

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391163 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.29

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

(22) Дата подачи заявки  
2023.04.14

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

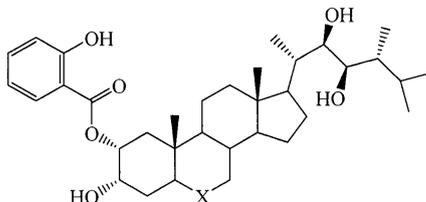
(96) 2023/EA/0014 (BY) 2023.04.14

(72) Изобретатель:

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

Панибрат Олеся Владимировна,  
Трифоновская 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 брассиностеороидами 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 брассиностеороидов формулы (I)



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

A1

202391163

202391163

A1

## Противоопухолевое средство

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

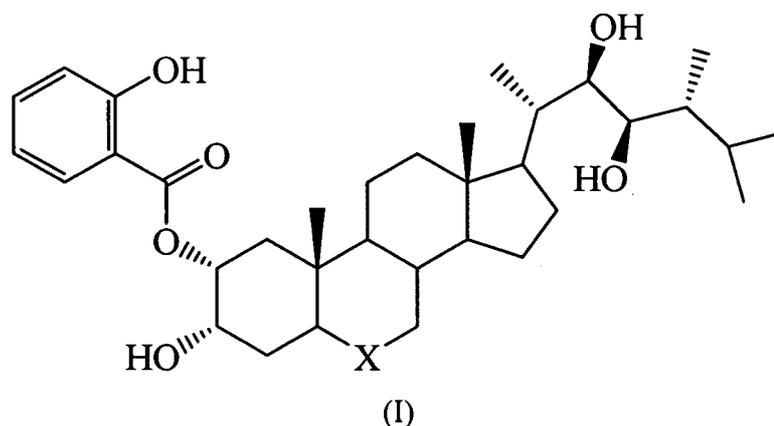
высокой концентрацией полумаксимального ингибирования ( $IC_{50} \geq 50$ ) [9] и низкой растворимостью в воде.

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-эпикастастерона)

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, этопозида [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-эпикастастерона 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), МСF-7 (аденокарцинома молочной железы), Сасо-2 (рак ободочной кишки), К562 (хронический миелогенный лейкоз), НL-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/лунку (K562, HL-60) в 100 мкл среды RPMI-1640 и добавляли тестируемые вещества в концентрациях 0,1, 1, 10, 50 мкМ. Клетки линий A549, MCF-7, Сасо-2 сажали  $5 \cdot 10^3$  клеток/лунку в 100 мкл среды DMEM и инкубировали при 37 °С 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 лунку 96-луночного планшета добавляли 20 мкл резазурина в концентрации 250 мкМ. Через 3 ч экспозиции при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> 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:

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

где ФЛ — флуоресценция.

Концентрация препарата, которая вызывает 50 % ингибирование жизнеспособности клеток (IC<sub>50</sub>), 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 таблице 1.

Таблица 1 – IC<sub>50</sub> исследуемых соединений в отношении жизнеспособности опухолевых клеток

Клеточная линия \ Соединение	A549	MCF-7	Caco-2	K562	HL-60
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 таблице 1, показывают, что только моноэфиры брассиностероидов с салициловой кислотой ингибировали рост всех клеточных линий при низких значениях IC<sub>50</sub> (<10 мкМ), близких или ниже, чем значения IC<sub>50</sub>, широко применяющихся универсальных химиотерапевтиков доксорубидина, цисплатина, этопозиды [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 IC<sub>50</sub> (>50 мкМ). Значения IC<sub>50</sub> 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 K562, 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 лунку 6-луночного планшета. Через 24 часа в питательную среду добавляли салицилаты БС в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ и инкубировали в течение 24 часов. Затем клетки снимали трипсином, отмывали фосфатным буфером с рН=7,4 и фиксировали охлажденным до -20 °С 70 % этанолом. После 24 часов фиксации при -20 °С клетки отмывали калий-фосфатным буфером, рН=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 рисунке 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 °С 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 °С и 5 %  $\text{CO}_2$  измеряли флуоресценцию связанного с митохондриальной

мембраной DiOC<sub>6</sub>(3) при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 515 нм на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200. Полученные результаты приведены на рисунке 2.

