



УКРАЇНА

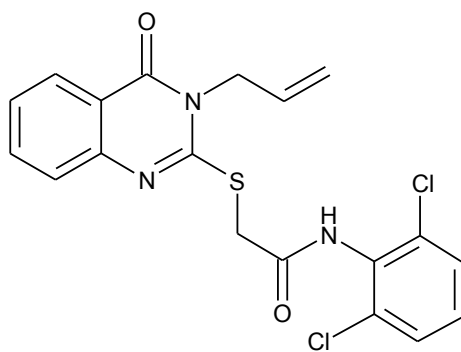
(19) **UA** (11) **111432** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)**A61K 31/517** (2006.01)**A61P 35/00****C07D 239/72** (2006.01)**C07D 243/34** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2015 00282****(22)** Дата подання заявки: **15.01.2015****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.04.2016****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **25.02.2016, Бюл.№ 4****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2016, Бюл.№ 8****(72)** Винахідник(и):**Шарикіна Надія Іванівна (UA),
Демченко Анатолій Михайлович (UA),
Бобкова Людмила Станіславівна (UA),
Мешкова Наталія Олександрівна (UA),
Кельш Ян Петрович (UA),
Міщенко Ольга Володимирівна (UA)****(73)** Власник(и):**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН
УКРАЇНИ",
вул. Ежена Потье, 14, м. Київ, 03680 (UA)****(74)** Представник:**Шаповаленко Світлана Лазарівна****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

US 4652558 A1, 27.02.1987

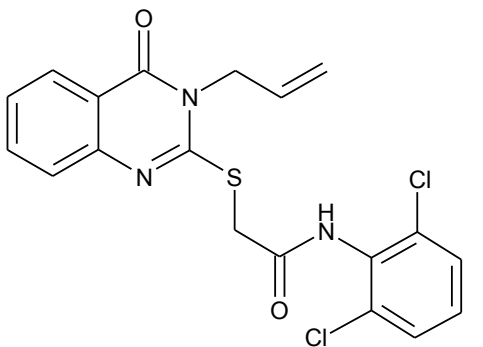
Mosmann T. Rapid colorimetric assay for
cellular growth and survival: application to
proliferation and cytotoxicity assays// Journal
of Immunological Methods.-1983. - V. 1-2, №
65. - P. 55-63БД STN (Registry / Chemcats), сполука
540771-02-6/RN, 02.06.2003БД Reaxys: PubChem CID: 4809680,
17.09.2005**(54)** **2-(3-АЛІЛ-4-ОКСО-3,4-ДИГІДРОХІНАЗОЛІН-2-ІЛ-СУЛЬФАНІЛ)-N-(2,6-ДИХЛОРФЕНІЛ)-АЦЕТАМІД,
ЩО МАЄ ПРОТИПУХЛИННУ ДІЮ****(57)** Реферат:

Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до онкофармакологічних засобів, які мають виражену протипухлинну дію при недрібноклітинному раку легенів, і стосується 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрохіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетаміду (DAM003105), що має протипухлинну активність.

UA 111432 C2



Патент на винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активної сполуки 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрохіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетаміду, сполуки, яка має формулу:



5

що проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні хворих на недрібноклітинний рак легень.

Рак легенів є однією з найбільш важливих проблем онкології як в Україні, так і в світі. Захворюваність раком легенів в Україні серед чоловіків становить 16 183 випадки на рік (20,2 % всіх злоякісних новоутворень у чоловіків), серед жінок - 3344 випадки на рік (4 % всіх злоякісних новоутворень у жінок). Крім значної захворюваності, необхідно відмітити надзвичайно високий рівень смертності від цієї форми пухлинної хвороби.

Серед захворювань на рак легенів недрібноклітинний рак становить близько 85 % пухлин цієї локалізації.

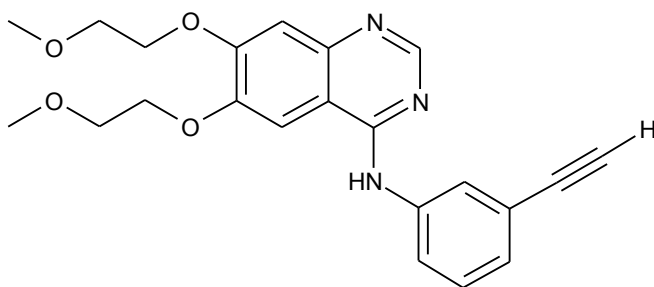
За останні 25 років прогрес ефективності лікування та підвищення виживаності хворих на недрібноклітинний рак легенів проходить дуже повільними темпами, боротьба йде не за роки життя, а за тижні. Ефективність хіміотерапії практично дійшла до свого піка.

