



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101010** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07D 239/94 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 10197**
(22) Дата подання заявки: **18.01.2008**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.02.2013**
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.10.2010, Бюл.№ 19**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2013, Бюл.№ 4**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/IN2008/000036, 18.01.2008**

(72) Винахідник(и):
Йотхі Прасад Раманадхам (IN),
Адібхатла Калі Сатія Бхуджанга Рао (IN),
Нагешвара Рао Боллепаллі (IN),
Венкаіах Чоударі Наннапанені (IN)
(73) Власник(и):
НАТКО ФАРМА ЛІМІТЕД,
"Natco House", Road No. 2, Banjara Hills,
Hyderabad, Andhra Pradesh 500 033, India
(IN)
(74) Представник:
Федорова Ірина Олександрівна, реєстр.
№11
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
T. PARKINSON ET AL: "An inhibitor of the epidermal growth factor receptor function does not affect the ability of human papillomavirus 11 to form warts in the xenografted immunodeficient mouse model" ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE BV., AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 1, 13 March 2007 (2007-03-13), pages 43-50
US 5747498 A (SCHNUR RODNEY CAUGHREN [US] ET AL), 05.05.1998
US 2007/020261 A1 (SLIWKOWSKI MARK X [US] ET AL), 25.01.2007
US 5770599 A (GIBSON KIETH HOPKINSON [GB]), 23.06.1998
US 6900221 B1 (NORRIS TIMOTHY [US] ET AL), 31.05.2005
WO 2007/060691 A (NATKO PHARMA LTD [IN]; JYOTHI PRASAD RAMANADHAM [IN]; NAGESHWAR RAO BO), 31.05.2007

(54) ПОХІДНА 6,7-ДІАЛКОКСИХІАЗОЛІНУ, ПРИДАТНА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РОЗЛАДІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З РАКОМ

(57) Реферат:

Було виявлено, що похідні хіназоліну, які містять 3-етиніланілінову групу в положенні 4 і специфічно заміщені алкоксигрупи в положеннях 6 і 7, мають більш потужні і специфічні антипроліферативні властивості в порівнянні з іншими відомими сполуками хіназолінового класу лікарських засобів.

Також, сполуки за даним винаходом несподівано виявились набагато менш токсичними, а їх профіль безпечності - надзвичайно переважним для терапевтичного застосування.

UA 101010 C2

Нові хімічні сполуки, описані у даному винаході, позначені загальною структурою (I) і не були синтезовані раніше, а також досліджені на предмет терапевтичної придатності і профілю безпеки.

Сполука (I) являє собою NRC-2694, якщо вона має структуру (A).

Даний винахід належить до похідних 6,7-діалкоксихіназоліну або їх фармацевтично прийнятних солей, які володіють протираковою активністю, і, таким чином, придатні для використання у методах лікування людини. Даний винахід також стосується способів одержання вказаних похідних хіназоліну і фармацевтичних композицій, що їх містять.

У більшості схем, які застосовувалися в минулому для лікування захворювань, пов'язаних з проліферацією клітин, наприклад, псоріазу і раку, використовують сполуки, які інгібують синтез ДНК. Такі сполуки токсичні для клітин, і їх позитивна дія може виявлятися тільки, якщо вони демонструють селективність по відношенню до ракових клітин, які швидко діляться.

В останні роки виявлено, що клітина може стати раковою внаслідок перетворення частини її ДНК на онкоген, тобто, ген, який при активації призводить до утворення клітин злоякісної пухлини (Bradshas, Mutagenesis, 1986, 1: 91). Декілька онкогенів кодують тирозинкіназні ферменти, і деякі рецептори фактору росту, що також являють собою тирозинкіназні ферменти (Larsen et al., Ann. Reports in Med. Chem. 1989, Chapt.13).

Рецепторні тирозинкінази є важливими для передачі біохімічних сигналів, що ініціюють реплікацію клітин. Вони включають позаклітинний домен зв'язування з факторами росту, наприклад, епідермальним фактором росту, і внутрішньоклітинну частину, яка функціонує, як кіназа з метою фосфорилювання тирозинових амінокислот у білках і, таким чином, впливає на проліферацію клітин. Також відомо, що подібні кінази часто присутні у поширених видах раку людини, наприклад, раку молочної залози (Saimbury et al., Brit. J. Cancer, 1988, 58: 458), раку шлунково-кишечного тракту, такого як рак шлунку, ободової і прямої кишки (Bolen et al., Oncogene Res., 1987, 1: 149). Доведено, що тирозинкіназну активність (ТК активність) частіше виявляють у злоякісних клітинах, ніж у здорових клітинах (Hunter, Cell, 1987, 50: 823).

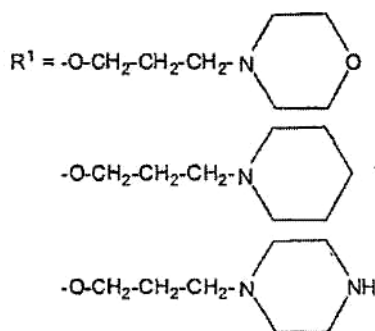
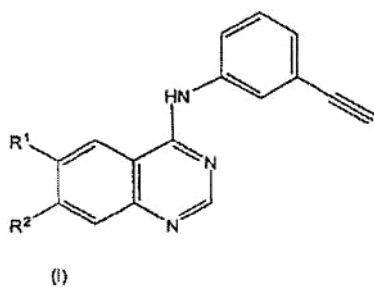
Нещодавно продемонстровано, що рецептор епідермального фактору росту (EGFR, РЕФР), який володіє ТК активністю, великою мірою експресується у багатьох видах раку людини, наприклад, раку мозку, плоскоклітинному раку легені, сечового міхура, шлунку, молочної залози, голови і шиї, стравоходу, щитоподібної залози, тощо (WJ. Gullick, Brit. Med. Bull. 1991, 47: 87). Рецептор епідермального фактору росту (РЕФР), представник родини тирозинкіназних ферментів (RTK - PTK), складається з чотирьох рецепторів Erb1/HER1, Erb/HER2, Erb/HER3 і Erb/HER4.

Важлива стратегія інгібування активності РЕФР-ТК залучає синтетичні молекули невеликого розміру (Arteaga CL, Exp. Cell Res., 2003, 284: 122-130). Деякі похідні хіназоліну, подібні до гефітинібу (Iressa™, Astra Zeneca), ерлотинібу (OSI-774, Tarceva™), PD-183805, PKI-166, EKB-569, PD-168393, CGP-59362, широко досліджували з точки зору можливих варіантів лікування декількох типів раку (Baselga et al., Oncology 2002, 63: 6-16, Cohen RB., Clin. Colorectal Cancer, 2003, 2:246-251). В європейських патентних заявках, а саме EP 0566226, EP 0602851 Aі, EP 0635507 Aі, EP 0635498 Aі, EO 0520722 Aј розкриті деякі похідні хіназоліну, що володіють протираковими властивостями завдяки здатності інгібувати ТК.

