

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237263**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421716**

(22) Data zgłoszenia: **26.05.2017**

(51) Int. Cl.

C07D 407/02 (2006.01)

C07D 239/94 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54)

Pochodna chinazoliny i jej zastosowanie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

03.12.2018 BUP 25/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,
Katowice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JACEK MULARSKI, Katowice, PL
KATARZYNA MALARZ, Bielsko-Biała, PL
ROBERT MUSIOŁ, Będzin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak

PL 237263 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest pochodna chinazoliny i jej zastosowanie do modulowania aktywności kinaz tyrozynowych i do wytwarzania leków przeciwnowotworowych, zwłaszcza do leczenia nowotworów okrężnicy, prostaty, białaczki szpikowej.

Inhibitory kinaz tyrozynowych stały się pierwszymi celowanymi lekami przeciwnowotworowymi. Kinazy białkowe to duża grupa enzymów odpowiedzialnych za aktywację szeregu procesów i szlaków metabolicznych w komórkach. Ich działanie polega na przenoszeniu grupy fosforanowej na specyficzne białko, będące celem molekularnym kinazy. Z uwagi na rodzaj docelowego aminokwasu wyróżnia się kinazy serynowo-treoninowe oraz tyrozynowe. Fosforylacja białka prowadzi do zmian konformacyjnych, które z kolei warunkują właściwą aktywność. Okazuje się, że bazowa aktywność kinaz może ulegać istotnym modyfikacjom w przypadku wielu chorób, w szczególności nowotworowych. Nadekspresja niektórych kinaz prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek oraz ułatwia powstawanie dalszych mutacji na drodze karcenogenezy. Związki blokujące aktywność kinaz stają się wartościowymi lekami przeciwnowotworowymi o potencjalnie wysokiej selektywności. Pierwsze leki o takim mechanizmie działania wprowadzono do leczenia już kilkanaście lat temu, a intensywny rozwój doprowadził do otrzymania szeregu dalszych inhibitorów. Wśród nich szczególne znaczenie mają leki oparte na strukturze chinoliny i chinazoliny, jak na przykład gefitynib, erlotynib czy lapatynib. Obecność kilku leków z grupy pochodnych chinazoliny owocuje znacznym zainteresowaniem w dalszym ich rozwoju oraz powstaniem szeregu prac opisujących aktywność, w tym zgłoszeń patentowych i patentów. Jak zaobserwowano wśród pochodnych chinazoliny dominują związki podstawione w pozycji C4 zwłaszcza grupą aminoarylową lub aminoalkilową (G. Marzaro, A. Guiotto, A. Chilin, Quinazoline derivatives as potential anticancer agents: a patent review (2007 – 2010)., Expert Opin. Ther. Pat. 22 (2012) 223–52). W opisie wynalazku WO2005115145 ujawniono pochodne chinoliny i chinazoliny będące inhibitorami kinaz proteinowo-tyrozynowych (PTK) związanych z angiogenezą komórek rakowych. Aktywność opisywanych związków polegała na hamowaniu czynników wzrostu receptorów kinaz, które regulują rozwój naczyń krwionośnych. Działanie opisanych układów jest nieodwracalne a więc polega na silnym i trwałym wiązaniu do odpowiednich receptorów. Opis wynalazku zezwala na obecność podstawników w pozycji 2 szkieletu chinoliny lecz nie obejmuje pochodnych 2-styrylochinazolinowych.

W opisie wynalazku WO2006040522 opisano układy chinoliny modyfikowane w położeniu 4- podstawionym pirazolem. Według opisu związki mogą stanowić środki ograniczające proliferację komórek rakowych poprzez mechanizm hamowania PDGF receptorów kinaz. Szeroka grupa pochodnych chinazolinonu oraz ich zastosowanie do wytwarzania leków przeciwnowotworowych znana jest także z opisu WO2006125555.

Pochodne modyfikowane w pozycji C2 szkieletu chinazoliny zawierają głównie podstawnik aminoarylowy lub aminoalkilowy jak w dokumentach: WO2008020203, WO2008068507, WO2008079988. Znane są również podstawniki aryłowe, również o rozbudowanej strukturze jak w dokumentach: WO2010056758, WO2010026122, WO2009053694.

