



(19)

**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 017566

(13) B1

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента: **2013.01.30**  
 (21) Номер заявки: **201000708**  
 (22) Дата подачи: **2006.07.24**

(51) Int. Cl. **C07C 229/42** (2006.01)  
**A61K 31/136** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

**(54) СОЕДИНЕНИЯ И ИХ СОЛИ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К PPAR РЕЦЕПТОРАМ И EGF РЕЦЕПТОРАМ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОБЛАСТИ МЕДИЦИНЫ**

(31) **RM2005A000389**  
 (32) **2005.07.22**  
 (33) **IT**  
 (43) **2010.10.29**  
 (62) **200800372; 2006.07.24**  
 (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЖУЛИАНИ ИНТЕРНЭШНЛ ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:  
**Наккари Джанкарло, Барони Серджо (IT)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) EP-A1-0055689  
 DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414322, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3200601, abstract & J. CHEM SOC, 1935, page 104, 111  
 DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414323, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3242057, abstract & CHEM BER, vol. 74, 1941, page 500, 517  
 DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414324, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3199917, abstract & CHEM BER, vol. 46, 1913, page 288  
 DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414325, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3199913, abstract & CHEM BER, vol. 46, 1913, page 3978  
 DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE

FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414326, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3296969, abstract & CHEM NEWS J IND SCI, vol. 36, 1877, page 269

DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414327, retrieved from XFIRE, Database accession no. pcrn 859019, abstract & US 4429152 A (SCHERING AG [DE]), 31 January 1984 (1984-01-31)

DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414328, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 3268495, abstract & JUSTUS LIEBIGS ANN CHEM, vol. 436, 1924, page 60

DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414329, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 2208094, abstract & J AM CHEM SOC, vol. 68, 1946, page 2335, 2338

DATABASE BEILSTEIN, BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002414330, retrieved from XFIRE, Database accession no. brn 2803076, abstract & J ORG CHEM, vol. 14, 1949, page 1013, 1018

ROUSSEAU ET AL.: "Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma", JEM, vol. 201, no. 8, 18 April 2005 (2005-04-18), pages 1205-1215, XP002414312, cited in the application, the whole document

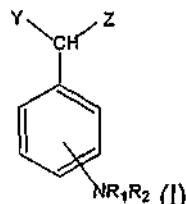
EP-A1-1285908

ALLGAYER H.: "REVIEW ARTICLE: MECHANISMS OF ACTION OF MESALAZINE IN PREVENTING COLORECTAL CARCINOMA IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE", ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS LTD., CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. SUPPL 2, 2003, pages 10-14, XP008046292, ISSN: 0269-2813, the whole document

B1

017566

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям общей формулы (I)



017566

B1

---

в которой  $NR_1R_2$  присоединен к фенильному кольцу в 3-положении;  $R_1$  и  $R_2$ , которые могут быть одинаковы или различны, выбирают из группы, состоящей из -H или линейной или разветвленной алкильной группы, содержащей от 1 до 6 атомов углерода, или вместе образуют 5- или 6-членное ароматическое или алифатическое кольцо; Y выбирают из группы, состоящей из H, COOH, и  $-CH(OR^3)COOH$ ; Z представляет собой  $-CH(OR_3)COOH$ ;  $R_3$  представляет собой H. Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанные соединения (I), и применению данных соединений для получения лекарственного средства для лечения хронического воспалительного заболевания, болезни Крона или язвенного ректоколита, рака толстой кишки, а также для лечения опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, молочной железы, матки и придатков, почек и легких.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям и их солям, специфичным к PPAR рецепторам и EGF рецепторами и их применению в области медицины.

### Цель изобретения

В частности, согласно настоящему изобретению, соединения и их соли могут быть успешно использованы для предотвращения и лечения опухолей, экспрессирующих PPAR $\gamma$  рецепторы (рецепторы, активируемые пероксисомальным пролифератором) и EGF рецепторы (эпидермальные рецепторы фактора роста), таких как опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, молочной железы, матки и придатков, почек и легких. Кроме того, согласно изобретению соединения и их соли могут быть успешно использованы для лечения хронических воспалительных заболеваний, в частности хронических желудочно-кишечных заболеваний, таких как болезнь Крона и язвенный ректоколит.

### Уровень техники

Рецепторы PPAR $\gamma$  являются ядерными рецепторами (группа из 50 факторов транскрипции), которая контролирует экспрессию многих генов, которые важны для регуляции липидного метаболизма, синтеза инсулина, и процессы канцерогенеза и воспаления (Bull AW, Arch Pathol Lab Med 2003; 127: 1121-1123) (Koeffler HP, Clin Cancer Res 2003; 9: 1-9) (Youssef J. et al., J Biomed Biotech 2004; 3: 156-166).

