

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047731

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.30

(51) Int. Cl. A61K 31/585 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202391163

(22) Дата подачи заявки
2023.04.14

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

(43) 2024.08.29

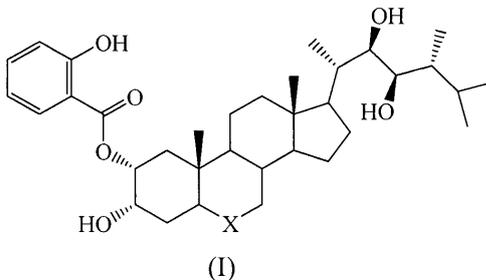
(56) JP-A-2008273866
WO-A1-2013088400
CZ-B6-302293

(96) 2023/EA/0014 (BY) 2023.04.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ" (BY)

(72) Изобретатель:
Панибрат Олеся Владимировна,
Трифонова Алина Руслановна,
Литвиновская Раиса Павловна,
Чащина Наталья Михайловна,
Жабинский Владимир Николаевич,
Хрипач Владимир Александрович
(BY)

(57) Изобретение относится к фармакологии и медицине и представляет применение производных салициловой кислоты с brassinosterоидами для получения противоопухолевого средства. Целью настоящего изобретения является расширение арсенала средств, обладающих цитостатическим действием в отношении культур опухолевых клеток при низкой концентрации полумаксимального ингибирования, хорошей растворимостью и большой степенью безопасности. Поставленная цель достигается применением салицилатов brassinosterоидов формулы (I)



где X=CO-O (Ia, салицилат 24-эпибрасинолида), X=CO (Iб, салицилат 24-эпикастастерона).

047731 B1

047731 B1

Изобретение относится к фармакологии и медицине и представляет применение производных салициловой кислоты с брассиностероидами для получения противоопухолевого средства.

Лекарственная терапия по-прежнему остается одним из основных методов лечения рака различной этиологии, однако серьезной проблемой, ограничивающей ее эффективность, является устойчивость опухолей к действию применяемых препаратов. Кроме того, большинство применяемых лекарственных средств (доксорубицин, цисплатин, этопозид) обладает высоким индексом токсичности не только по отношению к раковым, но и здоровым клеткам, применяются в высоких дозах и длительно [1-3].

К сожалению, многие лекарственные средства обладают рядом выраженных нежелательных реакций, что существенно ограничивает их активное и эффективное применение в клинической онкологии. Например, для цисплатина, несмотря на его высокую противоопухолевую активность, характерны около 40 тяжелых побочных эффектов, а именно, нефротоксичность, анафилаксия, цитопения, гепатотоксичность, ототоксичность, кардиотоксичность, тошнота, рвота, диарея, головная боль, алопеция и др. Данные реакции, как правило, требуют снижения терапевтических доз цисплатина на 25-100% [4].

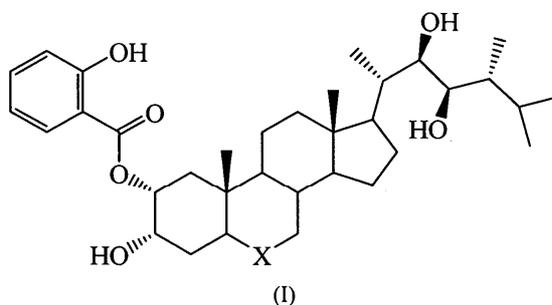
Ближайшими аналогами к заявляемым соединениям являются брассиностероиды (БС) [5]. БС относятся к группе стероидных гормонов растений, сходных по структуре со стероидными гормонами человека и животных. У растений они регулируют экспрессию генов, влияют на ход метаболических процессов, рост и дифференцировку клеток. В последние годы БС рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты [6-8]. Однако применение этих соединений может быть ограничено довольно высокой концентрацией полумаксимального ингибирования ($IC_{50} \geq 50$) [9] и низкой растворимостью в воде.