Виникла необхідність у більш ефективних та безпечних терапевтичних стратегіях, які на сьогодні починають намічатися у вигляді таргетної терапії (спрямованої на певну ціль в пухлинних клітинах).

Для лікування хворих на недрібноклітинний рак легенів розроблений препарат Ерлотиніб (Тарцева, компанія Genentech, що входить до структури Roche Group). Препарат схвалений FDA та EMA, який зареєстровано в Україні.

Ерлотиніб - таргетний препарат, що має свою мішень - рецептор епідермального фактора росту (EGFR) [1], він взаємодіє з тирозинкіназою рецептора, її АТФ-зв'язуючим доменом. Тарцева блокує каскад реакцій щодо передачі мітогенних сигналів від клітинної поверхні до ядра. Внаслідок цього пригнічується проліферація пухлини, її ріст, інвазія, метастазування, ангіогенез, підсилюється апоптоз [1].

На сьогодні Тарцева - єдиний інгібітор EGFR, для якого підтверджено значне поліпшення виживання хворих з недрібноклітинним раком легенів.



Ерлотиніб (Тарцева)

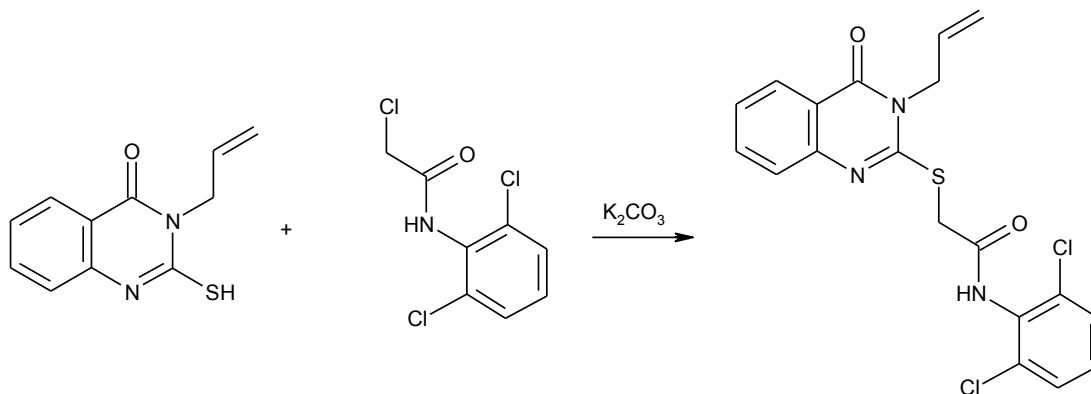
Поряд із здатністю гальмувати пухлинний ріст, Тарцева має ряд побічних ефектів, найбільш частими з яких є слабкість, погіршення апетиту, діарея, кашель, висипання, диспное [1, 2]. Значним недоліком препарату на шляху його широкого впровадження в онкологічну практику є його висока вартість.

Нами було поставлено задачу пошуку інгібіторів активності епідермального фактору росту серед похідних хіназоліну. Поставлена задача вирішувалась тим, що було синтезовано сполуку

2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід (DAM003105), у якої виявлена здатність блокувати рецептор епідермального фактора росту.

Сполуку 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід (DAM003105) одержують при конденсації 3-аліл-2-меркапто-3Н-хіназолін-4-ону [3] з 2-хлоро-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамідом [4] в лужному середовищі (схема 1).

Синтез 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід (DAM003105).



За препарат-аналог нами взятий Ерлотиніб (Тарцева). Здатність сполуки 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід (DAM003105) та Ерлотинібу (Тарцеви) інгібувати активність рецептора епідермального фактора росту прогнозували за методом докінг-аналізу [5-7]. Для визначення зв'язування рецептора епідермального фактора росту (EGFR) з інгібіторами тирозинкіназ в їх АТФ-акцепторній кишені були використані кристалічні структури макромолекул (1M 17, 2ITY, 2GS2) із бази даних білків [8]. Результати надані в табл. 1.