В патентах США 54575001, 5457105, 5616582, 5770599, 5747498, 6900221 і т.п. розглянуті похідні хіназоліну з такими структурними ознаками, як заміщений аніліновий фрагмент у положенні 4 і різноманітні функціоналізовані алкільні групи у положеннях 6 і 7 хіназолінового ядра.

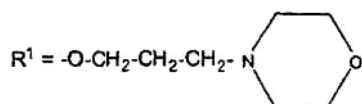
Конкретно, патенти США 5457105 і 5616582 стосуються N-(3-хлор-4-фторофеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну (гефітиніб), а в патентах США 5747498 і 690221 розглянутий N-(3-етилнілфеніл)-6,7-біс(2-метоксиетокси)-4-хіназолінамін (ерлотиніб). WO 20005/070909, WO 2007/060691 A₂ і WO 06/090413 з варіаціями синтезу або поліморфних форм вказаних двох популярних протиракових лікарських засобів.

З урахуванням великого потенціалу, який пропонують вказані сполуки хіназолінового класу, нами розпочато синтез і скринінг великої кількості нових хімічних речовин з новими структурними ознаками. Несподівано було виявлено, що похідні хіназоліну, які містять 3-етиніланілінову групу в положенні 4 і специфічно заміщені алкоксигрупи в положеннях 6 і 7, володіють більш потужними і специфічними антипроліферативними властивостями в порівнянні з іншими відомими сполуками хіназолінового класу лікарських засобів. Також, сполуки за даним винаходом несподівано виявились набагато менш токсичними, а їх профіль безпечності - надзвичайно переважним для терапевтичного застосування. Нові хімічні сполуки, описані у даному винаході, позначені загальною структурою (I) і не були синтезовані раніше, а також досліджені на предмет терапевтичної придатності і профілю безпечності.



і $R^2 = OCH_3, OC_2H_5$

Сполука (i) являє собою NRC-2694, де



і $R^2 = OCH_3$.

Моногідрохлоридна сіль NRC-2694 являє собою NRC-2694 А. Дигідрохлоридна сіль NRC-2694 являє собою NRC-2694 В. Нові сполуки за даним винаходом, особливо NRC-2694, володіють непередбаченими перевершуючими протираковими/антипроліферативними властивостями і пропонують додаткові терапевтичні переваги в порівнянні з відомими лікарськими засобами даного класу, як детально наведено нижче:

1) Нижча інгібувальна концентрація: Інгібувальна концентрація (IC_{50}) у способі кількісного визначення проліферації МТТ продемонструвала значення в інтервалі 40-90 нг/мл (при 100-200 нм), тоді як значення для ерлотинібу становить 836 нг/мл (при 1945 нм). Такий же висновок підтвердили Вестерн-блоттинг і випробування інвазії у клітину з використанням Matrigel.

2) Повна регресія пухлини: Спостерігали повну регресію пухлини після перорального введення сполук голим мишам, яким імплантували клітини A549 раку легені людини в дозі 10 мг/кг. У порівняльному дослідженні, навіть у дозі 100 мг/кг, ерлотиніб HCl не був здатний індукувати повну регресію пухлини. Візуальний огляд тканини легені мишей, яким імплантували A549, і експерименти з експресуванням люциферази підтверджують ці спостереження.

3) Ефективність лікарських засобів: Оцінка ефективної дози показала значення (ED_{50}) 6,3 мг/кг для типової сполуки за даним винаходом viz., NRC-2694, тоді як значення, одержане при введенні ерлотинібу HCl, становило 22 мг/кг.

Спостерігали 100 % лікувальний ефект RC-2694 проти 50-60 % ефекту у випадку ерлотинібу HCl.

4) Додаткові унікальні показання: Сполуки за даним винаходом, типово NRC-2694, демонструють ефективність при додаткових показаннях, таких як рівні регуляції вниз експресії рецепторів ErbB2, ErbB3, ErbB4 і VEGFR. Вказаний специфічний, найбільш багатообіцяючий і несподіваний результат є повністю непередбачуваним і взагалі не спостерігався у випадку введення ерлотинібу HCl.

5) Профіль безпечності: Профіль безпечності сполук за даним винаходом, типово NRC-2694, виявився достатньо перспективним, несподівано широким і надзвичайно переважним для терапевтичного застосування, наприклад, NRC-2694 продемонструвала максимальну переносну дозу (МПД) 500 мг/кг проти дози 2000 мг/кг для ерлотинібу HCl.

Широке терапевтичне вікно, запропоноване NRC-2694, продемонстроване за її значенням LD_{50} 2000 мг/кг проти 500 мг/кг для ерлотинібу HCl. Значення LD_{50} не могло бути точно визначено для NRC-2694, тоді як для ерлотинібу HCl було визначено значення 805 мг/кг.

Наступні приклади наведені з метою ілюстрації способу одержання сполук за даним винаходом та їх перевершуючої біологічної ефективності, і, таким чином, їх не слід вважати обмежувачими контекст або суть даного винаходу (Схема 1).