W dokumencie US9216177 przedstawiono 2-styrylochinazolinony jako inhibitory rekombinazy RAD51. Związki takie mogą być wartościowymi składnikami leków przeciwnowotworowych. Ujawnione w opisie zostały przed wszystkim pochodne modyfikowane w pozycji N3 pierścienia chinazolinonu.

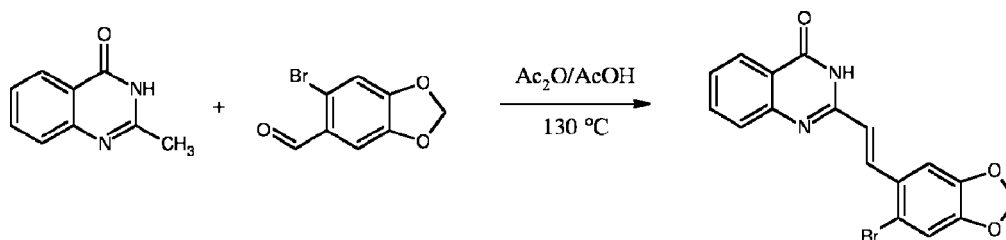
Badania skoncentrowane na poszukiwaniu nowych związków zawierających układ styrylochinazoliny doprowadziły do opracowania pochodnych będących silnymi inhibitorami kinaz białkowych. Takie związki mogą stanowić aktywne składniki leków przeciwnowotworowych.

Istotę wynalazku stanowi pochodna chinazoliny według wzoru 1.

Istotę wynalazku stanowi także zastosowanie pochodnej chinazoliny według wzoru 1 do wytwarzania leków do modulowania aktywności kinaz tyrozynowych, do leczenia nowotworów, korzystnie nowotworów okrężnicy, prostaty, białaczki szpikowej.

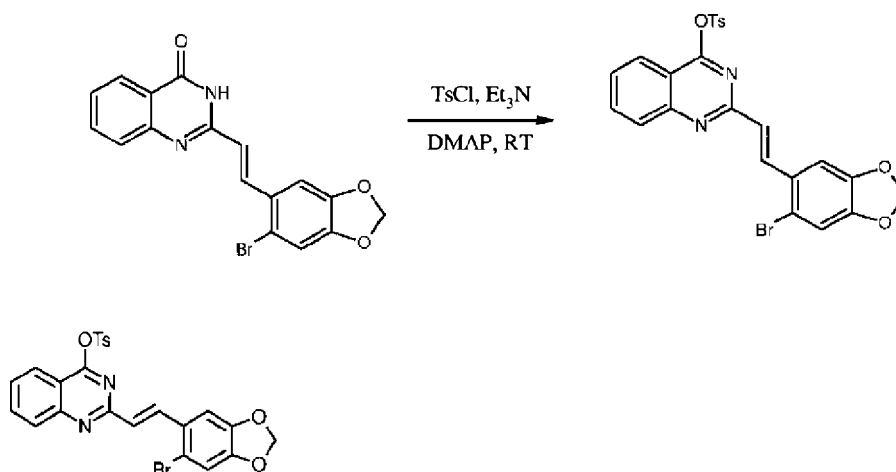
Poniżej przedstawiono przykłady otrzymywania pochodnej oraz jej zastosowania. W przykładzie 1 przedstawiono sposób otrzymywania pochodnej objętej wynalazkiem w wieloetapowej syntezie z uwzględnieniem etapów pośrednich. W analogiczny sposób w przykładzie 2 przedstawiono aktywność pochodnej wobec izolowanych kinaz białkowych kluczowych dla leczenia nowotworów. W przykładach 3–5 przedstawiono aktywność wobec linii komórek nowotworowych oraz normalnych komórek ludzkich. W przykładzie 6 przedstawiono zastosowanie znanej procedury do oznaczania poziomu ekspresji kinaz w komórkach nowotworowych a więc podatność nowotworów na leczenie wykorzystujące pochodną będącą przedmiotem wynalazku.

Przykład 1. Ogólna metoda syntezy pochodnej chinazoliny przebiega według poniższego schematu.



