

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900310** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.02.28

(51) Int. Cl. *A61K 31/505* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.27

(54) **СРЕДСТВО С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ**

(31) 2018126831

(32) 2018.07.20

(33) RU

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ
ИМЕНИ В.В. ЗАКУСОВА" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Коваленко Лариса Петровна,
Никитин Сергей Васильевич, Дурнев
Андрей Дмитриевич, Гудашева
Татьяна Александровна (RU)**

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической и медицинской промышленности, конкретно к средствам, обладающим способностью замедлять опухолевый рост и подавлять процессы метастазирования новообразований, а именно к новому противоопухолевому средству - производному 5-оксипиридина:хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин (СНК-578) и его применению в качестве средства, обладающего противоопухолевой, антиметастатической активностью, а также обладающему противовоспалительным и противоаллергенным действием. Производное 5-оксипиридина:хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин получают путем взаимодействия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридина в сухом ацетоне с насыщенным раствором хлористого водорода в диоксане. Производное 5-оксипиридин:хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин расширяет арсенал средств для лечения онкологических заболеваний, обладающих выраженной противоопухолевой, антиметастатической активностью и одновременно противовоспалительным и противоаллергенным действием. Изобретение обеспечивает повышение противоопухолевой активности и может быть использовано в качестве самостоятельного противоопухолевого средства и одновременного повышения эффективности цитостатического лечения онкологических больных. Изобретение приемлемо для использования в качестве противоопухолевого средства для адъювантной иммунотерапии, с выраженной антиметастатической активностью, а также в качестве профилактического средства при лечении сезонных поллинозов. Новое средство лишено нежелательных побочных эффектов, присущих фторированным пиридинам и антрациклиновым антибиотикам.

A1

201900310

201900310

A1

МПК А61К31/505

МПК А61Р35/00

МПК А61Р37/02

**СРЕДСТВО С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТЬЮ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И
ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ**

Изобретение относится к химико-фармацевтической и медицинской промышленности, конкретно к новому противоопухолевому средству – производному 5-оксипиримидина: хлоргидрат 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидин (СНК-578) и его применению в качестве средства, обладающего противоопухолевой, антиметастатической активностью, а также обладающему противовоспалительным и противоаллергическим действием.

За последние 10 лет прирост по онкологическим заболеваниям по данным ВОЗ составил около 15%. Онкологические заболевания уносят каждый год не менее 300 тыс. жизней только в России, в течение следующих 5-7 лет, по прогнозам ВОЗ, смертность из-за онкологических заболеваний выйдет на первое место в мире. Ежегодно рак диагностируется у 14 млн. человек, но, как предполагается, к 2025 году эта цифра достигнет 19 млн. в год, 22 млн. к 2030 году и 24 млн. к 2035 году. Количество смертей от онкологических заболеваний возрастёт до 13 миллионов в год.

В настоящее время, кроме классических подходов (хирургии, химио- и лучевой терапии), наиболее приоритетным направлением создание таргетных средств лечения для раковых заболеваний. Однако им присуща специфическая токсичность в виде энцефалопатии (CRES) и цитокинового шторма (CRS). Токсичность каждого таргетного препарата имеет свои особенности. В частности, трастузумаб обладает кардиотоксичностью, что ограничивает возможности его комбинации с антрациклинами, а при использовании бевацизумаба описаны гастроинтестинальные перфорации. Побочные эффекты как правило бывают обратимы, но в ряде случаев могут быть жизнеугрожающими и даже приводить к смерти [В.А.Чубенко. Практическая онкология, 2010, т.11, №3, с.192-202].

В связи с многообразием различных форм рака, различным уровнем нарушений иммунного гомеостаза, связанных с возрастными и генетическими особенностями больных, в настоящее время активно развиваются различные направления иммуноонкологии.

Хроническое воспаление и стресс часто являются причиной активации синтеза цитокинов, нарушения сигнальных путей, возникновения вторичного иммунодефицита, в результате которого нарушается баланс Th1 и Th2 хелперных клеток. При аллергии и ряде онкологических заболеваний наблюдается сдвиг в сторону Th2 хелперов, а при псориазе, аутоиммунных заболеваниях, рассеянном склерозе отмечается сдвиг в сторону Th1 хелперных лимфоцитов. Провоспалительный цитокин IL-6 является связующим звеном через сигнальный путь JAK/STAT3 между воспалением и стимуляцией пролиферации и выживаемости раковых клеток, стимуляцией метастазирования многих видов рака, в частности эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC). При развитии опухолевого процесса происходит активация синтеза цитокинов в различных клетках, в том числе и раковых, в частности плеiotропного ИЛ-4, медиатора дифференцировки Т-лимфоцитов по Th-2 типу. При синтезе специфического иммуноглобулина IgE, вызывающего аллергические реакции немедленного типа, участие ИЛ-4, совместно с ИЛ-5 и ИЛ-13, также обязательно. При онкологических заболеваниях ИЛ-4 действует через STAT6 сигнальный путь, увеличивает резистентность к CD95-зависимому апоптозу раковых клеток, вызывает активацию развития опухоль-ассоциированных иммунодепрессивных макрофагов (TAM), стимулирующих ангиогенез и усиливающих инвазию, выживание и постоянный рост опухолевых клеток. Связанные с опухолью макрофаги (TAM) появились как критический тип регуляторных клеток в микроокружении опухоли, с выраженной способностью облегчать начало образования опухоли, прогрессирование ее роста и метастазирование. ИЛ-4 в настоящее время рассматривается как новая фармакологическая мишень при раковых заболеваниях [R. Noy, J.W. Pollard. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity Review* 2014, 41, p.49-61; Hao-Wei Wang, J.A. Joyce1. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4. Priming for protumoral functions. *Cell Cycle*, 2010, V.9, p. 4824-4835].