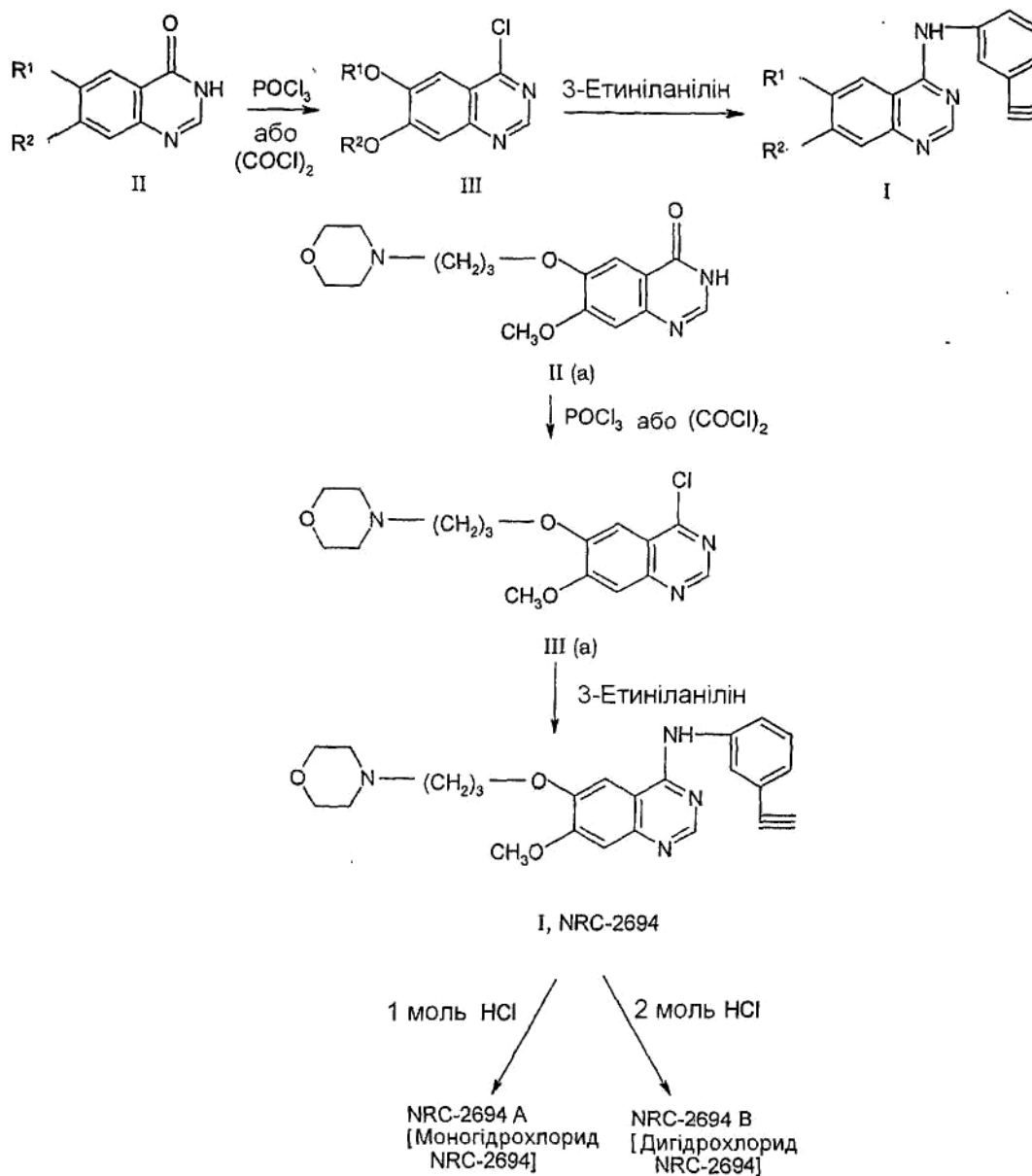


Схема 1

5 Приклад 1

Одержання N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну (I, NRC-2694)

і) Одержання 4-хлор-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну (IIIa)

У чисту і суху 4-хгорлу круглодонну колбу ємністю 5 л, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником, лійкою для додавання, що вирівнює тиск, і гніздом для термометру, вміщують хлороформ (3000 мл), диметилформамід (30 мл) з наступним додаванням 7-метокси-6-(3-морфолінопропокс)-3,4-дигідро-хіназолін-4-ону (IIa) (150 г), одержаного у відповідності до способу, наведеного у Прикладі 1 міжнародної заявки РСТ, опублікованої як WO.2005/070909Ai. Повільно додають оксалілхлорид (120 г), і реакційну суміш нагрівають до температури кипіння із зворотним холодильником і витримують при вказаній температурі протягом приблизно 5 год. Завершення реакції визначено за даними ВЕРХ. Розчинник хлороформ і надлишок оксалілхлориду відганяють, застосовуючи легкий вакуум. Реакційну суміш охолоджують приблизно до 40 °C і додають хлороформ (300 мл), далі знову відганяють розчинник, застосовуючи легкий вакуум. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і додають

ацетонітрил (3000 мл), перемішують протягом 10-15 хв і вміщують в атмосферу азоту для переходу до наступної стадії.

ii) Одержання N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну (I, NRC-2694)

У 4-хгорлу круглодонну колбу ємністю 5 л, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником і гніздом для термометра, що містить хлорпохідне із стадії (i), згаданої вище, в ацетонітрилі додають повільно 3-етилніланілін (69 г) протягом приблизно 10-15 хв, реакційну суміш нагрівають до температури кипіння із зворотним холодильником і витримують при вказаній температурі протягом приблизно 4 год. Завершення реакції визначають за даними ВЕРХ. Потім реакційну суміш охолоджують до 25-35 °С і фільтрують, одержаний продукт промивають ацетонітрилом (500 мл) і висушують.

Висушену неочищену сполуку вміщують в іншу круглодонну колбу ємністю 5 л і додають воду (2500 мл), повільно доводять температуру до 60-65 °С і доводять рН реакційної суміші до 10-12 за допомогою розбавленого розчину натрію гідроксиду. Твердий продукт відокремлюють фільтрацією і промивають водою, після чого висушують при температурі 70-75 °С з одержанням 173,0 г N-(3-етилнілфеніл)-6-(3-морфолінілпропокси)-7-метокси-4-хіназолінаміну у вигляді білої твердої речовини.

iii) Одержання N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну перекристалізацією з толуолу

В 4-хгорлу круглодонну колбу ємністю 5 л, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником і гніздом для термометра, вміщують толуол (3750 мл) з наступним додаванням N-(3-етилнілфеніл)-6-(3-морфолінопропокси)-7-метокси-4-хіназолінаміну (50 г), одержаного у відповідності до способу, описаного у Прикладі I вище. Реакційну суміш нагрівають до температури 90-95 °С, таким чином, щоб тверда речовина повністю розчинилася. Потім обробляють вугіллям і фільтрують. Фільтрат охолоджують до 25-35 °С, витримують протягом приблизно 1 год., знову фільтрують, і матеріал висушують з одержанням 40,15 г N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну у вигляді білої кристалічної твердої речовини.

Тпл: 185-187 °С.

Чистота: 99,72 % (ВЕРХ)/

ІЧ (KBr) (см⁻¹): 3280,9; 2954,6; 2810,3; 1620,1; 1604,2; 1572,1; 1527,7; 1505,2; 1484; 1430,5; 1388,2; 1247,5; 1211,2; 1140,3; 1110,4; 1010,3; 953,4; 859,6; 784,2 см⁻¹.

¹H ЯМР (300 МГц; ДМСО-d₆): 9,57 (с, 1H); 8,48 (с, 1H); 7,99 (с, 1H); 7,86-7,92 (д, 2H); 7,34-7,44 (т, 1H); 7,18-7,21 (с, 2H); 4,15-4,21 (т, 4H); 3,92 (с, 3H); 3,5-3,6 (т, 4H); 2,4-2,52 (м, 5H); 1,95-2,01 (м, 2H).

МС: 419,4 (M+1).

Приклад 2

Перекристалізація N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну з ацетонітрилу

У 3-хгорлу круглодонну колбу ємністю 2 л, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником і гніздом для термометра, вміщують ацетонітрил (1000 мл) з наступним додаванням N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну (25 г), одержаного у відповідності до способу, описаного у Прикладі I вище. Реакційну суміш повільно нагрівають до температури 65-70 °С, таким чином, щоб тверда речовина повністю розчинилася, потім реакційну суміш обробляють вугіллям і фільтрують. Фільтрат переносять в іншу круглодонну колбу, повільно охолоджують до 10-15 °С і витримують протягом 30 хв при вказаній температурі. Одержану суміш фільтрують і, після промивання охолодженим ацетонітрилом, висушують з одержанням 20,50 г N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну у вигляді білої кристалічної твердої речовини.

Тпл: 186-187 °С.

Чистота: 99,68 % (ВЕРХ).