Сообщалось, что БС подавляют рост различных раковых клеточных линий на уровне мкМ, не нарушая нормальный рост клеток [10]. Также было показано, что БС и их производные проявляют полезные эффекты у лабораторных животных и млекопитающих, а именно, нейропротекторные, противовирусные, анаболические, адаптогенные, иммуностимулирующие, противовоспалительные и ранозаживляющие [11].

Известны производные салициловой кислоты с брассиностероидами [12]. Однако их противоопухолевая активность не описана.

Целью настоящего изобретения является расширение арсенала средств, обладающих цитостатическим действием в отношении культур опухолевых клеток при низкой концентрации полумаксимального ингибирования, хорошей растворимостью и большой степенью безопасности.

Поставленная цель достигается применением салицилатов брассиностероидов формулы I



где X = CO-O (Ia, салицилат 24-эпибрассинолида),

X = CO (Iб, салицилат 24-эпикастестерона)

для получения противоопухолевого средства.

Указанные соединения обладают повышенной цитостатической активностью в отношении культур опухолевых клеток при обработке клеток определенной линии (K562, HL-60, A549, MCF-7, Сасо-2) тестируемыми веществами в концентрациях 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 мкМ. Моноэфиры брассиностероидов с салициловой кислотой ингибировали рост всех клеточных линий при низких значениях IC_{50} (< 10 мкМ), равных или ниже, чем значения IC_{50} , широко применяющихся универсальных химиотерапевтиков доксорубицина, цисплатина, этопозиды [13-17]. Кроме того, заявляемые соединения представляют собой сложные эфиры салициловой кислоты с брассиностероидами и обладают лучшей растворимостью в воде и физиологических растворах. Указанные соединения получают химической модификацией природных брассиностероидов 24-эпибрассинолида или 24-эпикастестерона реакцией последних с ангидридом 2-О-бензилсалициловой кислоты с последующим гидрогенолизом О-бензильных групп [12].

Обнаруженное свойство заявляемых соединений понижать концентрацию полумаксимального ингибирования может быть использовано для получения противоопухолевого лекарственного средства. Применение этих соединений позволит расширить арсенал средств для лечения онкологических заболеваний.

Сущность изобретения подтверждается примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Ингибирование роста опухолевых клеток различных клеточных линий.

Соединения тестировали в концентрациях 0.1, 1.0, 10.0 и 50.0 мкМ.

Исследовались клетки следующих опухолевых линий А549 (карцинома легких), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Сасо-2 (рак ободочной кишки), К562 (хронический миелогенный лейкоз), HL-60 (острый миелоцитарный лейкоз) полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН.

Для анализа использовали резазуриновый тест [18]. Принцип данного метода основан на способности митохондрий живых клеток в процессе аэробного дыхания восстанавливать соединение резазурина до резорурфина, способного флуоресцировать. Количество образуемого резорурфина в клетках прямо пропорционально имеющемуся количеству живых клеток.

Клетки сажали в 96-луночный планшет в концентрации 10^4 клеток/луноку (К562, HL-60) в 100 мкл среды RPMI-1640 и добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. Клетки линий А549, MCF-7, Сасо-2 сажали $5 \cdot 10^3$ клеток/луноку в 100 мкл среды DMEM и инкубировали при 37°C в течение суток. Затем добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. Исходная концентрация соединений составляла 20 мМ в ДМСО. В контроль добавляли 0,25% ДМСО. Соединения разводили до конечных концентраций последовательно инкубационной средой. После 72 ч культивирования клеток с исследуемыми соединениями в стандартных условиях в каждую луноку 96-луночного планшета добавляли 20 мкл резазурина в концентрации 250 мкМ. Через 3 ч экспозиции при 37°C и 5% CO₂ клетки восстанавливали синий резазурин до розового резорурфина. Количество восстановленного продукта измеряли по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200. Жизнеспособность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \frac{\text{ФЛ опытных лунок} - \text{Фон}}{\text{ФЛ контрольных лунок} - \text{Фон}} \times 100 \%,$$

где ФЛ - флуоресценция.