Существуют различные природные и синтетические агонисты, которые связываются с PPAR $\gamma$  рецепторами и меняют их конформацию, вызывая увеличение активации. Природные и синтетические лиганды описаны в "Ланцете" 2002; 360:1410-1418.

Последние исследования показали, что обработка опухолевых клеток лигандами PPAR $\gamma$  рецепторов вызывает снижение клеточной пролиферации и дифференциации и апоптоз, что предполагает перспективность применения данных соединений для предотвращения канцерогенеза (Osawa E et al., Gastroenterology 2003; 124:361-367).

Другие исследования показали, что лиганды PPAR $\gamma$  рецепторов (например, троглитазон) обладают противовоспалительным действием и ингибируют воспалительный ответ слизистых в моделях IBD на животных (Tanaka T/ et al., Cancer Res 2001; 61: 2424-2428).

Кроме того, недавно опубликованы данные о том, что кишечная противовоспалительная активность 5-ASA, "золотого стандарта" лечения IBD зависит от связывания и последующей активации PPAR $\gamma$  рецепторов (Rousseaux C et al., J Exp Med 2005; 201: 1205-1215).

Трансмембранный рецептор с тирозинкиназной EGF активностью экспрессируется в высокой степени в активированной форме при различных типах опухолей (Mendelsohn J., Endocr Relat Cancer 2001; 8: 3-9) (Harari PM, Endocr Relat Cancer 2004; 11: 689-708).

Сверхэкспрессия рецептора также связана с потенциальной способностью опухолевых клеток к метастазированию. В связи с этим было показано, что EGF усиливает миграцию и инвазивность различных клеточных типов, связанных с повреждениями на уровне взаимодействий с внеклеточным матриксом (Brunton et al., Oncogene 1997; 14: 283-293).

В ряде исследований, проведенных с участием как экспериментальных животных, так и людей, установлена эффективность ингибиторов EGF рецептора в контролировании пролиферации и распространения опухолей (Mendelsohn J., Endocr Relat Cancer 2001; 8: 3-9) (Harari P.M., Endocr Relat Cancer 2004; 11: 689-708).

Нет сомнений, что внутриклеточные сигналы, включенные активацией EGF рецептора, способствуют росту и выживаемости опухолевых клеток, внося свой вклад в развитие патологии, и что данные сигналы являются важными в ограничении способности опухолевых клеток распространяться и заселять удаленные органы (Mendelsohn J., Endocr Relat Cancer 2001; 8: 3-9) (Kari C. et al., Cancer Res 2003; 63: 1-5).

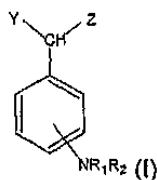
Из вышеупомянутого и учитывая, более того, что с биологической точки зрения хронические воспалительные процессы играют роль в канцерогенезе, становится ясно, что существует реальная необходимость в прогрессивном исследовании новых химических объектов, которые по их комплементарному действию на PPAR $\gamma$  рецепторы и на EGF рецепторы, способны оказывать противовоспалительное и противопухолевое действие хемопревентивного, антитромиферативного и антиметастатического типа.

Настоящее изобретение предоставляет новый класс соединений, которые подходят для предупреждения и лечения рака и хронического воспаления путем изменения активности специфических рецепторов, таких как PPAR $\gamma$  рецепторы и EGF рецепторы.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым и имеющим изобретательский уровень медицинским и терапевтическим применением серий соединений, которые являются новыми, изобретение также относится к данным соединениям.

Настоящее изобретение относится к соединениям, включающим в себя общую формулу (I)



в которой

NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> присоединен к фенильному кольцу в 3-положении;

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, которые могут быть одинаковы или различны, выбирают из группы, состоящей из -H или линейной или разветвленной алкильной группы, содержащей от 1 до 6 атомов углерода, или вместе образуют 5- или 6-членное ароматическое или алифатическое кольцо;

Y выбирают из группы, состоящей из H, COOH и -CH(OR<sup>3</sup>)COOH;

Z представляет собой -CH(OR<sub>3</sub>)COOH;

R<sub>3</sub> представляет собой H.

В некоторых воплощениях изобретения Y и Z являются различными. В некоторых воплощениях изобретения Y заканчивается -COOH. Поэтому в некоторых воплощениях изобретения Y представляет собой -COOH. В некоторых воплощениях изобретения Y или Z (в некоторых воплощениях по меньшей мере один из Y или Z, и в некоторых воплощениях только один из Y или Z) представляет собой -CH(OR<sub>3</sub>)COOH.