Приклад 3

Перекристалізація N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну з етилацетату

В 3-хгорлу круглодонну колбу ємністю 3 л, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником і гніздом для термометра, вміщують етилацетат (2000 мл) з наступним додаванням N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокси]-4-хіназолінаміну (25 г), одержаного у відповідності до способу, описаного у Прикладі I вище. Реакційну суміш повільно нагрівають до температури 65-70 °С, таким чином, щоб тверда речовина повністю розчинилася, потім реакційну суміш обробляють вугіллям і фільтрують. Фільтрат переносять в іншу

круглодонну колбу, повільно охолоджують до 10-15 °C і витримують протягом 30 хв при вказаній температурі. Кристалічну суміш фільтрують і, після промивання одержаної суміші охолодженим етилацетатом, висушують з одержанням 20,95 г N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну у вигляді білої кристалічної твердої речовини.

5 Тпл: 185-187 °C.

Чистота: 99,7 % (ВЕРХ).

Приклад 4

Одержання N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну моногідрохлориду (NRC-2694A)

10 У 3-хгорлу круглодонну колбу ємністю 500 мл, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником, гніздом для термометра і т.п., вміщують ізопропіловий спирт (250 мл) з наступним додаванням N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну (5 г), одержаного у відповідності до способу, описаного у Прикладі І. Температуру реакційної суміші доводять до 65-70 °C таким чином, щоб тверда речовина
15 повністю розчинилася, потім обробляють вугіллям і фільтрують. Фільтрат охолоджують приблизно до 55-60 °C, і додають 1 моль газоподібного HCl, розчиненого у розчині ізопропілового спирту при відокремленні солі моногідрохлориду. Реакційну суміш витримують при температурі кипіння із зворотним холодильником протягом приблизно 2 год., а потім охолоджують до кімнатної температури, фільтрують і висушують з одержанням 5,1 г N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну моногідрохлориду у
20 вигляді білої кристалічної речовини.

Чистота: 99,8 % (ВЕРХ).

Вміст HCl (хімічний): 8,19 % (теоретичне значення: 8,01 %).

ІЧ (KBr) (см⁻¹): 3407; 3305; 3259,5; 2934; 2619; 1625,9; 1593,8; 1579,9; 1530,8; 1512; 1476,9;
25 1392,2; 1356,8; 1282,1; 1242,1; 1207,9; 1141,3; 1100,8; 1076,1; 1042,1; 1026,5; 1011,5; 957,7; 941,5; 922,1; 857,3; 852; 838,1; 796; 782,4.

Приклад 5

Одержання N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну дигідрохлориду (NRC-2694B)

30 У 3-хгорлу круглодонну колбу ємністю 500 мл, обладнану механічною мішалкою, зворотним холодильником, гніздом для термометра і т. п., вміщують ізопропіловий спирт (250 мл) з наступним додаванням N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну (5 г), одержаного у відповідності до способу, описаного у Прикладі І. Температуру реакційної суміші доводять до 65-70 °C таким чином, щоб тверда речовина
35 повністю розчинилася. Потім обробляють вуглецем і фільтрують. Фільтрат охолоджують до приблизно 55-60 °C, і додають 1 моль газоподібного HCl, розчиненого у розчині ізопропілового спирту при відокремленні солі дигідрохлориду. Реакційну суміш витримують при температурі кипіння із зворотним холодильником протягом приблизно 2 год., після чого охолоджують до кімнатної температури, фільтрують і висушують з одержанням N-(3-етилнілфеніл)-7-метокси-6-[3-(4-морфолініл)пропокс]-4-хіназолінаміну дигідрохлориду у вигляді білої кристалічної
40 речовини.

Чистота: 99,78 % (ВЕРХ).

Вміст HCl (хімічний): 14,9 % (теоретичне значення: 14,83 %).

ІЧ (KBr) (см⁻¹): 3406,8; 3194,1; 2942,7; 2681,9; 2623,6; 1633,7; 1566,2; 1528,6; 1512,5; 1438,6;
45 1359,6; 1282,3; 1218,3; 1157,1; 1132,7; 1105,9; 1075,6; 1001,9; 942,1; 875,3; 816,1; 787,2.

Приклад 6

Оцінка максимально переносної дози (МПД) та гострої токсичності (табл. 1 і 2)

Дослідження МПД, процитовані раніше, було проведено на самцях і самках мишей Swiss Albino (швейцарських білих) масою 20-25 г.

50 Дослідження проведено згідно правилу 420 вказівок Організації економічного співробітництва та розвитку (OECD), дослідження проводили у період з 9 годин ранку до 17 годин з метою уникнення впливу циркадного циклу, сполуки Ерлотиніб і NRC-2694 суспендували у 2 % акацієвої камеді, вказані сполуки вводили в дозах 5, 50, 300 і 2000 мг/кг перорально. Проміжні дози вводили у залежності від смертності. За тваринами спостерігали
55 щодо виражених поведінкових змін кожної години протягом 6 год. після введення лікарського засобу. Далі за тваринами спостерігали протягом 72 год. на випадок смертності. Тварин, що вижили, умертвляли і здійснювали розтин для підтвердження абсорбції сполуки в шлунково-кишковому тракті.

60 Гостру токсичність Ерлотинібу і NRC-2694 вивчали на самцях і самках мишей. Дози 500, 750, 1000 і 2000 мг/кг вводили перорально. Кожна група складалася з 5 мишей. За смертністю

тварин спостерігали протягом 14 днів після введення сполуки. Тварин, що вижили, умертвляли і здійснювали розтин для підтвердження абсорбції сполуки через шлунково-кишковий шлях.

LD₅₀ визначали, використовуючи дослідження Litchfield і Wilcoxon (J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949, 96: 99-113).

- 5 Результати досліджень токсичності наведені у табл. 1 і 2. Виявлено, що максимально переносна доза (МПД) ерлотинібу HCl становить 500 мг/кг (п/о), тоді як для NRC-2694 вказана доза становить 2000 мг/кг (п/о). Аналогічно виявлено, що LD₀ становить 500 мг/кг (п/о) для ерлотинібу HCl і 2000 мг/кг (п/о) для NRC-2694. Таким чином, виявлено непередбачену і несподівано низьку токсичність і профіль безпеки NRC-2694 в порівнянні з ерлотинібу HCl.

10

Таблиця 1

Порівняльне дослідження ерлотинібу HCl і NRC-2694 (на мишах), процитоване раніше

Сполука	МПД, мг/кг (п/о)
Ерлотинібу HCl	500
NRC-2694	2000

Таблиця 2

Дослідження гострої LD₅₀
(період спостереження 7 днів після введення одноразової дози) у мишей

Сполука	LD ₀ , мг/кг (п/о)*	LD ₅₀ , мг/кг (п/о)
Ерлотинібу HCl	500	805
NRC-2694	2000	-

*LD₀: Після проходження 7 днів смертності не спостерігали.