Концентрация препарата, которая вызывает 50% ингибирование жизнеспособности клеток (IC₅₀), была рассчитана графически по дозозависимой кривой в программе MS Excel.

Все эксперименты были проведены в трех повторах, достоверность $p < 0.05$. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

IC ₅₀ исследуемых соединений в отношении жизнеспособности опухолевых клеток					
Клеточная линия	А549	MCF-7	Сасо-2	К562	HL-60
Соединение					
24-Эпибрассинолид	>50	>50	>50	>50	>50
24-Эпикастастерон	>50	>50	>50	>50	>50
Салицилат 24-эпибрассинолида (Ia)	3,82±0,31	3,06 ± 0,28	3,62±0,25	7,21±1,03	4,76±0,24
Салицилат 24-эпикастастерона (Iб)	4,03±0,52	3,04 ± 0,49	3,40±0,64	8,29±0,89	4,70±0,45
Салициловая к-та	>50	>50	>50	>50	>50
Смесь ЭБ+салициловая к-та (1 моль:1 моль)	>50	>50	-	-	-

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что только моноэфиры брассиностероидов с салициловой кислотой ингибировали рост всех клеточных линий при низких значениях IC₅₀ (<10 мкМ), близких или ниже, чем значения IC₅₀, широко применяющихся универсальных химиотерапевтиков доксорубинина, цисплатина, этопозида [1-3], а также соединений-прототипов 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона. Важно отметить, что механическая смесь соединений, структурно входящих в заявляемые соединения также имеет высокий индекс IC₅₀ (>50 мкМ). Значения IC₅₀ салицилатов 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона не различались между собой, а также не наблюдалось значимых различий в подавлении роста опухолевых клеток, выделенных из разных типов опухолей. Единственной линией, которая оказалась более устойчивой к действию заявляемых соединений были клетки хронического лейкоза К562, что, возможно, связано с наличием у них повышенной экспрессии гена BCR/ABL, обуславливающей их устойчивость к апоптозу [19].

Пример 2. Определение клеточного цикла.

Эксперимент по установлению влияния заявляемых соединений на клеточный цикл проведен на клеточной линии MCF-7. Клетки линии MCF-7 сажали в количестве 300 тыс. в луноку 6-луночного планшета. Через 24 ч в питательную среду добавляли салицилаты БС в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. Затем клетки снимали трипсином, отмывали фосфатным буфером с pH=7,4 и фиксировали охлажденным до -20°C 70% этанолом. После 24 ч фиксации при -20°C клетки отмывали калий-фосфатным буфером, pH=7.4 от этанола, затем добавляли РНКазу 100 мкг/мл и окрашивали 50 мкг/мл

иодида пропидия в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре [20]. Измерение проводили с помощью проточного цитометра Beckman Coulter FC500. Для анализа данных использовали программное обеспечение Kaluza 2.0 Software. Полученные данные приведены на фиг. 1.

Таким образом, в эксперименте по определению влияния салицилатов (Ia и Ib) на клеточный цикл линии MCF-7 было установлено, что оба соединения ингибируют его в фазе S (синтетическая фаза клеточного цикла, в которой происходит удвоение ДНК) и вызывают накопление клеток в G0/G1 фазе, тем самым останавливая удвоение ДНК и деление клеток.

Пример 3. Определение митохондриального потенциала клеток.

Клетки MCF-7 сажали в 96-луночный планшет в количестве $5 \cdot 10^3$ клеток/100 мкл среды DMEM на одну лунку и инкубировали при 37°C в течение суток. Затем добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. Исходная концентрация соединений составляла 20 мМ в ДМСО. В контроль добавляли 0,25% ДМСО. Соединения разводили до конечных концентраций последовательно инкубационной средой. После 24 и 48 ч культивирования клеток с исследуемыми соединениями в стандартных условиях инкубационную среду удаляли, промывали клетки калий-фосфатным буфером и затем в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 100 мкл раствора 3,3'-дигексилосакарбоцианин йодида ($\text{DiOC}_6(3)$) в концентрации 0,5 мкМ [21]. Через 30 мин экспозиции при 37°C и 5% CO_2 измеряли флуоресценцию связанного с митохондриальной мембраной $\text{DiOC}_6(3)$ при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 515 нм на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200. Полученные результаты приведены на фиг. 2.