Таблиця 1

Результати молекулярного докінгу - енергії міжмолекулярного комплексу "EGFR-інгібітор"

| Сполука, препарат | Кристалічні макромолекули, енергія міжмолекулярного комплексу, AE | | |
|---------------------|---|--------------|--------------|
| | DeltaG_2GS2* | DeltaG_2ITY* | DeltaG_1M17* |
| DAM003105 | -22.35 | -18.03 | -21.88 |
| Ерлотиніб (Тарцева) | -27.28 | -24.65 | -39.68 |

Примітка: * ΔE (критерій значущості - ΔE>20 ккал/моль)

Результатом молекулярного докінгу були характеристики зв'язку амінокислотних залишків EGFR з фрагментом молекули інгібітора (сполуки 3105 та Ерлотинібу) за енергією міжмолекулярного комплексу "EGFR-інгібітор", обчисленою за програмою [9]. Енергія комплексу вважалась ефективною при її рівні AE >20 ккал/моль.

Одержані дані свідчать, що на зазначеному рівні чи близькому до нього знаходяться обидві речовини (сполука DAM003105 та Ерлотиніб). Це передбачає здатність сполуки DAM003105 інгібувати активність тирозинкіназ, яка не поступається такій у Ерлотинібу (Тарцеви).

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. Синтез 2-(3-аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід (DAM003105). До розчину 0.005 моля 2-меркапто-3-аліл-3Н-хіназолін-4-ону в 40 мл ацетонітрилу додавали при перемішуванні 0.015 моля прожареного поташу. Потім при перемішуванні додавали розчин 0.005 моля 2,6-дихлорфеніл-а-хлорацетаніліду в 30 мл ацетонітрилу. Реакційну суміш кип'ятили 3 години. Після охолодження до кімнатної температури суміш додавали до 200 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, сушили, кристалізували з пропанову-2. Вихід: 69 %. Т.топл.=220-221 °С. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.ч. (DMSO-d₆): 4.21 (с, 2H, CH₂), 4.82 (д, 2H, CH₂), 5.30 (м, 2H, CH₂=CH), 5.97 (м, 1H, CH=CH₂), 7.20-8.15 (м, 7H, ароматичні протони), 9.65 (с, 1H, NH). Знайдено, %: N 9.73; S 7.47. C₁₉Cl₂N₃O₂S. Вираховано, %: N 9.99; S 7.61.

Приклад 2. Цитотоксична дія сполуки DAM003105 в порівнянні з Ерлотинібом (Тарцевою) вивчена на культурі пухлинних клітин з експресованою активністю рецепторів епідермального фактора росту

Дослідження були проведені на клітинах недрібноклітинного раку легені людини A549, що культивувалися у поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂, 95 % повітря (стандартні умови).

Клітини були висіяні у 96-лунковий планшет в концентрації 2000 клітин на лунку і культивувалися за стандартних умов протягом 5 діб (до досягнення рівня конфлюентності 90 %).

Визначали цитотоксичну дію кожної з досліджуваних речовин у шести концентраціях. Для цього по 10 мг отриманих речовин розчиняли в ДМСО і вносили у відповідні лунки мікротитрувального планшета, що вже містили клітини і повне поживне середовище, до концентрації, при якій вміст розчинника не перевищував 0,5 %. Отримані розчини розтворювали двократними розведеннями і культивували протягом 24 годин.

Оцінку цитотоксичної активності речовин проводили на клітинах недрібноклітинного раку легені людини A549 в колориметричному тесті з використанням жовтого барвника (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (MTT), що в живих клітинах перетворюється на пурпурний формаза [10]. Після закінчення експозиції досліджуваних сполук з лунок видаляли культуральне середовище і вносили по 20 мкл розчину MTT із 100 мкл свіжого поживного середовища та інкубували протягом 4 годин у темряві за стандартних умов. Після цього вміст лунок видаляли і розчиняли MTT-формазанові кристали додаванням 50 мкл ДМСО у кожну лунку. Оптичну густину зафарбованих клітин вимірювали на спектрофотометрі для мікропланшет при довжині хвилі збудження 490 нм. Ступінь пригнічення росту клітин (N) вираховувався за формулою:

$$N = \left(1 - \frac{\text{Оптична густина в дослідній групі}}{\text{Оптична густина в контрольній групі}}\right) * 100\%$$

Цитотоксичну та антипроліферативну активність визначали за допомогою показника концентрації напівмаксимального інгібування (IC₅₀ - концентрація досліджуваної речовини, при якій гине 50 % клітин), що вираховувався у програмі Origin 6.1 (OriginLab Co, США).

Сполука вважається цитотоксично активною при її IC₅₀ ≤ 10⁻⁴ М (тобто, log(IC₅₀) ≤ -4) [11].