Приклад 7

Дослідження оцінки in vitro, in vivo і оцінки терапевтичної ефективності

- 15 Зразки: Ерлотиніб використовували як контрольний лікарський засіб, біологічну активність нових сполук за даним винаходом перевіряли в порівнянні з даним лікарським засобом як позитивним контролем.

i) Кількісне визначення проліферації МТТ:

- 20 Кількісне визначення проліферації МТТ [3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід], вперше описане Mosmann у 1983 р., базується на здатності дегідрогеназного ферменту мітохондрій із життєздатних клітин розщеплювати кільця тетразолію МТТ блідо-жовтого кольору з утворенням синіх кристалів формагану, що практично не проникають у клітинні мембрани, в результаті чого вони акумулюються у здорових клітинах. Солюбілізація клітин шляхом додавання детергенту в результаті приводить до вивільнення солюбілізованих кристалів.
- 25 Кількість клітин, що виживають, прямо пропорційна рівню утвореного продукту формагану. Далі колір можна визначити кількісно, використовуючи звичайний колориметричний аналіз. Вказаний аналіз проводять, використовуючи Ерлотиніб і досліджувану сполуку в клітинах A549 і H 1299 у концентрації 0-1000 нМ/мл. Протокол базується на АТСС та інструкціях виробника (Каталог №: 30-1010K).

- 30 В результаті кількісного визначення проліферації МТТ виявлено, що інгібувальна концентрація (IC₅₀) сполук за даним винаходом, варіює в межах 40-90 нМ/мл (100-200 нМ), тоді як ерлотиніб гідрохлорид, використаний як позитивний контроль, продемонстрував значення не більше 836 нМ/мл (1945 нМ). Таким чином, нові сполуки за даним винаходом як мінімум у 10 разів потужніші за ерлотиніб гідрохлорид.

- 35 ii) Вестерн-блоттинг (фіг. 1)

- Ідеальні концентрації лікарських засобів, визначені за допомогою кількісного визначення проліферації МТТ, використовували для обробки 1×10⁶ клітин H 1299 або A549 у відповідних середовищах протягом 72 год., після чого лізати клітин екстрагували і фракціонували у 10 % гелі SDS PAGE у відновлювальних умовах. Гелі наносили на оброблені нейлонові мембрани (Biorad) і виконували імунні проби на наявність EGFR, P13K і AKT.

- 40 Спостерігалися істотні дозозалежні зміни експресії EGFR. NRC-2694 в концентраціях 80 нМ (190 нМ) спричиняв інгібування експресії EGFR у порівнянні з ерлотинібу HCl у концентраціях

800 нМ (1860 нМ). Отже, очевидним є рівень ефективності NRC-2694, який є вищим на десять порядків.

iii) Дослідження інвазії з використанням Matrigel (фіг. 2)

Інвазійність *in vitro* клітин H 1299 і A549 в присутності різних концентрацій сполук NRC (визначають за допомогою кількісного визначення проліферації MTT) оцінювали, використовуючи модифіковане випробування за допомогою камери Бойдена (Boyden). Клітини обробляли вказаними сполуками протягом 48 год. 1×10^6 клітин суспендували у 600 мкл середовища, вільного від сироватки, у яке додавали 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA), і вміщували у верхнє відділення камер Transwell (Corning Costar Fisher Scientific, кат. № 07-200-158, Pittsburgh PA), вкритих Matrigel (0,7 мг/мл). Нижнє відділення камери заповнювали 200 мкл середовища з вмістом сироватки, в якому клітини мігрували протягом 24 год. Після інкубації клітини фіксували і фарбували за допомогою Гема-3, далі підраховували їх кількість, як було описано раніш (Mohanam et al. 1993). Кількість клітин, що мігрували, визначали як відсоток інвазії. Сполука NRC-2694 продемонструвала значне, дозозалежне зменшення інвазії.

iv) Оцінка *in vivo* підшкірних пухлин легені голих мишей (фіг. 3):

Голим мишам імплантували 2×10^6 клітин A549 у праву частину задньої кінцівки. Для спостереження за пухлиною (>2 мм) миші одержували досліджувані сполуки перорально або внутрішньочеревинно, в тому числі ерлотиніб HCl, який використовували як позитивний контроль. Дозу 100 мг/кг ерлотинібу HCl ідентифікували як початкову дозу.

Вимірювали розміри пухлини і спостерігали повну регресію пухлин у мишей, яким вводили NRC-2694 в дозі 10 мг/кг. Однак, пухлини були все ще присутні у тварин контрольної групи, яким аналогічно вводили ерлотиніб HCl, навіть при рівні дози 100 мг/кг. Таким чином, встановлено рівень ефективності сполуки за даним винаходом (NRC-2694), який є вищим на десять порядків.

v) Оцінка тканини легені, відібраної у голих мишей після лікування (фіг. 4)

Легені, вирізані у голих мишей, яким імплантували клітини A549 з експресуванням люциферази, обробляли різними концентраціями ерлотинібу HCl і NRC-2694, при пероральному і внутрішньочеревинному веденні, та розглядали щодо залишкових пухлин.

Спостерігали повну регресію пухлини у групі, що одержувала NRC-2694, тоді як у групі, яка одержувала ерлотинібу HCl, пухлини все ще були присутні, отже, виявлена непередбачувана і несподівана перевершуюча ефективність сполук за даним винаходом.

vi) Візуальний огляд пухлин в тканині легені (фіг. 5)

Голим мишам імплантували клітини A549 шляхом внутрішньолегеневих ін'єкцій. Пероральним і внутрішньочеревинним шляхом мишам вводили ерлотинібу HCl і NRC 2694 у дозах 2,5 і 20 мг/кг. Через 30 днів щоденного введення вказаних лікарських засобів мишей умертвляли і вирізали легені. Тканини легень поміщали у 10 % буферизований розчин формальдегіду, заливали парафіном і розтинали на секції. Секції являли собою плями H та E, передбачені документально протоколами, для візуалізації солідних або дифузійних пухлин.

Вживаність тварин в групі, яка одержувала NRC-2694, була набагато кращою, ніж в групі, яка одержувала ерлотинібу HCl, при всіх рівнях доз, таким чином, демонструючи переважну ефективність NRC-2694.

vii) Голі миші, яким імплантували клітини A549, що експресують люциферазу (фіг. 6 та 7)

Спостерігали за ростом пухлин у голих мишей, яким імплантували клітини A549, що експресують люциферазу, після перорального і внутрішньочеревинного введення різних концентрацій ерлотинібу HCl і NRC-2694. На фіг. 6 та 7 зображені результати даного спостереження. Спостерігали, що виживаність тварин в групі, яка одержувала NRC-2694, є набагато кращою, ніж в групі, яка одержувала ерлотинібу HCl. В кінці лікування NRC-2694 протягом 42 днів не спостерігали росту пухлини, тоді як залишкові пухлини все ще були присутні в групі, яка одержувала ерлотинібу HCl як пероральним, так і внутрішньочеревинним шляхом.

viii) Терапевтичний вплив, який спостерігали у голих мишей в ході дослідження *in vivo*

У табл. 3 лікувальний ефект представлений як співвідношення кількості вилікуваних тварин до кількості тварин, що приймали участь у дослідженні.