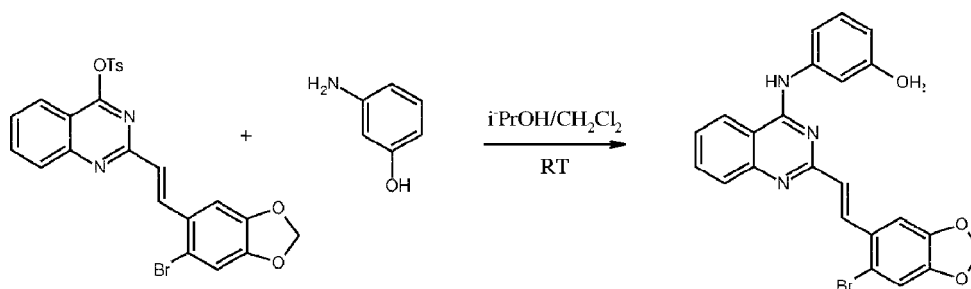
Półprodukt (styrylochinazolinon) otrzymano umieszczając w naczyniu reakcyjnym 20 mL 25% (v/v) roztworu bezwodnika octowego w 80% kwasie octowym, 2-metylo-4(3H)-chinazolon oraz odpowiedni aldehyd aromatyczny (pochodna benzaldehydu). Roztwór mieszano, ogrzewając w temperaturze 130°C do momentu pojawienia się obfitego osadu, a jeżeli osad nie wypadł, reakcję przerywano w momencie pojawienia się słomkowej barwy roztworu. Pozostałości medium reakcyjnego usuwano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano przez krystalizację z etanolu.

Otrzymywanie prekursora N-arylo 2-[(E)-2-fenyletenylo]chinazoliny

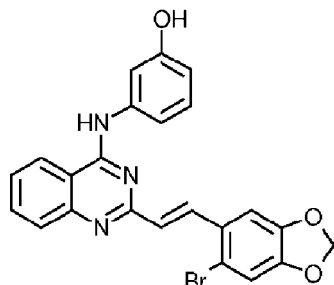


4-[4-metylobenzeno-1-sulfonian]-2-[(E)-2-(6-bromo-3,4-metylenodioksyfenylo)-etenylo]chinazolin-4(3H)-onu z 0,56 g 2-[(E)-2-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)etenylo]chinazolin-4(3H)-onu z 0,56 g chlorku tosyłu w obecności 0,36 g trietyloaminy oraz 0,32 g DMAP, uzyskując wydajność 0,24 g (16%) jasnożółtego osadu, $t_{\text{top}}=184-186^{\circ}\text{C}$. Strukturę związku potwierdzono na podstawie spektroskopii ^1H NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 8,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,10 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 7,82 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,50 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,82 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,37 (d, $J = 5,1$ Hz, 2H), 7,12 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,89 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 6,17 (s, 2H), 2,29 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz; DMSO): δ 161,5, 152,8, 150,7, 148,6, 146,0, 138,2, 135,5, 130,2, 128,5, 128,5, 128,1, 127,5, 127,2, 126,6, 126,0, 126,0, 121,1, 117,7, 113,4, 106,8, 103,2, 21,2.

Otrzymywanie właściwej pochodnej N-arylo-2-[(E)-2-fenyletenylo]-4-aminochinazoliny



Pochodną chinazoliny otrzymano z opisanego prekursora w reakcji z pochodną aniliny (3-amino-fenolem), prowadząc reakcję w 100 mL mieszaniny propan-2-olu i chlorku metylenu (10:1), pozostawiając do mieszania w warunkach temperatury pokojowej przez 3 dni. Dodawano 30 mL 10% roztworu wodorowęglanu sodu i mieszano jeszcze przez 30 minut. Usuwano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, aż do pojawienia się osadu, który sączono na lejku, przemywając wodą i eterem dietylowym.