Порівняння одержаних показників показує, що активність сполуки DAM003105 подібна до такої препарату порівняння Ерлотинібу (Тарцеви), відповідно log(IC₅₀) = -4,3 у сполуки 3105 та -4,4 у Ерлотиніба (Тарцеви).

Таблиця 2

Результати цитотоксичної активності на клітинах лінії недрібноклітинного раку легені людини A549 з експресованою активністю рецепторів епідермального фактора росту

| Сполука, препарат | Концентрація напівмаксимального інгібування | |
|---------------------|---|------|
| | моль/л | log |
| DAM003105 | 5,4*10 ⁻⁵ | -4,3 |
| Ерлотиніб (Тарцева) | 3,8*10 ⁻⁵ | -4,4 |

Приклад 3. Протипухлинна активність сполуки DAM003105 in vivo в порівнянні з Ерлотинібом (Тарцевою) на саркомі 180.

Трансплантацію саркоми 180 (S 180) проводили у відповідності до вимог методичних рекомендацій та СОП відділу онкофармакології ДУ "ІФТ НАМНУ" [12, 13].

Тварини були розподілені на 2 дослідні групи (по 7 мишей у кожній) та контрольну групу (n=17). На наступну добу після трансплантації пухлин розпочинали введення досліджуваних сполук з розрахунку 100 мкг речовини на 1 мл сироватки крові тварини, що проводили кожні наступні 24 години (всього 6 введень).

Параметром ефекту слугував відсоток гальмування росту пухлин за об'ємом (об'єм вимірювали після 3 та 6 введень) в дослідних групах у порівнянні з контролем. Результати дослідження наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Протипухлинна дія на саркомі 180 (M±m)

| Сполука, препарат | Гальмування пухлинного росту за об'ємом, % (M±m) | |
|---------------------|--|-----------------|
| | Після 3 введень | Після 6 введень |
| DAM003105 | 67,00 % * | 26,33 % |
| Ерлотиніб (Тарцева) | 57,95 % * | 26,73 % |

Примітка: * - $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою тварин

Сполука DAM003105 в даному дослідженні проявила таку ж здатність пригнічувати ріст S 180, як і препарат порівняння Ерлотиніб (Тарцева). При цьому після 3-х введень обидві досліджувані речовини проявляли протипухлинну активність, вищу за критерії активності (гальмування росту пухлин ≥ 50 %).

Приклад 4. Протипухлинна дія сполуки DAM003105 in vivo в порівнянні з Ерлотинібом (Тарцевою) вивчено на епідермоїдній карциномі легені Льюїс.

Трансплантацію епідермоїдної карциноми легені Льюїс (LL) проводили у відповідності до вимог методичних рекомендацій та СОП відділу онкофармакології ДУ "ІФТ НАМНУ" [12, 13].

Введення сполуки DAM003105 та Ерлотинібу (Тарцеви) починали через 24 год. після трансплантації пухлин. Досліджуваних тварин розподіляли на 3 групи: 1 група - тварини з LL, яким вводилася сполука DAM003105 в режимі 29,93 мг/кг, 6 введень, через 24 години; 2 група - тварини з LL, яким вводився Ерлотиніб в режимі 30,61 мг/кг, 6 введень, через 24 години; 3 група - контрольна, тварини з LL, яким препарат не вводили. В дослідних групах кількість тварин становила 6, в контрольній - 14. Протипухлинну активність визначали в динаміці за відсотком гальмування пухлинного росту за об'ємом (об'єм вимірювали після 3-х та 6 введень речовин). Критерій значущості для даного штаму становить більше 50,0 %.

В дослідженнях були використані миші лінії C57Bl/6. Штам був взятий з банку штамів ДУ "ІФТ НАМНУ".

Результати дослідження надані в табл. 4.

Таблиця 4

Протипухлинна дія на епідермоїдній карциномі легені Льюїс (M±m)

| Сполука, препарат | Гальмування пухлинного росту за об'ємом, % (M±m) | | |
|----------------------------------|--|-----------------|---------------------------------------|
| | Після 3 введень | Після 6 введень | Через 3 дні після останнього введення |
| DAM003105, 29,93 мг/кг | 21,82 % | +3,49 % | 53,51 %* |
| Ерлотиніб (Тарцева), 30,61 мг/кг | 43,02 % | 71,97 %* | 25,27 % |

Примітка: * - $p < 0,001$ в порівнянні з контрольною групою тварин

Не зважаючи на те, що сполука DAM003105 не викликала значущих змін об'єму пухлин в порівнянні з контролем і уступала показникам Ерлотинібу (Тарцеви), після припинення введення цієї речовини ріст пухлин у тварин, дещо сповільнився (через 3 дні після останнього введення гальмування росту пухлин за об'ємом сягало 53,51 %, що є вищим за критерій значущості).