Таблиця 3

Терапевтичний вплив NRC-2694 та ерлотинібу HCl на рак легені

Лікарські засоби	Концентрація мг/кг	Співвідношення вилікування
Ерлотиніб внутрішньочеревинно	2,5	1/5
	5	2/5
	10	2/5
	20	3/5
Ерлотиніб перорально	2,5	2/5
	5	0/5
	10	1/5
	20	2/5
NRC-2694 внутрішньочеревинно	2,5	1/5
	5	1/5
	10	3/5
	20	5/5 (100 %)
NRC-2694 перорально	2,5	1/5
	5	2/5
	10	3/5
	20	3/5

Можна побачити, що співвідношення наближається до 100 % у випадку NRC-2694, тоді як у випадку групи, яка одержувала ерлотиніб HCl, співвідношення становить 40-60 %.

ix) Оцінка ED₅₀:

Значення ED₅₀ оцінювали, базуючись на вивченні зрізу легені і регресії пухлини. Для NRC-2694 обчислене значення становить 6,3 мг/кг, а значення, одержане для Ерлотинібу HCl при пероральному введенні, становило 22 мг/кг. Таким чином, встановлена перевершуюча ефективність сполуки за даним винаходом.

х) Дослідження in vitro з використанням інших рецепторів, наприклад, HER-1, HER-2, HER-3, HER-4 і VEGFR (фіг. 8)

Для визначення впливу NRC-2694 на різноманітні інші рецептори групи EGFR (Erb/HER), клітини A549 раку легені людини обробляли різними концентраціями NRC-2694 і ерлотинібу HCl як препаратом порівняння. Рівні Erb-1, Erb-2, Erb-3, Erb-4 і VEGFR визначали за допомогою Вестерн-блоттингу. Спостерігалось, що NRC-2694 ефективно знижує рівні регуляції експресії рецепторів Erb B2, Erb B3, Erb B4 і VEGFR, тоді як у випадку ерлотинібу HCl подібного явища не спостерігається. Додатковий показник інгібування у рівнях експресії вище згаданих рецепторів наочно демонструє непередбачувану і несподівану властивість головної молекули за даним винаходом viz., NRC 2694.

xi) Висновок:

В описаних вище експериментах були встановлені непередбачені, дивовижні і потужні протиракові властивості, а також додатковий терапевтичний потенціал сполуки за даним винаходом у порівнянні з ерлотинібу HCl.

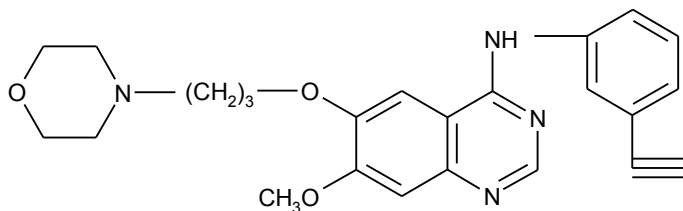
Приклад 8

Даний приклад являє собою ілюстративну характерну дозовану лікарську форму, що містить сполуку формули NRC-2694 або її фармацевтично прийнятну сіль, для терапевтичного профілактичного застосування у людини.

Таблетка	мг/таблетку
Сполука NRC-2694	50
Лактоза безводна (Фарм. США)	156
Мікрокристалічна целюлоза (Avisel pH 102)	15
Натрію лаурилсульфат	5
Натрію крохмальгліколят	10
Повідон K-30	3
Гідроксипропіл целюлоза	10
Магнію стеарат	1

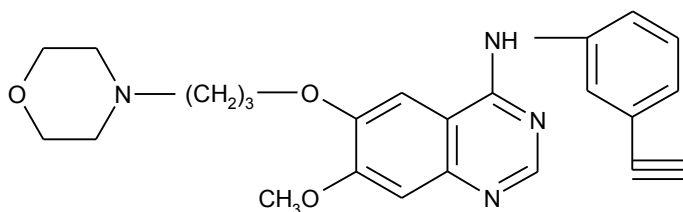
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування похідної хіназоліну, структура якої представлена формулою



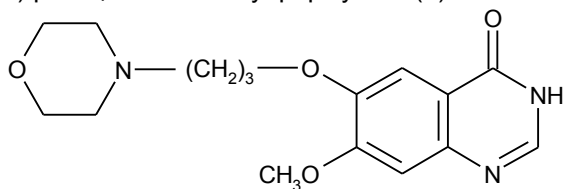
NRC-2694

- 5 або її фармацевтично прийнятної солі у виробництві медикаменту для лікування раку мозку, раку легені, плоскоклітинного раку, раку сечового міхура, раку шлунка, раку молочної залози, раку стравоходу або раку щитовидної залози.
2. Застосування за п. 1, де раком є рак легені, плоскоклітинний рак або рак молочної залози.
3. Застосування за п. 1, де раком є рак легені.
- 10 4. Застосування за п. 1, де фармацевтично прийнятна сіль являє собою моногідрохлорид (NRC-2694A).
5. Застосування за п. 1, де фармацевтично прийнятна сіль являє собою дигідрохлорид (NRC-2694B).
6. Спосіб одержання похідної хіназоліну формули NRC-2694



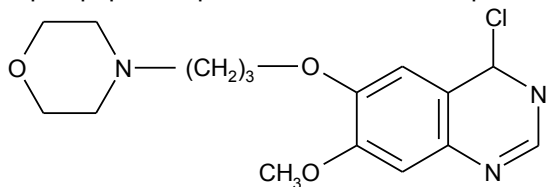
NRC-2694

- 15 або її фармацевтично прийнятної солі, в якому здійснюють:
- а) реакцію хіназоліну формули II (а)



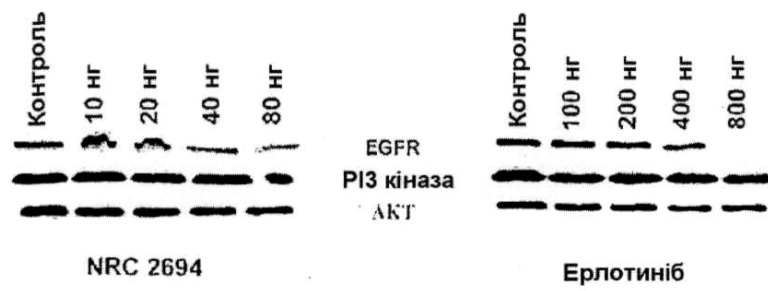
II (a)

з фосфорилхлоридом або оксалілхлоридом з одержанням 4-хлорохіназоліну формули III (а)



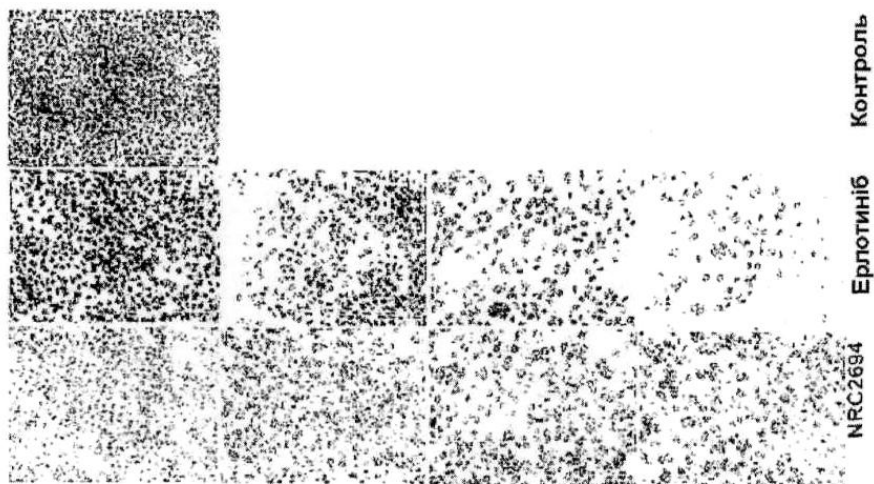
III (a)

- 20 б) реакцію конденсації 4-хлорохіназоліну формули III (а), наведеної вище, з 3-етиніланіліном з одержанням похідної хіназоліну NRC-2694.