Из приведенных данных следует, что под действием заявляемых соединений наблюдается дозозависимое ингибирование клеточного дыхания, что было выявлено с помощью положительно заряженной флуоресцентной метки DiOC<sub>6</sub>(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 рисунке 2 видно, что уже через 48 часов 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 °С 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 °С и 5 % CO<sub>2</sub> 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 рисунке 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 (рисунок 3) на клетках линии MCF-7, можно сделать вывод, что концентрация полумаксимального ингибирования для заявляемых соединений значительно ниже ( $IC_{50} \geq 3,06$  и  $3,28$  мкМ), чем у применяемого в медицине цитостатика цисплатин ( $IC_{50} \geq 22,08$  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 brassinosteroidов. 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 brassinosteroidов, 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.

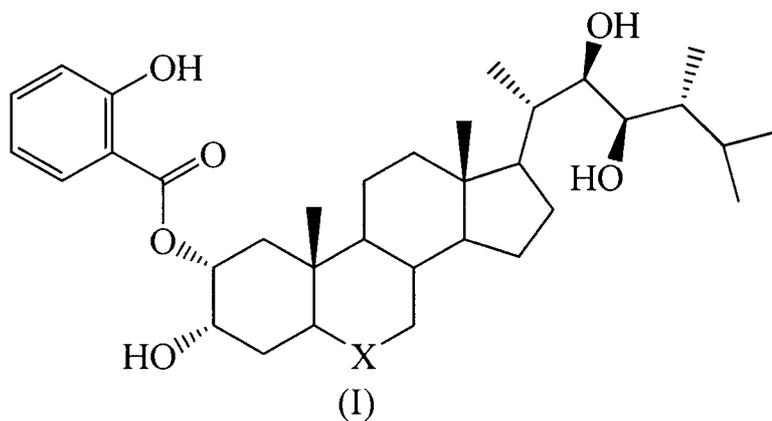
### Список использованной литературы

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 Brahmi 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.

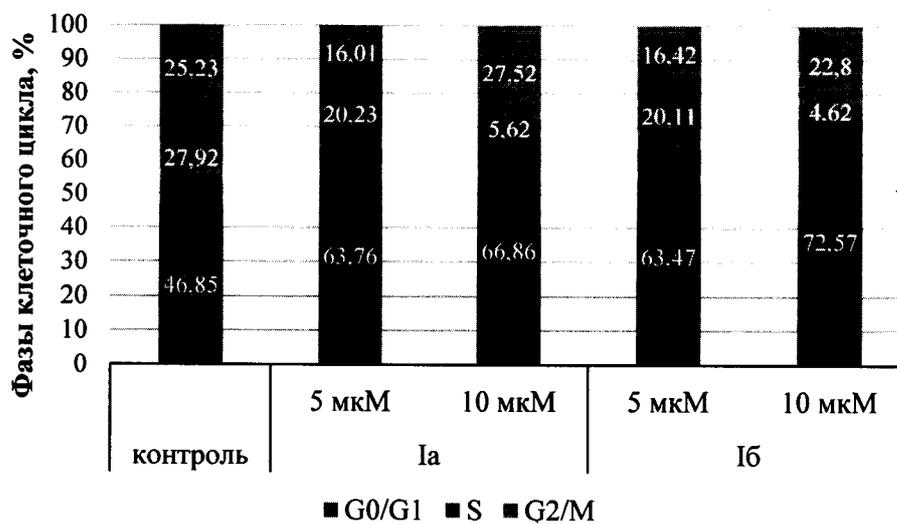


Рисунок 1 – Распределение клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла под действием салицилатов БС (Ia и Iб)