В некоторых воплощениях изобретения, где Y является -H и Z является -CH(OH)COOH, группа NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> присоединяется в положении 3'.

В частности, вышеупомянутая линейная или разветвленная алкильная группа, содержащая от 1 до 6 атомов углерода, может быть выбрана из -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>.

Соединения формулы (I) и (Ia) могут быть выбраны из группы, включающей в себя 3-(3'-аминофенил)-2-гидроксипропионовую кислоту (соединение 20).

Упомянутое выше название соединения также может быть написано согласно стандартной химической номенклатуре в следующем виде (который будет использован далее в тексте):

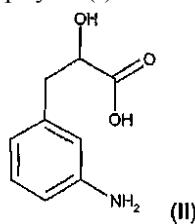
(±)-2-гидрокси-3-(3'-аминофенил)пропионовая кислота (соединение 20).

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть успешно использованы в области медицины. Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей в себя одно или более соединений, описанных выше, в качестве активных соединений, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или адьювантами.

Настоящее изобретение относится, более того, к применению соединений, описанных выше, для получения лекарственного продукта для предотвращения и лечения опухолей, экспрессирующих PPAR $\gamma$  рецепторы и EGF рецепторы, таких как, например, опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, молочной железы, матки и придатков, почек и легких.

Кроме того, изобретение относится к применению соединений согласно изобретению для получения лекарственного продукта для лечения хронических воспалительных заболеваний, таких как, например, болезнь Крона и язвенный ректоколит.

В одном воплощении R<sub>3</sub> соединений формулы (I) может быть H согласно следующей формуле (II)



в то время как R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, X и Y описаны ранее.

Предпочтительно соединения формулы (I) могут представлять собой (+)-2-гидрокси-3-(3'-аминофенил)пропионовую кислоту (соединение 20).

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть успешно использованы в области медицины. Поэтому настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей в себя одно или более соединений, описанных выше, в качестве активных соединений, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или адьювантами.

Настоящее изобретение относится, более того, к использованию соединений, как описано выше, для получения лекарственного продукта для предупреждения и лечения опухолей, экспрессирующих PPAR $\gamma$  рецепторы и EGF рецепторы, таких как, например, опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, молочной железы, матки и придатков, почек и легких.

Более того, изобретение относится к применению соединений согласно изобретению для получения лекарственного продукта для лечения хронических воспалительных заболеваний, таких как, например, болезнь Крона и язвенный ректоколит. Настоящее изобретение также относится к лечению людей и/или млекопитающих (включая грызунов, сельскохозяйственных животных, домашних животных, мышей,

крыс, хомячков, кроликов, собак, кошек, свиней, овец, коров, лошадей).

Применения описанных соединений не ограничиваются их применением в рацемической форме. Настоящее изобретение распространяется на использование любого описанного соединения в форме чистых энантиомеров R и S или любой смеси, в которой один энантиомер присутствует в избытке по отношению к другому в любой пропорции.

В действительности, проведенные изучения докинга показывают, что энантиомер S более активен, чем энантиомер R, хотя чистый энантиомер R также демонстрирует активность.

Молекула настоящего изобретения была получена путем молекулярного моделирования с использованием в качестве основы месалазина и для получения наилучшего показателя (сродство и активация рецептора) в компьютерных экспериментах по докингу были оценены все химически возможные варианты. Следовательно, полагают, что соединение настоящего изобретения, которое показывает сравнимые с месалазином функцию и/или активность действуют через сходные биологические пути. Полагают, что присущие молекуле настоящего изобретения, сходные с месалазином характеристики придают молекуле сходную активность в отношении EGF пути.

Приведенные в настоящей заявке примеры являются удобными моделями в прогнозировании применения соединений в различных областях медицины, которые уже обсуждались. Поэтому модели представляют полноценные и показательные результаты независимо от механизма их действия.

Настоящее изобретение будет теперь описано с целью иллюстрации, но не ограничиваясь этим, согласно его предпочтительным воплощениям, со специальной ссылкой на диаграммы в прилагаемых чертежах.