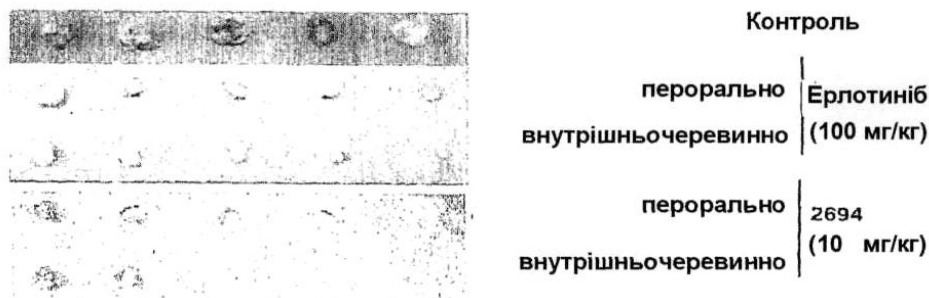
Вестерн-блоттинг клітин A549, оброблених ерлотинібом HCl та NRC-2694. Спостерігалось дозозалежне зменшення рівнів EGFR.

ФІГ. 1



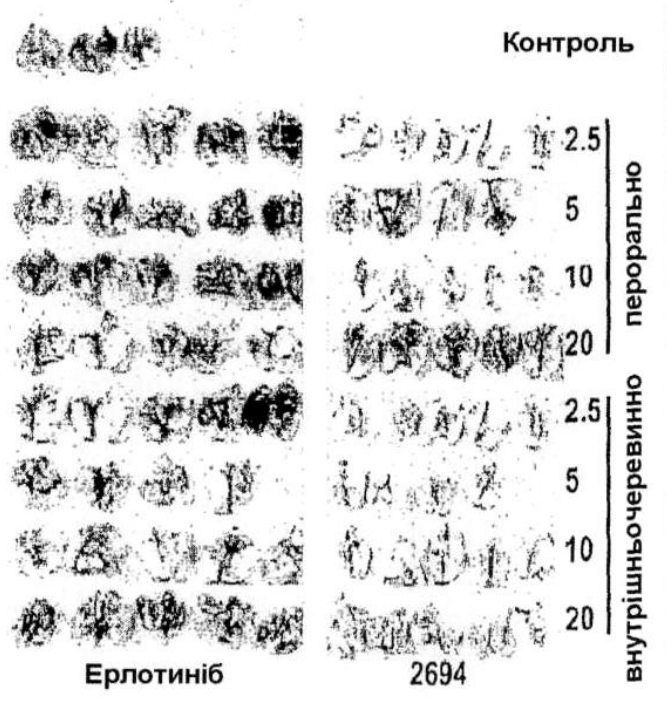
Дослідження інвазії клітин H1299 з використанням Matrigel, оброблених ерлотинібом і NRC-2694. Спостерігалось дозозалежне зменшення інвазії.

ФІГ. 2



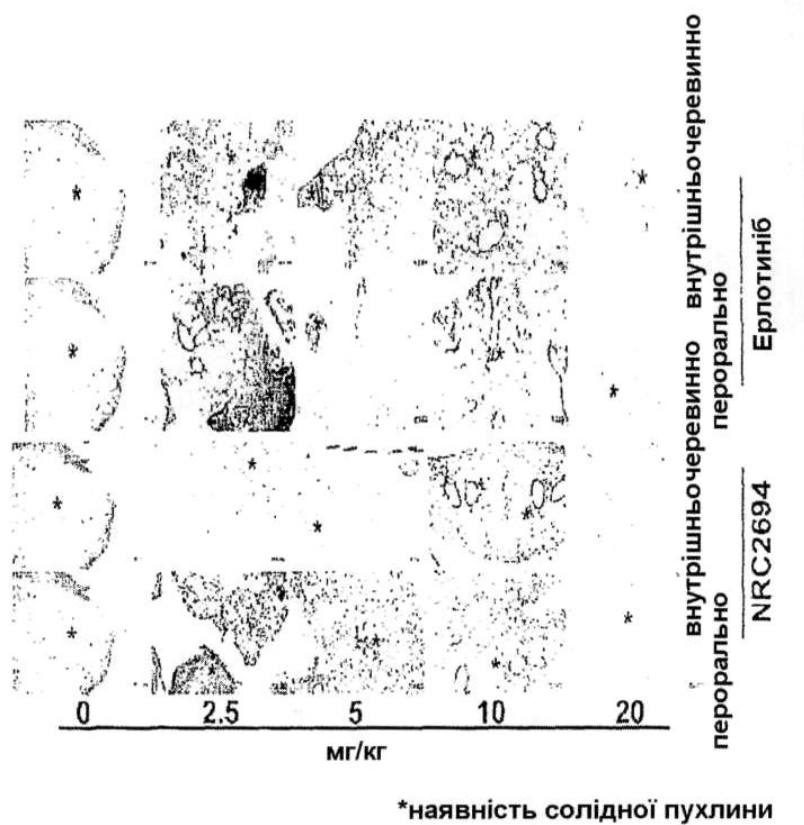
Зменшення розміру пухлини, індуковане пероральним і внутрішньочеревинним введенням ерлотинібу HCl і NRC-2694 у голих мишей, яким імплантували клітини раку легені людини A549