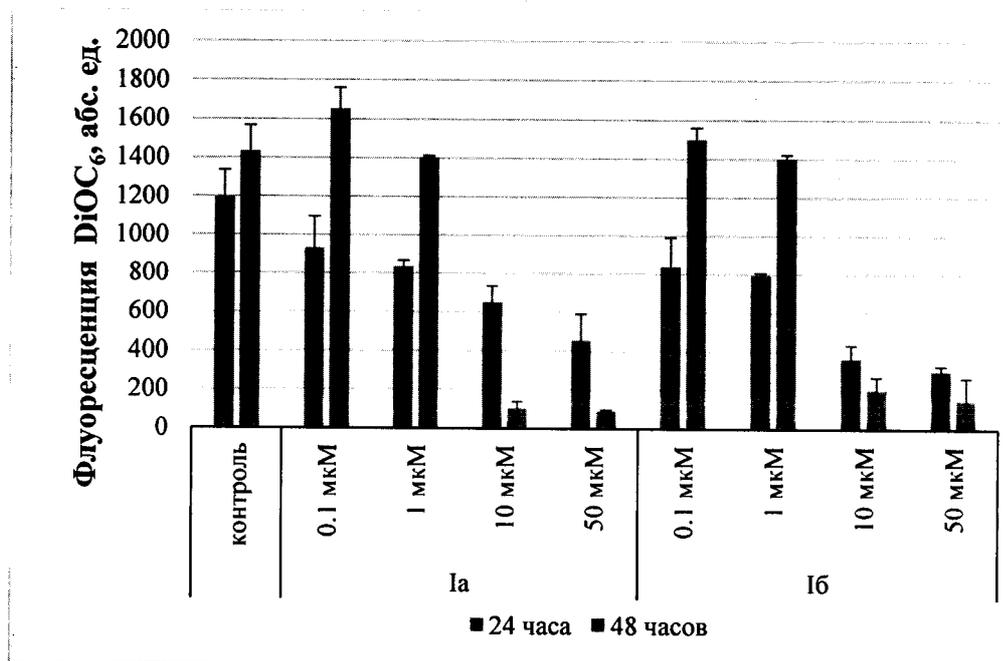


Рисунок 2 – Изменение потенциала митохондриальной мембраны под действием салицилатов brassinостероидов (Ia и Ib) в клетках линии MCF-7 через 24 и 48 часов

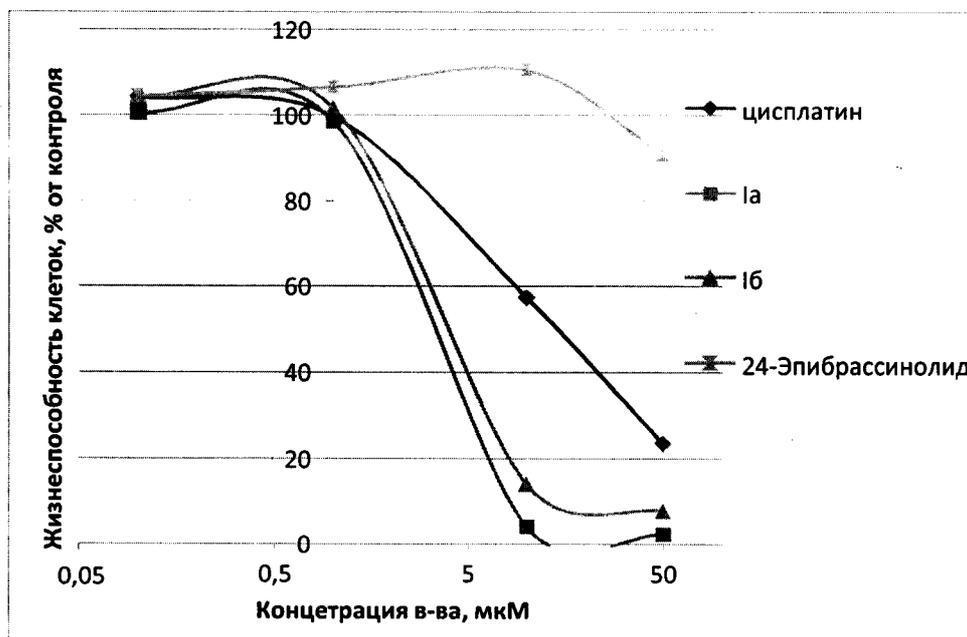


Рисунок 3 – Сравнение цитостатического эффекта цисплатина с таковым соединений Ia и Ib в клетках линии MCF-7

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202391163****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***A61K 31/585 (2006.01)**A61P 35/00 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 31/585, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	JP 2008273866 A (INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH) 13.11.2008	1
A	WO 2013/088400 A1 (CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) et al.) 20.06.2013	1
A	CZ 302293 B6 (USTAV ORGANICKE CHEMIE A BIOCHEMIE AKADEMIE VED CR, V.V.I.) 09.02.2011	1

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

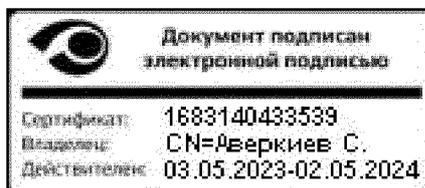
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 14 сентября 2023 (14.09.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев