



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014140819/15, 09.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.10.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.10.2014

(45) Опубликовано: 20.01.2016 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Татарский В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолакарбазолов. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. ст. канд. биологич. наук. Москва. 2010. UA 103911, 10.12.2013. Schwandt A, Mekhail T, Halmos B, O'Brien T, Ma PC, Fu P, Ivy P, Dowlati A. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and (см. прод.)

Адрес для переписки:

115478, Москва, Каширское ш., 24, ФГБУ
"Российский онкологический научный центр
имени Н.Н. Блохина" Российской академии
медицинских наук, патентно-лицензионное
отделение

(72) Автор(ы):

Ланцова Анна Владимировна (RU),
Оборогова Наталия Александровна (RU),
Орлова Ольга Львовна (RU),
Полозкова Алевтина Павловна (RU),
Шпрах Зоя Сергеевна (RU),
Санарова Екатерина Викторовна (RU),
Смирнова Зоя Сергеевна (RU),
Киселева Марина Петровна (RU),
Борисова Лариса Михайловна (RU),
Игнатьева Елена Владимировна (RU),
Гулякин Илья Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Российский онкологический
научный центр имени Н.Н. Блохина"
Российской академии медицинских наук
(ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина" РАМН)
(RU)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к средствам, обладающим противоопухолевым действием. Предложено новое противоопухолевое средство, содержащее 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индола[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион, диметилсульфоксид и поливинилпирролидон и при следующих соотношениях компонентов (мг):

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индола[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион	8,1-9,9
диметилсульфоксид	95,0-125,0
поливинилпирролидон	540,0-660,0

Созданное новое противоопухолевое средство из группы производных индолакарбазолов позволяет расширить спектр противоопухолевых препаратов. 3 пр., 2 табл.

(56) (продолжение):

-II inhibitor, in relapsed "sensitive" small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012 Apr; 7(4):751-4.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 572 691** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 31/7056 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014140819/15, 09.10.2014

(24) Effective date for property rights:
09.10.2014

Priority:

(22) Date of filing: 09.10.2014

(45) Date of publication: 20.01.2016 Bull. № 2

Mail address:

115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, FGBU
"Rossijskij onkologicheskij nauchnyj tsentr imeni
N.N. Blokhina" Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk, patentno-litsenzionnoe otdelenie

(72) Inventor(s):

Lantsova Anna Vladimirovna (RU),
Oborotova Natalija Aleksandrovna (RU),
Orlova Ol'ga L'vovna (RU),
Polozkova Alevtina Pavlovna (RU),
Shprakh Zoja Sergeevna (RU),
Sanarova Ekaterina Viktorovna (RU),
Smirnova Zoja Sergeevna (RU),
Kiseleva Marina Petrovna (RU),
Borisova Larisa Mikhajlovna (RU),
Ignat'eva Elena Vladimirovna (RU),
Guljakin Il'ja Dmitrievich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Rossijskij onkologicheskij
nauchnyj tsentr imeni N.N. Blokhina" Rossijskoj
akademii meditsinskikh nauk (FGBU "RONTs
im. N.N. Blokhina" RAMN) (RU)

(54) ANTITUMOUR AGENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is presented is a new
antitumour agent containing 6-amino-12-(α -L-
arabinopyranosyl)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-
5,7-dione, dimethylsulphoxide and polyvinyl
pyrrolidone in the following ratio (mg): 6-amino-12-
(α -L-arabinopyranosyl)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]

carbazole-5,7-dione 8.1-9.9, dimethylsulphoxide 95.0-
125.0, polyvinyl pyrrolidone 540.0-660.0.

EFFECT: new antitumour agent from the group of
indolocarbazole derivatives allows extending the range
of antitumour preparations.

3 ex, 2 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно к средствам, обладающим противоопухолевым действием.

Среди соединений, способных ингибировать ферменты ДНК-топоизомеразы, отвечающие за суперспирализацию ДНК и участвующие в процессе репликации и транскрипции, известны вещества различных химических групп. Особый интерес среди этих веществ представляют производные индолокарбазолов [Татарский В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолокарбазолов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени ст. канд. биологических наук. Москва. 2010].

Известно средство из этой группы соединений бекатекарин, которое ингибирует топоизомеразы I и II и применяется в качестве противоопухолевого средства, при мелкоклеточном раке легкого [Schwandt A, Mekhail T, Halmos B, O'Brien T, Ma PC, Fu P, Ivy P, Dowlati A. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and -II inhibitor, in relapsed "sensitive" small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012 Apr.; 7(4):751-4].

Задачей заявляемого изобретения является создание противоопухолевого средства из группы производных индолокарбазолов, позволяющего расширить спектр противоопухолевых препаратов.

Технический результат состоит в том, что создано новое противоопухолевое средство из группы производных индолокарбазолов, позволяющее расширить спектр

противоопухолевых препаратов.

Поставленная задача достигается тем, что создано новое противоопухолевое средство из группы производных индолокарбазолов, включающее 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, диметилсульфоксид (ДМСО); поливинилпирролидон (ПВП) при следующем соотношении компонентов (мг):

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион	8,1-9,9
ДМСО	95,0-125,0
ПВП	540,0-660,0

Получение 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона

К 0,55 г (0,9 ммоль) 13-формил-12-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]фурано[3,4-с]карбазол-5,7-диона добавляли 3,2 мл (65,25 ммоль) гидразин-гидрата, смесь выдерживали при температуре 50°C в течение двух часов, охлаждали до 22°C, выливали в воду. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 10% спиртом. Выход 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона составил 0,37 г (89%). Масс-спектр: M^+ 457 m/z.

^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ м.д.): 12.15 (с, 1H, NH-индол), 9.23 (д, 1H, Ar), 9.14 (д, 1H, Ar), 7.94 (д, 1H, Ar), 7.70 (д, 1H, Ar), 7.62 (т, 1H, Ar), 7.59 (т, 1H, Ar), 7.41 (т, 1H, Ar), 7.37 (т, 1H, Ar), 6.11 (д, 1H, H1', J_{1'2'} 9.1), 6.86, 5.38, 5.24 (3 уш с, 3H, 2',3',4'-ОН), 4.99 (2H, с, NH₂), 4.20-4.05 (м, 3H, H2', H3', H5''), 4.25 (м, 1H, H5'), 3.85 (м, 1H, H4').

Способ получения заявляемого средства

К навеске 2970,0 мг 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона добавляли 50,0 мл ДМСО, получали прозрачный раствор оранжевого цвета. Отдельно готовили 20% раствор ПВП в воде для инъекций. В водный раствор ПВП добавляли при постоянном перемешивании раствор 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона в ДМСО.

Полученный раствор стерилизовали при помощи фильтрации и разливали по 3,0 мл во флаконы вместимостью 20 мл и подвергали сублимационной сушке. По окончании лиофилизации флаконы закрывали пробками и укупоривали алюминиевыми колпачками.

Изобретение иллюстрируется примерами 1-3:

Пример 1.

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	8,1
ДМСО	95,0
ПВП	540,0

Пример 2.

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	9,0
ДМСО	110,0
ПВП	600,0

Пример 3.

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол-5,7-дион	9,9
ДМСО	125,0
ПВП	660,0

Изучение противоопухолевой активности заявляемого средства

Исследование противоопухолевой активности заявляемого средства проводили на самках и самцах мышей гибридов первого поколения BDF₁ (C₅₇B1/6j×DBA/2), массой 18-20 грамма, полученных из питомника «Столбовая» РАМН.

Опухолевые клетки лимфолейкоза-P388 перевивали мышам гибридам первого поколения BDF₁ (C₅₇B1/6×DBA/2) внутрибрюшинно асцитной жидкостью по 0,3 мл, содержащей 1×10^6 опухолевых клеток при разведении асцита в цитрате и среде 199. Введение заявляемого средства начинали через 24 часа после перевивки опухоли.

Опухолевую ткань эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10. Полученную суспензию в объеме 0,5 мл вводили подкожно в область правой подмышечной впадины мышам - самцам BDF₁. Введение заявляемого средства начинали через 48 час после перевивки опухоли.

Опытные группы при перевивке опухолевых клеток лимфолейкоза-P388 состояли из 8 мышей. При перевивке опухолевой ткани эпидермоидной карциномы легкого Lewis опытные группы состояли из 9-10 мышей. Контрольные группы включали по 10-12 мышей, которые не получали заявляемого средства.

Критериями оценки противоопухолевой активности заявляемого средства служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных мышей по сравнению с контрольными.

Для оценки ТРО измеряли три максимальных взаимно перпендикулярных размера опухоли (длина, ширина, высота) у каждой мыши и вычисляли ее объем, а затем определяли средний объем опухолей в группе. Измерение объема опухоли проводили каждые 3 дня, начиная с 1 дня после окончания введения соединения, когда размеры опухолей у мышей контрольных групп были измеримыми.

$$V(\text{мм}^3) = l \times b \times h ,$$

где: l - длина опухоли, мм;

b - ширина опухоли, мм;

h - высота опухоли, мм.

ТРО вычисляли по формуле:

$ТРО(\%) = (V_k - V_o) / V_k \times 100$, где

V_k - средний объем опухолей в контрольной группе ($мм^3$);

V_o - средний объем опухолей в опытной группе ($мм^3$).