Из приведенных данных следует, что под действием заявляемых соединений наблюдается дозозависимое ингибирование клеточного дыхания, что было выявлено с помощью положительно заряженной флуоресцентной метки $\text{DiOC}_6(3)$ способной в низких концентрациях специфически связываться с отрицательно заряженной мембраной митохондрий. Чем выше концентрация действующих соединений и время воздействия, тем выше ингибирующий эффект. На фиг. 2 видно, что уже через 48 ч при воздействии 10 мкМ концентрации исследуемых соединений наступает практически полное ингибирование митохондриального потенциала клеток MCF-7, что коррелирует с данными по ингибированию их жизнеспособности.

Пример 4. Характеристика антипролиферативной активности цисплатина в сравнении с салицилатами брассиностероидов.

Клетки сажали в 96-луночный планшет в концентрации $5 \cdot 10^3$ клеток/лунку (MCF-7) в 100 мкл питательной среды DMEM и инкубировали при 37°C в течение суток. Затем добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. Исходная концентрация соединений составляла 20 мМ в ДМСО. Цисплатин растворяли в растворе NaCl 0,9%. В контроль добавляли 0,25% ДМСО. Соединения разводили до конечных концентраций последовательно инкубационной средой. После 72 ч культивирования клеток с исследуемыми соединениями в стандартных условиях в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 20 мкл резазурина в концентрации 250 мкМ. Через 3 ч экспозиции при 37°C и 5% CO_2 клетки восстанавливали синий резазурин до розового резорурфина. Количество восстановленного продукта измеряли по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200.

Жизнеспособность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали как в примере 1.

Все эксперименты проводили в трех повторах, достоверность $p < 0,05$.

Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Полученные результаты представлены на фиг. 3.

В качестве экспериментальной модели мы использовали клетки карциномы молочной железы линии MCF-7. IC_{50} цисплатина для MCF-7 составила $22,08 \pm 1,07$ мкМ, что совпадает с данными, полученными в других лабораториях [22].

Сравнивая данные, полученные в опытах с цисплатином и с салицилатами БС (фиг. 3) на клетках линии MCF-7, можно сделать вывод, что концентрация полумаксимального ингибирования для заявляемых соединений значительно ниже ($\text{IC}_{50} \geq 3,06$ и $3,28$ мкМ), чем у применяемого в медицине цитостатика цисплатин ($\text{IC}_{50} \geq 22,08$ мкМ).

Таким образом, эфиры салициловой кислоты с 24-эпибрассинолидом и 24-эпикастастероном эффективно ингибируют рост опухолевых клеток. Такой результат очевидно связан с особенностями структуры изучаемых соединений, обеспечивающей значение IC_{50} эфиров 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона с салициловой кислотой в 10 раз меньше, чем IC_{50} исходных природных брассиностероидов. Полученные данные указывают на то, что механизм их действия связан с цитостатическим эффектом, поскольку оба соединения останавливают клеточный цикл, ингибируют клеточное дыхание и вызывают апоптоз опухолевых клеток. Также необходимо отметить, что эффекты исследуемых соединений, в отличие от исходных брассиностероидов, более эффективно подавляющих рост гормонзависимых линий (например, MCF-7) [9], носят универсальный характер.

Вышеописанные свойства соединений Ia и Ib позволяют расширить арсенал средств, обладающих широким спектром противоопухолевого действия в отношении ряда клеточных культур.