#### Краткое описание чертежей и таблиц

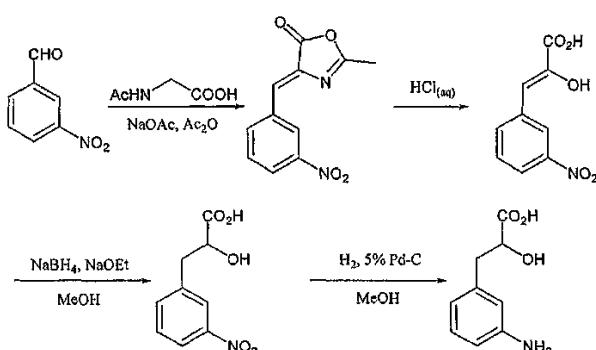
На фиг. 1 представлена таблица, где указаны проценты ингибирования клеток DLD-1 дифференцированными дозами (0,5-10 мМ) заявленного соединения 20 и его аналогов (соединения 23, 32, 33, 34, 35, 39 и 40). Клетки культивировали в присутствии соединений и без них и затем оценивали клеточный рост колориметрическим методом (BrdU) через 48 ч культивирования.

Фиг. 2 показывает структуру соединений 20, 23, 32, 33, 34, 35, 39 и 40.

Фиг. 3 - активность PPAR $\gamma$  при обработке соединениями.

Фиг. 4 - докинг месаламина и рецептора PPAR $\gamma$  (обозначены аминокислотные остатки).

Пример 1. Способ получения (±)-2-гидрокси-3-(3'-аминофенил)пропионовой кислоты (соединение 20)



#### Стадия 1.

3-Нитробензальдегид (45,3 г, 0,3 моль), N-ацетилглицин (42,1 г, 0,36 моль) и ацетат натрия (32 г, 0,39 моль) смешивали с уксусным ангидридом (142 мл, 1,5 моль) и полученную смесь нагревали при перемешивании до 120°C в течение 6 ч, получая темный раствор. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры в течение ночи, получая в результате осажденное твердое вещество. Реакционную смесь выливали в ледяную воду (130 г) и полученное суспензированное твердое вещество собирали фильтрацией. Неочищенный твердый продукт (72 г) промывали ацетоном (80 мл), затем перекристаллизовывали из горячего ацетона (320 мл) с получением кристаллического твердого вещества, которое затем промывали 50% водным этианолом, затем сушили при 40°C/40 мм рт.ст. с получением 2-метил-4-(3-нитробензилиден)оксазол-5(4Н)-она (49,0 г, 78%) в виде бледно-желтых игл.

<sup>1</sup>Н ЯМР ( $\delta$ , 250 МГц, CDCl<sub>3</sub>) = 2,47 (3H, с), 7,15 (1H, с), 7,63 (1H, дд, 8,2 и 7,6 Гц), 8,27 (1H, д, 8,2 Гц), 8,34 (1H, д, 7,6 Гц), 9,02 (1H, с).

#### Стадия 2.

2-Метил-4-(3-нитробензилиден)оксазол-5(4Н)-он (52,0 г, 0,224 моль) смешивали с 3М соляной кислотой (1,3 л) и перемешивали суспензию при 100°C в течение 6 ч. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем суспензированное твердое вещество собирали фильтрацией, промывали водой (2×40 мл), затем высушивали *in vacuo* с получением 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)акриловой кислоты (29,3 г).

Объединенные фильтрат и промывочные растворы экстрагировали этилацетатом (4×0,5 л), затем

объединенные органические экстракты высушивали над сульфатом натрия и концентрировали досуха с получением дополнительного количества 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)акриловой кислоты (12,0 г). Общий выход 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)акриловой кислоты составляет 41,3 г (88%).

<sup>1</sup>Н ЯМР ( $\delta$ , 250 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) = 6,56 (1Н, с), 7,64 (1Н, т, 8 Гц), 8,0-8,1 (2Н, м), 8,78 (1Н, с), 9,95 (1Н, ушир. с), 12,80 (1Н, ушир. с).

Стадия 3.

Этоксид натрия (1,8 г, 26,4 ммоль) добавляли по частям при 0°C к перемешиваемому раствору 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)акриловой кислоты (5,25г, 25,0 ммоль) в метаноле (131 мл) до образования прозрачного бледно-желтого раствора. Затем осторожно добавляли боргидрид натрия (1 г, 26,4 ммоль) двумя частями и перемешивали смесь при 5-10°C в течение 30 мин. Затем добавляли небольшое количество воды для подавления реакции и разложения любого избыточного NaBH<sub>4</sub>. Метанол удаляли *in vacuo* с получением твердого остатка, который растирали в 5:2 смеси этилацетата и гептана (21 мл), затем растирали с 3% водным метанолом. Полученное твердое вещество собирали фильтрацией и высушивали *in vacuo* с получением 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)пропионовой кислоты (3,0 г, 57%).