У тварин, яким вводилася сполука DAM003105, на відміну від Тарцеви, не спостерігалось зазначених побічних реакцій (слабкість, погіршення апетиту, діарея, кашель, висипання, диспное).

В цілому, сполука DAM003105 має виражену протипухлинну дію in vitro на культурі пухлин легені людини (A549), яка подібна до такої препарату-стандарту Тарцеви ($\log(IC_{50}) = -4,3$ та $-4,4$).

Протипухлинна дія сполуки DAM003105 вища за таку у Тарцеви in vivo на саркомі 180 (відповідно 67,00 % та 57,95 % гальмування пухлинного росту після 3-х введень сполук) та на епідермоїдній карциномі легені Льюїс (53,51 % та 25,27 % через 3 дні після припинення введення сполук відповідно).

Зазначені результати свідчать, що сполука DAM003105 має подібну протипухлинну активність до такої препарату-стандарту Тарцеви in vitro та перевищує його активність in vivo,

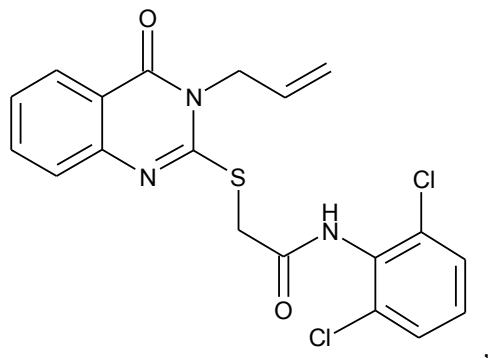
що передбачає можливість створення на основі цієї сполуки нового протипухлинного засобу, активного при недрібноклітинному раку легенів людини.

Джерела інформації:

1. Steins M., Thomas M., GeiBler M. Erlotinib.// Recent Results Cancer Res.-2014. - V. 201. - p. 109-123.
2. Schettino C, Bareschino M.A., Ricci V. Erlotinib: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer treatment.// Expert Rev. Respir. Med. - 2008. - V. 2, № 2. - P. 167-178.
3. Пат. 4652558 АІ, США, МПК А01N 55/04, С01D 239/95. 2-Thio-organotin-4(3H)-quinazolinone/ Edwards L.H. (США); Chevron Research Company (США). - № 833947; заявл. 27.02.1986, опубл. 24.03.1987.
4. Hernandez-Nunez E., Tlahuext H., Moo-Puc R., et al. Synthesis and in vitro trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles // European Journal of Medicinal Chemistry. -2009. - Vol. 44, № 7. - P. 2975-2984.
5. Meng E.C., Shoichet B.K., Kuntz I.D. Automated docking with grid-based energy evaluation// Journal of Computational Chemistry. - 2004. - V. 13, - № 4. - P. 505-524.
6. Morris R.J., Najmanovich R.J., Kahraman A., Thornton J.M. et al. Real spherical harmonic expansion coefficients as 3D shape descriptors for protein binding pocket and ligand comparisons// Bioinformatics. - 2005. - V. 21. - № 10. - P. 2347-55.
7. Dominguez C, Boelens R., Bonvin A.M.J.J. HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information// J. Am. Chem. Soc. - 2003. - V. 125. - P. 1731-1737.
8. Yun, C.H., Boggon, T.J., Li, Y., et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity// Cancer Cell. - 2007. - V. 3, - № 11. - P.217-227.
9. AUTODOCK (<http://autodock.scripps.edu>) - використовується генетичний алгоритм, ліганд гнучкий.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays// Journal of Immunological Methods.-1983. - V. 1-2, № 65. - P. 55-63.
11. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М.// Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ.- В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. - 2 изд., перераб. и доп. -М.: ОАО изд. "Медицина", 2005 г. - 832 С. - С. 637-651.
12. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США/ Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). -М.: Медицина, 1979. - 296 с.
13. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації/ За ред. О.В. Стефанова. -К.: Авіценна, 2001. - 527 с.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

2-(3-Аліл-4-оксо-3,4-дигідрокіназолін-2-іл-сульфаніл)-N-(2,6-дихлорфеніл)-ацетамід



що має протипухлинну дію.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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