Согласно классификации противоопухолевых средств предложенной ВОЗ, фторированные пиримидины относятся к антиметаболитам разрушающим ДНК, что ведет к гибели опухолевых клеток. Классическим цитостатическим препаратом из группы антиметаболитов пиримидиновых оснований является фторафур, который также оказывает противовоспалительное и анальгетическое действие. Фторафур (тегафур) в настоящее время применяется при онкологии желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы. Фторафур менее токсичен и более эффективен, чем флуороурацил, но его прием может вызывать целый ряд токсических проявлений (тошноту, рвоту, боль в желудке, головокружение, диарея; редко – желудочно-кишечные кровотечения, язву желудка и двенадцатиперстной кишки, стоматит, нарушение функции печени и почек,

иногда острый панкреатит, угнетение кроветворения, нарушение сердечной деятельности, реакции гиперчувствительности. Возможны тяжелая лейкопения, тромбоцитопения, анемия, поражение печени (острый гепатит), дегидратация организма, тяжелое воспаление кишечника, симптомы лейкоэнцефалита, интерстициальная пневмония, аносмия, стенокардия покоя). В Японии фторафур применяют одновременно с урацилом в одной лекарственной форме для уменьшения его токсических свойств (UFT).

Доксорубин относится к противоопухолевым антибиотикам антрациклинового ряда, который обладает активностью на всех стадиях клеточного цикла, оказывает прямое цитотоксическое действие. Препарат часто используется как препарат сравнения при изучении противоопухолевых свойств новых соединений, влияющих на клеточный цикл, в частности тиено [2,3-d] пиримидины обладали в опытах *in vitro* более выраженными противоопухолевыми свойствами по сравнению с доксорубицином, увеличивая ядерную экспрессию апоптоза в раковых клетках [AE Kassab, EM Gedawy et al. Chem. Pharm. Bull., 2016, 64, 490–496]. Антрациклины интеркалируют (встраиваются) между двумя нитями ДНК за счет реакции с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Другим механизмом противоопухолевого действия антрациклинов является образование одиночных и двойных разрывов ДНК, которые вызываются свободными радикалами, вызывающими выраженную кардиотоксичность доксорубина. Кроме того, доксорубин вызывает ряд тяжелых побочных эффектов со стороны жизненно важных систем организма: подавление костно-мозгового кроветворения и иммунных реакций организма, кардиотоксическое действие, нарушение деятельности желудочно-кишечного тракта, аллергические реакции, воспаление и изъязвление слизистых оболочек полости рта, флебосклероз, при попадании в окружающие ткани – тяжелый целлюлит, некроз [Противоопухолевая химиотерапия: Справочник. / Под ред. Переводчиковой Н.И. М.: Медицина, 1993. 224 с.; Шаповалова С.П., Малкова И.В. Действие доксорубина на иммуногенез. Антибиотики и химиотерапия. 1983. №4. С. 304-307; Ипатова О.М., Зыкова М.Г., Прозоровский В.Н. и др. Биомедицинская химия, 2009 т.55, №5, с.185-194].

В отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» поиск соединений, сочетающих противоопухолевую, иммунологическую и противовоспалительную активность среди производных 5-оксипиримидина привел к созданию 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидина (СНК-411) (патент RU 2518889) – средства, характеризующегося иммуномодулирующими и адаптогенными свойствами, и отсутствием побочных эффектов по сравнению с фторированным пиримидином фторафуром и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином.

Показано, что СНК-411 при в/б введении в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг или при пероральном введении в дозе 100 мг/кг значительно ингибирует рост карциномы легкого LLC у мышей C57BL/6; уменьшает содержание биомаркера опухолевой прогрессии ИЛ-4, пролиферативного ИЛ-2 и провоспалительного ИЛ-6; увеличивает выживаемость у животных с LLC. СНК-411 обладает некоторыми цитотоксическими свойствами, в больших концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М уменьшает долю жизнеспособных клеток линии К-562 и в концентрации 10^{-5} М значительно увеличивает гибель К-562, индуцированную мононуклеарами периферической крови человека.