<sup>1</sup>Н ЯМР ( $\delta$ , 250 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) = 2,97 (1Н, дд, 14 и 8,2 Гц), 3,15 (1Н, дд, 14 и 4,2 Гц), 4,23 (1Н, дд, 8,2 и 4,2 Гц), 7,58 (1Н, т, 8 Гц), 7,70 (1Н, д, 8 Гц), 8,0-8,15 (2Н, м).

Стадия 4.

Смесь 2-гидрокси-3-(3-нитрофенил)пропионовой кислоты (3,0 г, 14,2 ммоль), метанола (129 мл) и 5% палладия на активированном древесном угле (600 мг, 2 моль%) гидрировали при 10 psi в атмосфере Н<sub>2</sub> в течение 1 ч. Затем смесь фильтровали через целик, отфильтрованный осадок промывали метанолом и концентрировали фильтраты при 40°C в глубоком вакууме с получением продукта в виде пенящегося твердого вещества. Данное вещество растворяли в воде и раствор лиофилизировали с получением (±)-2-гидрокси-3-(3'-аминофенил)пропионовой кислоты (2,6 г, 100%) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>Н ЯМР ( $\delta$ , 250 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) = 2,61 (1Н, дд, 13,6 и 8,3 Гц), 2,81 (1Н, дд, 13,6 и 4,6 Гц), 4,09 (1Н, дд, 8,25 и 4,6 Гц), 6,35-6,43 (2Н, м), 6,45 (1Н, д, 1 Гц), 6,90 (1Н, т, 7,6 Гц).

Пример 2. Молекулярное моделирование.

Исследования по молекулярному моделированию проводили с использованием программы SYBYL версии 6.9.1, (Tripos Associates Inc, St Louis, MO), установленной на рабочей станции Silicon Graphics. Трехмерную модель цвиттерионной формы 5-ASA строили из стандартных фрагментов библиотеки и последовательно оптимизировали ее геометрию, используя Tripos force field (3). Поскольку рKa соединения остается неизвестным, использовали онлайн калькулятор SPARC для определения образцов, существующих при физиологическом значении pH (7,4) (<http://ibm1c2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>). Трехмерную модель ионизированных соединений строили из стандартных фрагментов библиотеки и их геометрию последовательно оптимизировали с использованием Tripos force field (3), включая электростатический показатель, рассчитанный из атомных зарядов по Гаштейгеру и Хюккелю (Gasteiger and Hückel). Метод Повелла (Powell), доступный в процедуре Maximin2, использовали для минимизации энергии до величины градиента менее 0,001 ккал/мол. Å.

Структуру человеческого PPAR $\gamma$  лигандсвязывающего домена получили из его комплексной рентгеновской кристаллической структуры с тезаглитазаром (AZ 242), доступной в белковом банке данных RCSB (1171), (4,5). Гибкий докинг соединений в активном сайте рецептора выполняли с использованием программы GOLD (6). Наиболее стабильные модели докинга выбирали согласно наиболее выигрышной конформации, предсказанной GoldScore (6) X-Score оценочными функциями (7). Комплексы были энергетически минимизированы по методу Повелла, доступному в процедуре Maximin2, с Tripos force field и с диэлектрической постоянной 4,0 до достижения величины градиента 0,01 ккал/мол. Å. Использовали нормализованную функцию, определяя вокруг лиганда "горячий" регион (10 Å) и регион, представляющий интерес (15 Å).

## Результаты

Исследования по молекулярному моделированию докинга с рецептором прогнозируют, что в целом S-энантиомер является более активным, чем R-энантиомер, несмотря на то, что R-энантиомер также проявляет активность. Данный феномен, когда один энантиомер является более биологически активным, чем другой, хорошо известен.

Как следствие, настоящее изобретение представляет способ разделения соединений на энантиомеры. Способ разделения схематически показан на фиг. 11.

Без связи с какой-либо теорией авторы полагают, что S-энантиомеры соединений обеспечивают более высокую активность.

Пример 3. Воздействия заявленного соединения на активацию PPAR $\gamma$

## Материалы и методы

### Материалы

5-ASA приобрели в Sigma-Aldrich<sup>TM</sup> (St Quentin Fallavier, Франция), розиглитазон приобрели в Spi Bio<sup>TM</sup> (Massy, Франция). Новую молекулу синтезировали, как описано в примере 1. Структура его показана на фиг. 1.

### Клеточные линии

Клеточные линии карциномы толстой кишки HT-29 STD (ATCC HTB-38) выращивали по стандартной методике в DMEM, дополненной 10% термоинактивированной FCS и антибиотиками. Клетки выращивали в монослоях, инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и 95% относительной влажности.