N-(3-hydroksyfenilo)-2-[(E)-2-(6-bromo-3,4-metylenodioksyfenilo)etenilo]-4-aminochinazolina. Związek otrzymano w reakcji 0,16 g 2-[(E)-2-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)etenilo]chinazolin-4-yl-4-metylobenzenosulfonianu i 0,04 g 3-aminofenolu, uzyskując wydajność 0,12 g (84%) kremowego osadu, $t_{\text{top}}=249\text{--}257^{\circ}\text{C}$. Strukturę związku potwierdzono na podstawie spektroskopii ^1H NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 9,62 (s, 1H), 9,39 (s, 1H), 8,56 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 8,29 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H), 7,84 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,77 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,65 (t, 8,92 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,58 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,21 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), 6,56 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 6,14 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz; DMSO): δ 160,2, 158,0, 157,6, 150,9, 149,4, 148,4, 140,9, 135,3, 133,5, 130,2, 129,5, 129,1, 128,2, 126,2, 123,5, 116,5, 114,6, 113,3, 113,0, 111,1, 109,4, 106,8, 102,7.

Przykład 2. Oznaczanie hamowania kinazy białkowej.

Przykładowa procedura pomiaru inhibicji niereceptorowych kinaz tyrozynowych przy pomocy testów Kinase Selectivity Profiling Systems (Promega) oraz ADP-Glo Kinase Assay (Promega). Przed przystąpieniem do badania rozpuszczono pochodną chinazoliny w DMSO, a następnie przygotowano roztwory w stężeniu $0,5\text{ }\mu\text{M}$ w 1X Kinase Reaction Buffer (40 mM Tris – pH 7,5; 20 mM MgCl_2 ; 0,1 mg/mL BSA; 50 μM DTT), w którym końcowe stężenie DMSO wynosiło 5%. Następnie każdą kinazę (ABL1; BRK; BTK; CSK; FYN A; LCK; LYN B; SRC) z 8-dołkowego paska rozpuszczono w 95 μL 2,5X Kinase Reaction Buffer, a 8-dołkowe paski zawierające substraty w 15 μL 100 μM ATP. Test na inhibicję kinaz tyrozynowych przeprowadzono na białej 384-dołkowej, w tym celu przeniesiono roztwory związku w ilości 1 μL , a następnie dodano po 2 μL wcześniej przygotowanych roztworów kinaz oraz substratów i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Aktywność kinaz wykrywano przy pomocy testu ADP-Glo Kinase Assay. W metodzie tej dodano 5 μL odczynnika ADP-Glo™ Reagent do każdej studzienki, po czym płytkę wymieszano na wytrząsarce przez 2 minuty i inkubowano 40 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, dodano 10 μL odczynnika Kinase Detection Reagent, ponownie mieszano i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Wartość luminescencji odczytano przy użyciu wielo-detekcyjnego czytnika płytek Synergy 4, Bio Tek. Wyniki, w postaci procentowej wartości zahamowania aktywności kinazy przedstawiono w tabeli 1, a dla porównania przedstawiono imatynib, to jest lek stosowany w leczeniu nowotworów, którego miejscem działania jest kinaza ABL.

T a b e l a 1. Hamowanie kinaz przez pochodne z przykładu 1.

	Kinazy białkowe z przykładu 3							
	ABL1	BRK	BTK	CSK	FYN A	LCK	LYN B	SRC
Pochodna wg wynalazku	0	24,18	74,33	62,87	0	29,47	19,83	41,32
imatynib	77,17	0	0	0	0	0	0	0

Przykład 3. Aktywność przeciwnowotworowa pochodnej chinazoliny z przykładu 1 wobec nowotworów jelita grubego.

Aktywność antyproliferacyjną badanego związku oznaczono wobec komórek ludzkiego raka jelita HCT 116 +/- (linia komórek p53 pozytywnych). Komórki wysiano w ilości 9 tysięcy na dołek (wraz z 100 μL /-

/dołek medium DMEM) i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze 37°C; 5% CO₂. Związki rozpuszczone w minimalnej ilości DMSO podawano w stężeniach umożliwiających wyznaczenie krzywej aktywności. Przykładowa aplikacja związku – rozpuszczenie związku w DMSO w celu przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 0,5 µM, 0,1 µM. Końcowa objętość w dołkach wynosiła 200 µL. Tak przygotowane komórki poddano inkubacji w czasie 72 h, po czym przeprowadzono ocenę żywotności komórek w teście MTS. Do każdej studzienki w płytce 96 dołkowej dodano 20 µL roztworu MTS (5 mg/mL) i inkubowano przez 1 h. Wartości absorbancji odczytano przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 490 nm. Wyniki testów w postaci średniej wraz z odchyleniem zostały przedstawione w tabeli 2 w przeliczeniu na wartości IC₅₀. Jako związek referencyjny zastosowano imatynib.