Сравнительную оценку противоопухолевой активности по УПЖ проводили после гибели мышей от опухолевого процесса. Сначала определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в днях в опытной и контрольной группах, а затем вычисляли УПЖ по формуле:

$УПЖ(\%) = (СПЖ_o - СПЖ_k) / СПЖ_k \times 100$, где

СПЖ_к - средняя продолжительность жизни мышей в контрольной группе (дни);

СПЖ_о - средняя продолжительность жизни мышей в опытной группе (дни).

Минимальными критериями противоопухолевой активности служили: $ТРО \geq 50\%$ и $УПЖ \geq 25\%$.

Статистическую значимость результатов оценивали по критерию Стьюдента-Фишера. Статистически значимой противоопухолевую активность считали при $p \leq 0,05$.

Заявляемое изобретение иллюстрировано таблицами 1-2.

В табл. 1 представлена противоопухолевая активность заявляемого средства в зависимости от дозы и режима введения опытным мышам с лимфолейкозом-Р388. Показано, что при введении заявляемого средства в дозе 25 мг/кг при ежедневном применении в течение 5 дней выявлена высокая противоопухолевая активность, при этом УПЖ составило 76%. При введении заявляемого средства в дозе 35 мг/кг УПЖ составило 80%, но при этом отмечена гибель двух из 8 мышей. При однократном введении заявляемого средства в диапазоне доз от 75 мг/кг до 160 мг/кг не выявлено различий в терапевтическом эффекте: УПЖ варьировало от 28% до 34%. При введении заявляемого средства в дозе 160 мг/кг наблюдали гибель одной из 8 мышей.

Таким образом, режим введения заявляемого средства в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 5 дней у мышей с лимфолейкозом-Р388 являлся оптимальным.

В табл. 2 представлена противоопухолевая активность заявляемого средства в зависимости от дозы и режима введения опытным мышам с эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC). Показано, что при введении заявляемого средства в дозах 20 мг/кг и 25 мг/кг при ежедневном внутривенном введении в течение 5 дней выявлена статистически значимая противоопухолевая активность только в течение 5 дней после окончания его применения. ТРО на 1-й и 5-й дни после введения заявляемого средства в дозе 20 мг/кг составило 88% и 57%, соответственно. При применении заявляемого средства в дозе 25 мг/кг ТРО на 1-й и 5-й дни после введения составило 85% и 60%, соответственно. При однократном введении заявляемого средства в дозе 150 мг/кг достоверный противоопухолевый эффект сохранялся в течение 17 дней. При применении заявляемого средства в дозе 160 мг/кг наблюдали гибель двух из 9 мышей, соответственно.

Таким образом, введение заявляемого средства в дозе 150 мг/кг у мышей с эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC) является оптимальным при однократном введении.

Противоопухолевое средство

Доза заявляемого средства (мг/кг) / интервал (час) × число введений	СПЖ у мышей с лимфолейкозом-Р388, дни	УПЖ у мышей с лимфолейкозом-Р388, %	Гибель мышей от токсичности
Контроль	10,0 ± 0,1	-	-
10 / 24 × 5	10,26 ± 0,2	26	0/8
25 / 24 × 5	17,6 ± 0,5	76*	0/8
35 / 24 × 5	18,0 ± 0,63	80*	2/8
75 × 1	13,3 ± 1,8	33*	0/8
100 × 1	13,1 ± 1,1	31*	0/8
125 × 1	12,9 ± 1,5	29*	0/8
150 × 1	13,4 ± 1,2	34*	0/8
160 × 1	13,3 ± 2,5	28*	1/8

Примечание: - * < 0,05 по отношению к контролю.

Табл. 1

Доза заявляемого средства (мг/кг)/ интервал (час) × число введений	ТРО у мышей с эпидермоидной карциномой легкого Lewis,%						УПЖ у мышей с эпидермоидной карциномой легкого Lewis,%	Гибель мышей от токсичности
	Дни после окончания введения заявляемого средства							
	1	4-5	8-9	12	17	23		
10 /24 × 5	37	14	15	16	12	-	2	0/10
15 /24 × 5	70*	43	34	14	13	-	3	0/10
20 /24 × 5	88*	57*	36	29	8	-	2	0/10
25 /24 × 5	85*	60*	23	9	3	-	0	0/10
150 × 1	-	95*	81*	55*	49*	38	13	0/9
160 × 1	-	93*	79*	44	49	33	5	2/9

Примечание: - * < 0,05 по отношению к контролю.

Табл. 2

Формула изобретения

Противоопухолевое средство, содержащее 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, диметилсульфоксид и поливинилпирролидон и при следующих соотношениях компонентов (мг):

6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион	8,1-9,9
диметилсульфоксид	95,0-125,0
поливинилпирролидон	540,0-660,0