### Временная трансфекция PPAR $\gamma$ и стимуляция клеток

Клетки HT-29 STD были временно трансфицированы трансфекционным реагентом Effectene<sup>TM</sup> (Qiagen<sup>TM</sup>) согласно инструкциям от производителя. Чтобы проверить PPAR $\gamma$  активацию, выполняли трансфекцию 500 нг минимальной промоторной конструкции, содержащей две копии PPRE, полученные из цитохрома p450 4A (2XCYP) (1). Празмида renilla luciferase (0,1 мкг/лунка) также была трансфицирована в качестве внутреннего контроля для мониторинга эффективности трансфекции и нормирования активности светлячковой люциферазы. Трансфицированные клетки оставляли для 24-часовой инкубации при 37°C. Стимуляции выполняли после инкубации клеток в течение 18 ч с соединением 20 в концентрации 1 мМ и сравнивали с двумя синтетическими лигандами PPAR $\gamma$  5-ASA (30 мМ) (2) и розиглазоном (10<sup>-5</sup> М) (2), использованными в качестве положительных контролей. Регулировали pH растворов лекарств до 7,4 NaOH. Общие клеточные экстракты готовили, используя пассивный лизисный буфер (Promega<sup>TM</sup>, Madison, Wis.). Люциферазную активность оценивали в 20 мкл экстракта, используя аналитическую систему Promega Dual Luciferase согласно протоколу производителя. Трансфекции оценивали в триплетах, в по меньшей мере трех отдельных экспериментах. Люциферазную активность выражали как кратную активности, полученной в клетках, обработанных различными молекулами, деленной на люциферазную активность нестимулированных клеток.

### Результаты

Активация PPAR $\gamma$  дает в результате каскад реакций, приводящих к связыванию специфических элементов последовательности ДНК, названных элементами пероксисомального пролиферативного ответа (PPRE) (7-9).

Исследовали PPAR $\gamma$  транскрипционную активность временными трансфекциями эпителиальных клеток renilla luciferase и PPRE плазмидами. Чтобы оценить, имеют ли новые молекулы большую эффективность, чем 5-ASA для стимулирования активации PPAR $\gamma$ , данные молекулы тестировали в концентрации 1 мМ. Воздействие новой молекулы в концентрации 1 мМ сравнивали с 5-ASA и розиглазоном, использованным как положительные контроли в оптимальных концентрациях 30 мМ и 10<sup>-5</sup> М, соответственно. Клетки стимулировали в течение 24 ч.

Анализ PPAR $\gamma$  активности в трансфекторных клетках HT-29 показал, что соединение при 1 мМ увеличивало активность репортерного гена, таким образом, демонстрируя активность, сходную или превосходящую 30 мМ 5-ASA (2,8±0,7) и 10<sup>-5</sup> М розиглазона (3,17±0,29).

На фиг. 2 представлены все результаты, полученные для каждой молекулы, оцененные в 2 или 3 экспериментах, сделанных в триплетах. Воспроизводимость между различными экспериментами является хорошей и сходной с данными, описанными в литературе.

Настоящее исследование позволило идентифицировать новую молекулу, имеющую от 30 до 50 раз большую эффективность, чем 5-ASA, для активации PPAR $\gamma$ .

### Пример 4. Рост клеток рака толстого кишечника

Проверяли способность соединения 20 изменять рост клеток рака толстой кишки. Для этого использовали три клеточные линии карциномы толстого кишечника человека (а именно HT-29, HT-115 и DTD-1). Данные виды клеток выбирали на основе экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2). Фактически клетки HT-115 экспрессируют биологически активную COX-2, HT-29 экспрессируют нефункциональную изоформу COX-2, и DTD-1 являются COX-2 дефицитными клетками. Полагают, что указанная молекула также является активными на клетках, которые не экспрессируют COX- и, следовательно, соединение настоящего изобретения может быть использовано в клетках, которые не экспрессируют COX-2, с целью лечения опухолей и в других применениях, описанных в настоящей заявке.

Клетки линий HT-29 и DTD-1 культивировали в средах McCoy и RPMI1640, соответственно, дополненных 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS), 1% пенициллином, стрептомицином (P/S) и 50 мг/мл гентамицином. HT-115 культивировали в среде DMEM, дополненной 15% FBS и 1% P/S. Клетки сохраняли в увлажненном инкубаторе при 37°C при наличии 5% CO<sub>2</sub>.