Przykład 4. Aktywność przeciwnowotworowa wobec nowotworów jelita grubego z delecją genu supresorowego TP53.

Aktywność antyproliferacyjną pochodnej oznaczono wobec komórek ludzkiego raka jelita HCT 116 -/- (linia komórek z delecją genu p53). Komórki wysiano w ilości 9 tysięcy na dołek (wraz z 100 µL/-dołek medium DMEM) i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze 37°C; 5% CO₂. Związki rozpuszczone w minimalnej ilości DMSO podawano w stężeniach umożliwiających wyznaczenie krzywej aktywności. Przykładowa aplikacja związku – rozpuszczenie związku w DMSO w celu przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 0,5 µM, 0,1 µM. Końcowa objętość w dołkach wynosiła 200 µL. Tak przygotowane komórki poddano inkubacji w czasie 72 h, po czym przeprowadzono ocenę żywotności komórek w teście MTS. Do każdej studzienki w płytce 96 dołkowej dodano 20 µL roztworu MTS (5 mg/mL) i inkubowano przez 1 h. Wartości absorbancji odczytano przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 490 nm. Wyniki testów w postaci średniej wraz z odchyleniem zostały przedstawione w tabeli 2 w przeliczeniu na wartości IC₅₀.

W analogiczny sposób jak w przykładach 3 i 4 można oznaczyć aktywność przeciwnowotworową na dowolnych wyizolowanych komórkach nowotworów zwierzęcych w szczególności ludzkich.

Przykład 5. Cytotoksyczność pochodnej opisanej wynalazkiem względem normalnych komórek ludzkich.

Cytotoksyczność pochodnej oznaczono wobec ludzkich fibroblastów (linia komórek NHDF). Komórki wysiano w ilości 9 tysięcy na dołek (wraz z 100 µL/dołek medium DMEM) i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze 37°C; 5% CO₂. Związki rozpuszczone w minimalnej ilości DMSO podawano w stężeniach umożliwiających wyznaczenie krzywej aktywności. (Przykładowa aplikacja związku – rozpuszczenie związku w DMSO w celu przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 0,5 µM, 0,1 µM). Końcowa objętość w dołkach wynosiła 200 µL. Tak przygotowane komórki poddano inkubacji w czasie 72 h, po czym przeprowadzono ocenę żywotności komórek w teście MTS. Do każdej studzienki w płytce 96 dołkowej dodano 20 µL roztworu MTS (5 mg/mL) i inkubowano przez 1 h. Wartości absorbancji odczytano przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 490 nm. Wyniki testów w postaci średniej wraz z odchyleniem są przedstawione w Tabeli 2 (w przeliczeniu na wartości IC₅₀).

T a b e l a 2. Aktywność przeciwnowotworowa pochodnej z przykładu 1.

Aktywność przeciwnowotworowa pochodnej chinazoliny IC ₅₀				
HCT116 +/+ [µM]	HCT116 -/- [µM]	MCF-7 [µM]	A549 [µM]	NHDF [µM]
4,38 ± 0,24	5,03 ± 0,15	4,383 ± 0,544	7,410 ± 0,389	4,59 ± 0,69

Przykład 6. Oznaczanie podatności nowotworu na działanie pochodnej opisanej wynalazkiem. Oznaczanie podatności wykonano jako wyznaczenie poziomu ekspresji genów kinaz z rodziny SRC (CSK; FYN A; LCK; LYN B; SRC) przy pomocy metody Real-Time PCR (RT-PCR). Oznaczenia przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych: raka jelita grubego (HCT 116), gruczolakoraka jelita grubego (Caco-2), raka piersi (MCF-7), raka płuc (A549) oraz prawidłowych fibroblastów (NHDF). Przed przystąpieniem do właściwej części oznaczenia, komórki wysiano na 3 cm szalkach Petriego w ilości 500 tys./1 mL medium DMEM i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C; 5% CO₂. Po tym czasie, z komórek wyizolowano RNA przy pomocy odczynnika TRIzol Reagent (Ambion), oczyszczono i zmierzono w spektrofotometrze typu NanoDrop. Następnie, 5 µg wyizolowanego RNA poddano procesowi odwrotnej transkrypcji do cDNA przy pomocy GoScript™ Reverse Transcriptase kit (Promega)

