul unei tumori solide aleasă dintre din grupul constând din tumoare de colon, tumoare gastrică, tumoare mamară, tumoare ovariană, tumoare de prostată și tumoare renală.

9

3. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare de colon.

4. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare gastrică.

11

5. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare mamară.

6. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare ovariană.

13

7. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare de prostată.

15

8. Utilizare, conform revendicării 2, în care tumoarea solidă este o tumoare renală.