Список использованной литературы

1. Lin S.R., Lin C.S., Chen C.C., Tseng F.J., Wu T.J., Weng L., Weng C.F. // *Mol. Cell Biochem.* 2020. V.475, №1. P.119-126.
2. Lieberthal W., Triaca V., Levine J. // *Am. J. Physiol. (Renal Physiol).* 1996. V.39. P.F700–F708.
3. Davou G.I., Chuwang N.J., Essien U.C., Choji T.P.P., Echeonwu B.C. and Lugos M.D. // *IRJMMS.* 2019. V. 7, № 2. P. 40-47.
4. Oun R., Moussa Y. E., Wheate N.J. // *Dalton Trans.* 2018. V.47, № 19. P.6645-6653.
5. Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot Ae. *Brassinosteroids – A New Class of Plant Hormones.* San Diego: Acad. Press. 1999, 456 p.
6. Lijian X., Qiyuan C. New use of brassinolide in reversing multiple medicine resistance of tumour cell. Pat. CN1491653 // 2004.
7. Ogawa K., Nakano Y., Seto H., Asami T., Tsujimoto M. *Brassinosteroids as antitumor agents and health foods.* Pat. JP 2008273866 // 2007.
8. Oklestkova J, Hoffmannová L, Steigerová J, Kohout L, Kolar Z, Strnad M. Natural brassinosteroids for use for treating hyperproliferation, treating proliferative diseases and reducing adverse effects of steroid dysfunction in mammals, pharmaceutical composition and its use. Pat. CZ WO2009/024103 // 2007.
9. Malikova J., Swaczynova J., Kolar Z., Strnad M. // *Phytochemistry.* 2008. V. 69, № 2. P.418-426.
10. Oklestkova J., Hoffmannova L., Steigerova J., Kohout L., Kolar Z., Strnad M. *Natural Brassinosteroids for Use for Treating Hyperproliferation, Treating Proliferative Diseases and Reducing Adverse Effects of Steroid Dysfunction in Mammals, Pharmaceutical Composition and Its Use.* Pat. US20100204460A1 // 2008.
11. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. // *Steroids.* 2015. V. 97. P.87-97.
12. Литвиновская Р.П., Вайнер А.А., Жилицкая Г.А., Колупаев Ю.Е., Савочка О.П., Хрипач В.А. // *Химия природн. соед.* 2016. № 3. С.394-398.
13. Nurcahyanti A.Dr., Wink M. // *PeerJ.* 2016. V.4, № 30. P.e1542.
14. Baharuddin P., Satar N., Fakiruddin K.S., Zakaria N., Lim M.N., Yusoff N.M., Zakaria Z., Yahaya B.H. // *Oncol. Rep.* 2016. V. 35, № 1. P.13-25.

15. Tardito S., Isella C., Medico E., Marchiò L., Bevilacqua E., Hatzoglou M., Bussolati O., Franchi-Gazzola R. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284, № 36. P.24306-24319.

16. Bourzikat O., El Abbouchi A., Ghammaz H., El Brahmī N., El Fahime E., Paris A., Daniellou R., Suzenet F., Guillaumet G., El Kazzouli S. // *Molecules.* 2022. V.27, № 16. P.5238.

17. Hillemeier L., Espinoza-Sánchez N.A., Greve B., Hassan N., Chelariu-Raicu A., Kiesel L., Götte M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23, № 10. P.5793.

18. Al-Nasiry S., Geusens N., Hanssens M., Luyten C., Pijnenborg R. // *Hum. Reprod.* 2007. V.22, №5. P.1304-1309.

19. McGahon A.J., Brown D.G., Martin S.J., Amarante-Mendes G.P., Cotter T.G., Cohen G.M., Green D.R. // *Cell Death Differ.* 1997. V.4, №2. P.95-104.

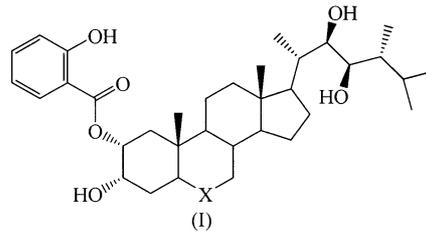
20. Riccardi C., Nicoletti I. // *Nat. Protoc.* 2006. V.1. P.1458-1461.