oraz Oligo(dT)₂₃ Primers (Sigma). Otrzymany produkt wykorzystano do reakcji Real-Time PCR, którą przeprowadzono w termocyklerze CTX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad). W tym celu, przygotowano mieszaninę reakcyjną w objętości 20 µL. Przykładowo mieszaninę reakcyjną sporządzono z master mixu – 2X PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), który zawierał dinukleotydy (dNTPs), polimerazę (Dual-Lock Taq DNA Polymerase) oraz barwnik SYBR Green, po czym dodano pary starterów w ilości 0,5 µM, 1 µL matrycy cDNA oraz uzupełniono sterylną wodą do końcowej objętości. Przykładowe pary starterów podano w tabeli 3. Gotową mieszaninę reakcyjną umieszczono w termocyklerze i przeprowadzono reakcję RT-PCR, składającą się z następujących etapów:

- początkowa denaturacja w 95°C przez 120 sekund
- denaturacja w 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów przez 30 sekund (temperatura specyficzna dla zaprojektowanych par starterów), wydłużanie matrycy w temperaturze 72°C przez 60 sekund. Etap ten składa się z 40 cykli.
- pomiar krzywych topnienia w zakresie temperaturowym 65°C–95° (2–5 sekund na każde 0,5°C), celem weryfikacji otrzymanych produktów podczas reakcji RT-PCR.

Otrzymane dane analizowano porównując ekspresję badanych genów do referencyjnego genu podstawowego metabolizmu – β-aktyny przy pomocy standardowej metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ wprowadzonej przez Livak i Schmittgen.

T a b e l a 3. Zaprojektowane pary starterów

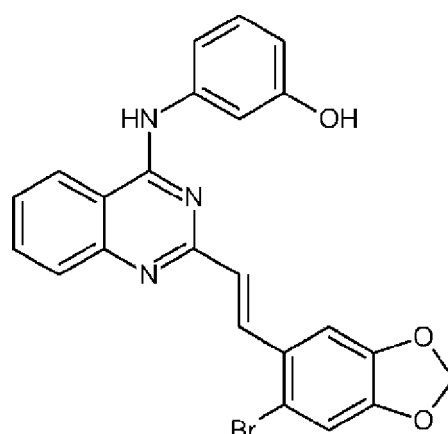
Gen	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
CSK	GGCTCTACATCGTCACTGAG	CTCAGACACCAGCACATTG
FYN A	GTAAGTCATGGCAACCCGCTA	ACAACCCCCACCCTCATTTTC
LCK	AGCTTTTCTGTGGCTGGTGA	CATTTCGGATGAGCAGCGTG
LYN B	GCGAGCGGGAAATATGGGAT	AGATTCTGGAAGTGGTTGAGTCT
SRC	CCTCGTGCGAGAAAGTGAG	TGGCGTTGTCTGAAGTCAG
β-aktyna	CTCGCCTTTGCCGATCC	GCTGGGGTGTTGAAGGTCTC

T a b e l a 4. Względna ekspresja kinaz w badanych komórkach nowotworowych

Komórki	Ekspresja kinaz				
	SRC	CSK	FYNA	LYN B	LCK
HCT116 p53 +/+	0,997561	3,597657	5,872974	5,536789	1,385958
HCT116 p53 -/-	0,448602	2,745799	3,57869	3,213361	4,957144
MCF-7	0,057369	1,222902	0,367766	0,477916	0,047678
A549	1,024934	0,871319	0,259529	0,605141	0,014632

Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodna chinazoliny według wzoru 1.
2. Zastosowanie pochodnej chinazoliny według wzoru 1 do wytwarzania leków do modulowania aktywności kinaz tyrozynowych, do leczenia nowotworów, korzystnie nowotworów okrężnicy, prostaty, białaczki szpikowej.

Rysunek**Wzór 1**