Для анализов клеточного роста клонированные супензии высевали по 2×10<sup>3</sup> клеток/лунка (4×10<sup>3</sup> клеток/лунка для HT115) в 96-луночные культуральные планшеты в среде, содержащей 0,5% FBS, и давали прилипнуть. Не адгезированные клетки затем удаляли, и в каждую лунку добавляли свежую среду, содержащую 0,5% FBS. Клетки культивировали в присутствии указанных субстанций или без них. Каждую субстанцию растворяли в виде 25 мМ стокового раствора в культуральной среде, содержащей 0,5% FBS, и при необходимости pH каждого стокового раствора доводили NaOH до 7,4. Субстанции использовали в конечной концентрации в диапазоне от 0,5 до 10 мМ.

Клеточную пролиферацию определяли, измеряя включение 5-бром-2'-деоксиуридина (BrdU) в ДНК с использованием коммерчески доступного набора для клеточной пролиферации. (Roche Diagnostics, Monza, Италия). BrdU добавляли к клеточным культурам в течение последних 6 ч инкубации и опреде-

ляли уровень BrdU-положительных клеток через 48 ч культуры фермент-связанным иммуносорбентным анализом (ELISA). Оптическую плотность (OD) определяли при 450 нм ELISA ридером. Эксперименты выполняли в триплетах, и результаты представляли как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

### Результаты

Наряду с заявленным соединением 20 также исследовались его аналоги. Соединения различались по своей способности ингибировать рост клеток рака толстой кишки. Результаты представлены в табл. 1, где показан процент ингибирования роста клеток DTD-1 указанными соединениями. Субстанция 20 демонстрирует выраженное антитромиферативное действие в дозозависимой форме на каждой из трех тестированных клеточных линий (фиг. 3). Наблюдается более 90% ингибирования клеточного роста при использовании соединений в конечной концентрации 10 мМ. Способность соединения 20 существенно ингибировать клеточный рост видна при его применении в конечной концентрации 5 или 10 мМ.

Соединения 34 и 39 при использовании в высоких дозах немного снижали клеточный рост, но различия между группами были не достоверны. Также не наблюдали ингибирования клеточного роста в культурах с добавлением субстанций 35 и 40 (см. табл. 1).

### Заключение

Показано, что заявленные соединения воздействуют на ингибирование роста клеточных линий рака толстой кишки HT-29, HT-115 и DLD1 в различной степени. Субстанция 20 демонстрирует выраженное антитромиферативное действие на тестированных клеточных линиях.

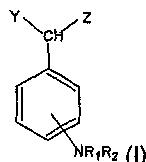
Соединение 20 настоящего изобретения также активно на клетках, которые не экспрессируют COX-2, и, следовательно, может быть использовано в клетках, которые не экспрессируют COX-2, с целью лечения опухолей и в других применениях, описанных в настоящем документе.

### Общий вывод

Синтезированные высоко ранжированные соединения, показанные в исследованиях по моделированию, проявляют активность, которая равна или превосходит активность месалазина.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Соединения с общей формулой (I)



в которой  $NR_1R_2$  присоединен к фенильному кольцу в 3-положении;

$R_1$  и  $R_2$ , которые могут быть одинаковы или различны, выбирают из группы, состоящей из -Н или линейной или разветвленной алкильной группы, содержащей от 1 до 6 атомов углерода, или вместе образуют 5- или 6-членное ароматическое или алифатическое кольцо;

Y выбирают из группы, состоящей из Н, COOH и -CH( $OR_3$ )COOH;

Z представляет собой -CH( $OR_3$ )COOH;

$R_3$  представляет собой Н.

#### 2. Соединение по п.1, где Y представляет собой Н.

#### 3. Соединение по п.1 или 2, представляющее собой $(\pm)$ -2-гидрокси-3-(3'-аминофенил)пропионовую кислоту.

#### 4. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому одному из пп.1-3, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

#### 5. Фармацевтическая композиция по п.4, где соединение представляет собой смесь, в которой один энантиомер присутствует в избытке по отношению к другому в любой пропорции.

#### 6. Применение соединения по любому одному из пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения хронического воспалительного заболевания.

#### 7. Применение соединения по любому одному из пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения болезни Крона или язвенного ректоколита.