21. Witte I., Horke S. // *Methods in Enzymology.* V.489, Ch.8. 2011. P.127-146.

22. Ciftci H., Sever B., Bayrak N., Yıldız M., Yıldırım H., Tateishi H., Otsuka M., Fujita M., TuYuN A.F. // *Pharmaceuticals.* 2022. V.15. P.1266.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение эфиров brassinosterоидов с салициловой кислотой формулы (I)

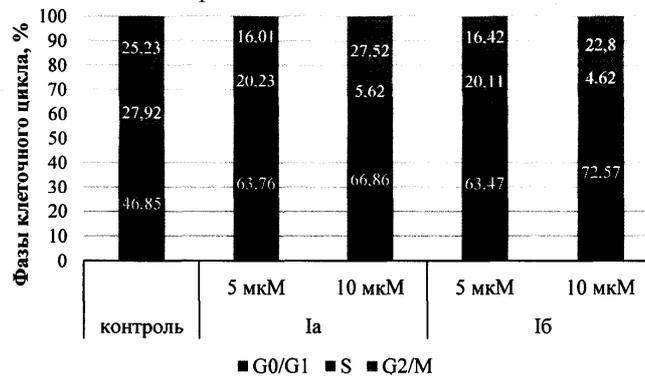


где X=CO-O (Ia, салицилат 24-эпибрассинолида),

X=CO (Iб, салицилат 24-эпикастастерона)

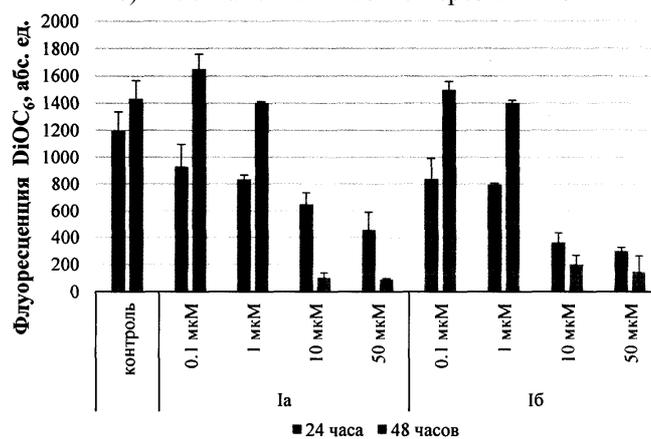
для получения противоопухолевого лекарственного средства.

Распределение клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла под действием салицилатов БС (Ia и Iб)



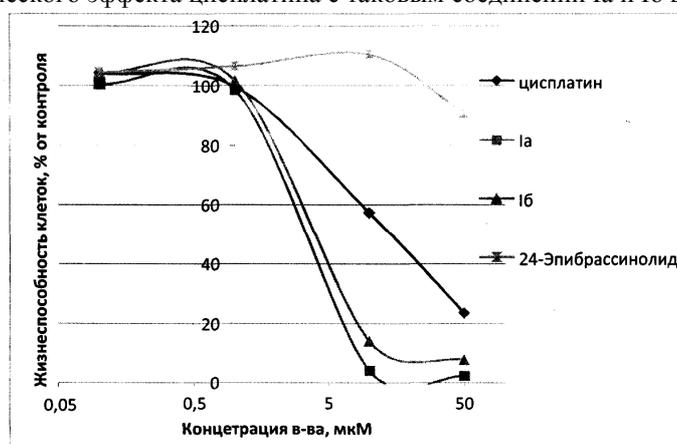
Фиг. 1

Изменение потенциала митохондриальной мембраны под действием салицилатов брассиностероидов (Ia и Ib) в клетках линии MCF-7 через 24 и 48 ч



Фиг. 2

Сравнение цитостатического эффекта цисплатина с таковым соединений Ia и Ib в клетках линии MCF-7



Фиг. 3