ФІГ. 3



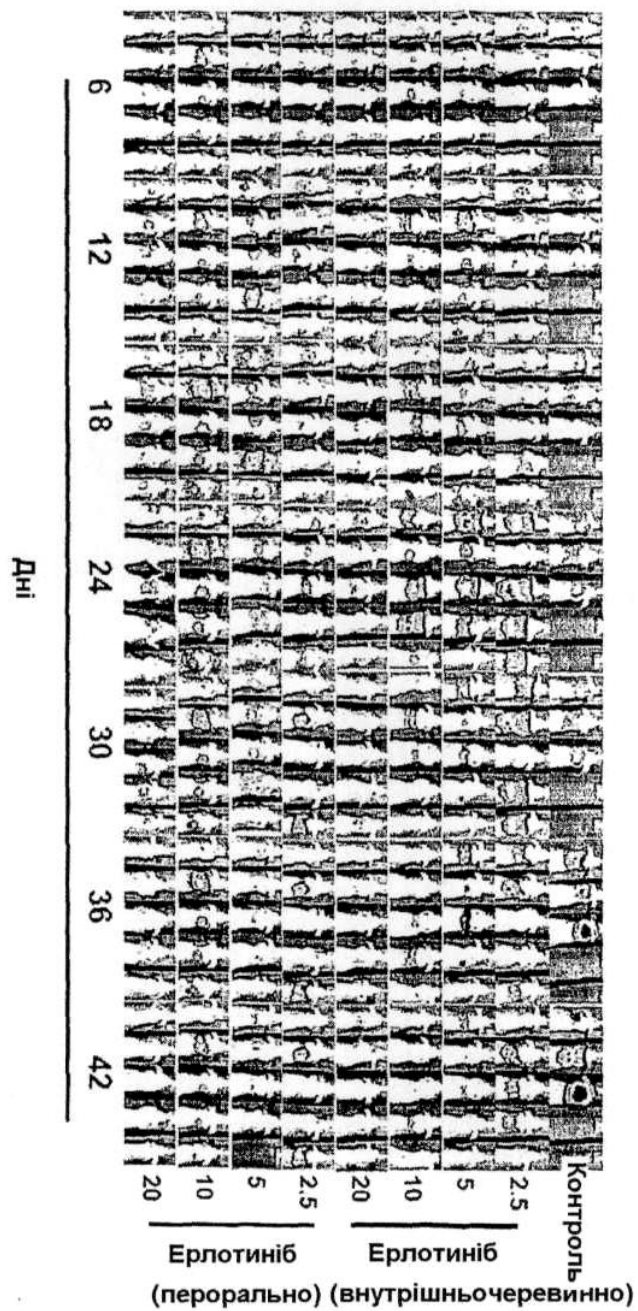
Легені, вирізані у голих мишей з клітинами A549, що експресують люциферу, які одержували різні концентрації ерлотинібу HCl і NRC-2694 (пероральне і внутрішньочеревинне введення).

ФІГ. 4



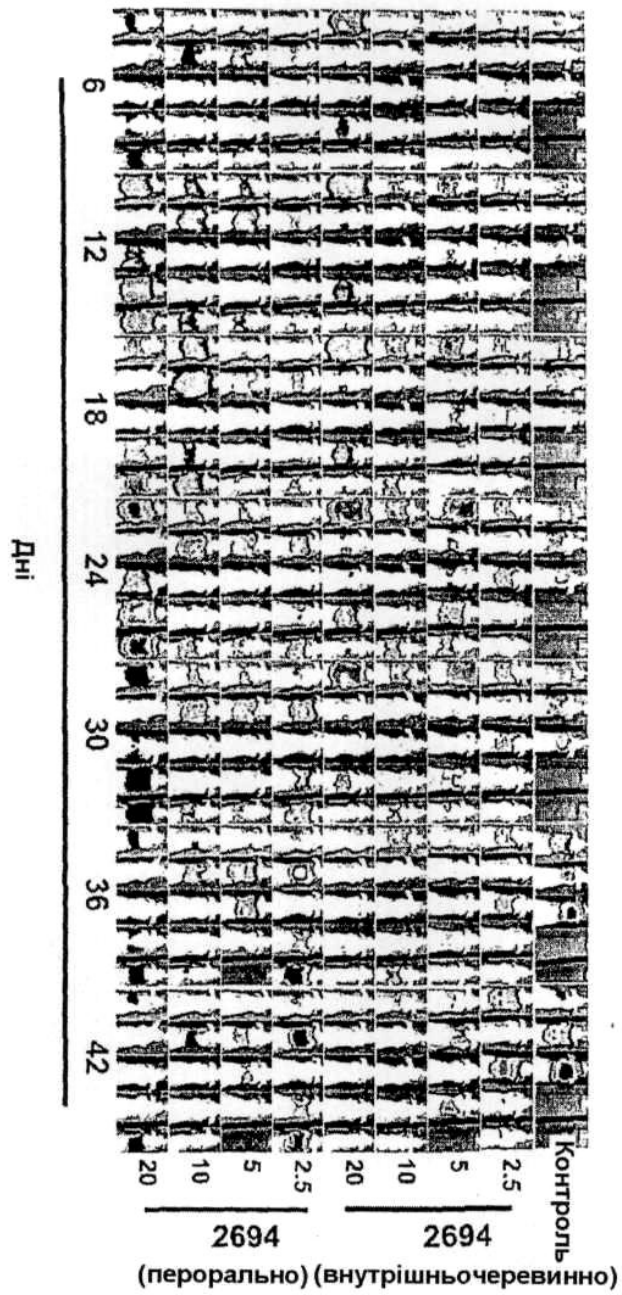
Характерні секції з плямами Н та Е легень голих мишей з пухлинами, після введення ерлотинібу HCl і NRC-2694.

ФІГ. 5



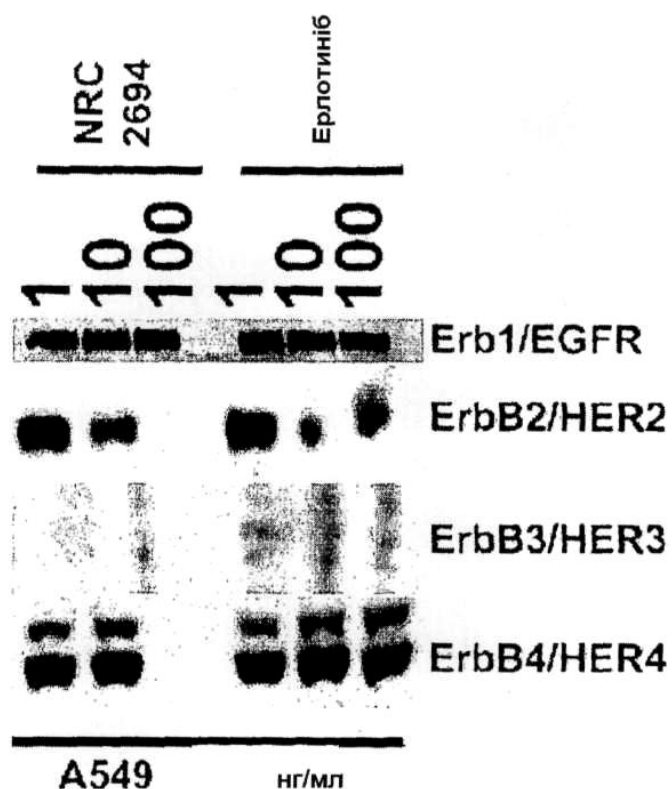
Голі миши, яким імплантували клітини A549, що експресують люциферазу, які одержували різні концентрації ерлотинібу HCl (пероральне і внутрішньочеревинне введення).

ФІГ. 6



Голі миши, яким імплантували клітини A549, що експресують люциферазу, які одержували різні концентрації NRC-2694 (пероральне і внутрішньочеревинне введення).

ФІГ. 7



Дослідження *in vitro* ефекту NRC NCT по відношенню до інших рецепторів, наприклад, HER-1,2,3,4 і VEGFR. Спостерігалось зменшення рівнів Erb-2, Erb-3 та Erb-4 у клітинах A549 після обробки NRC-2694.

ФІГ. 8

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601