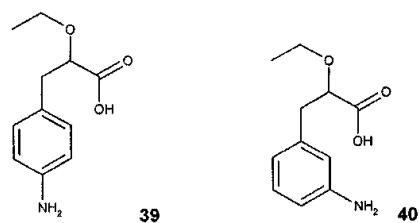
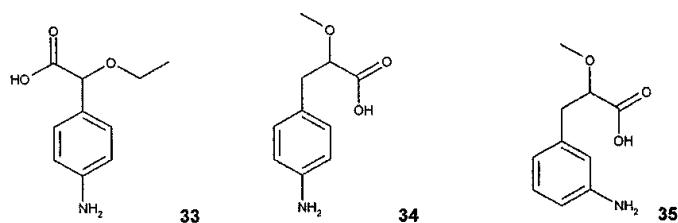
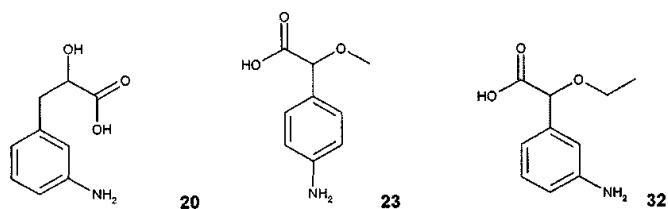
#### 8. Применение соединения по любому одному из пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения рака толстой кишки.

#### 9. Применение соединения по любому одному из пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения опухоли пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, молочной железы, матки и придатков, почек и легких.

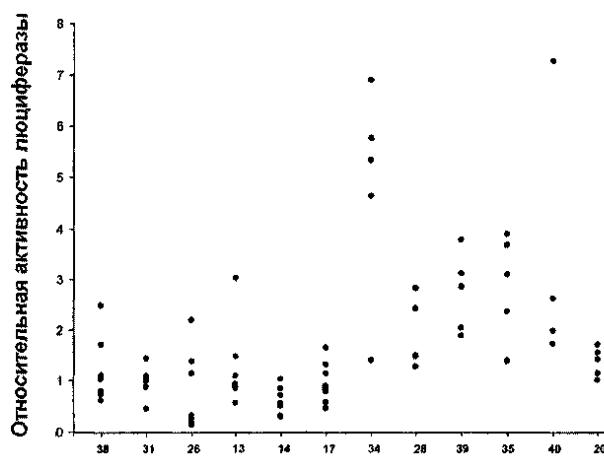
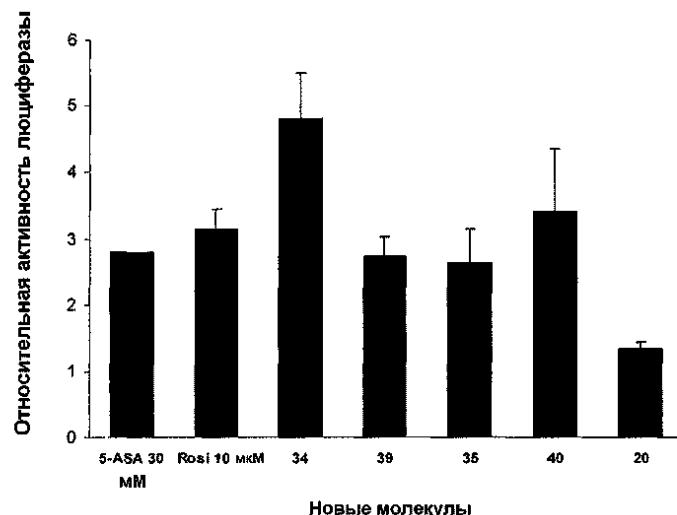
Таблица. Процент ингибирования клеток DLD-1 дифференцированными дозами (0,5-10 мМ) указанных соединений

MM	0.5	1	2.5	5	10
2-20	4.3	12.8	16.2	25.6	47
2-34	0	3.6	1.8	3.6	15.1
2-35	0	3.2	1.6	6.4	4.8
2-39	1.6	3.3	8.2	11.5	12.8
2-40	2	0	0	0	2.7

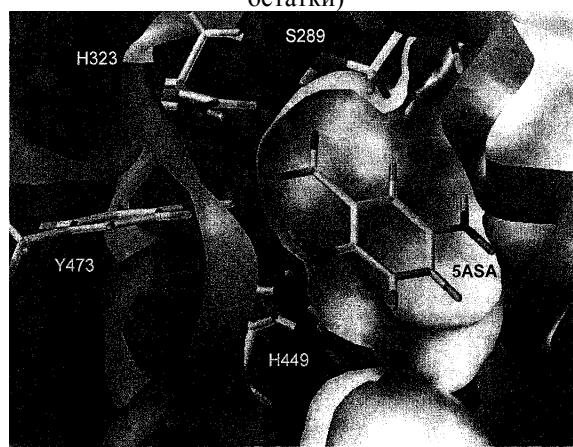
Фиг. 1



Фиг. 2. Структура соединений 20, 23, 32, 33, 34, 35, 39, 40

Фиг. 3. Анализ активности PPAR $\gamma$ 

Докинг 5-аминосалициловой кислоты (месаламин) и рецептора PPAR $\gamma$  (обозначены аминокислотные остатки)



Фиг. 4