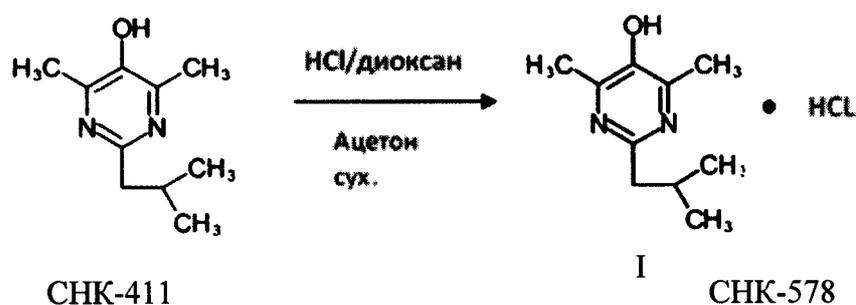
Однако СНК-411 отличается плохой растворимостью (растворение при температуре $+70^{\circ}$) и недостаточно выраженная противоопухолевая активность на поздних сроках развития опухолей.

Задачей настоящего изобретения было создание нетоксичного эффективного противоопухолевого средства, обладающего выраженной противоопухолевой, антиметастатической, иммунологической и противовоспалительной активностью, обладающего улучшенными технологическими характеристиками.

Для получения препарата с улучшенными технологическими характеристиками, более выраженной противоопухолевой и антиметастатической активностью с возможным участием в контроле баланса между Т-хелперами первого и второго типов было синтезировано новое соединение: хлоргидрат 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидин (СНК-578).

Синтез соединения СНК-578 основан на том, что 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидин растворяют в сухом ацетоне, нагревают и к полученному раствору прикапывают насыщенный раствор хлористого водорода в диоксане до pH 2-3 с образованием соединения I (схема 1). Полученное соединение СНК-578 быстро растворяется в воде при комнатной температуре.

Схема 1. Получение соединения СНК-578



Неожиданно было обнаружено, что соединение СНК-578 обладает большей терапевтической активностью и эффективностью по сравнению с СНК-411 – наблюдается большая выраженность противоопухолевого и антиметастатического действия у соединения при использовании его в уменьшенной в 2,5 раза терапевтической дозе; а также кроме противовоспалительных свойств, присущих и СНК-411, новое соединение обладает выраженной противоаллергенной активностью. Также было показано, что совместное применение СНК-578 с доксорубицином приводит к усилению противоопухолевого и противометастатического действия соединений.

Техническим результатом изобретения является расширение арсенала средств для лечения онкологических заболеваний, обладающих выраженной противоопухолевой, антиметастатической активностью, и одновременно, противовоспалительным и противоаллергенным действием, при отсутствии нежелательных побочных эффектов. Изобретение может быть использовано в качестве самостоятельного противоопухолевого средства и одновременного повышения эффективности цитостатического лечения онкологических больных. Средство приемлемо для использования в качестве противоопухолевого средства для адъювантной иммунотерапии, с выраженной антиметастатической активностью, а также в качестве профилактического средства при лечении сезонных поллинозов.

Осуществление настоящего изобретения демонстрируется нижеследующими примерами, не ограничивающими его объем.

Пример 1:

Получение хлоридрата 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидина

К 3,6 г (0,02 моль) 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидина в 30 мл сухого ацетона прибавляют насыщенный раствор хлористого водорода в диоксане до pH 2-3 и нагревают до полного растворения, кипятят 5 минут, охлаждают реакционную массу, выпавший осадок отфильтровывают, снова кипятят в сухом ацетоне, охлаждают, отфильтровывают осадок и сушат. Получают 3,2 г (73,9%) продукта. Температура плавления 152-154 °С

Спектр ЯМР ¹H (DMSO -d₆) δ м.д. : 0,91 (д, 6H, J=6,7 Hz, (CH₃)₂); 2,18 (м, 1H, J₁=7,2 Hz, J₂=6,7 Hz); 2,57 (с, 6-H, (CH₃)₂); 2,82 (д, 2H, J=7,2, CH₂); 10,7 (с, 1H, OH);

Найдено, %: С 55,9; Н 7,80; Cl 16,12. C₁₀H₁₇Cl₁N₂O₁

Вычислено, %: С 55,43; Н 7,85; Cl 16,40.

Присоединение хлористого водорода к 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидинукратно увеличивает растворимость полученной соли в воде.

Пример 2

Противовоспалительные свойства СНК-578 на модели реакции воспаления, вызванной субплантарным введением Конканавалин А

Изучение противовоспалительных свойств новых производных 5-оксипримидина проводили в двух сериях опытов на мышах линии СВА массой 18-20 г, которым однократно внутрибрюшинно (в/б) вводили СНК-411 и СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг и препарат сравнения диклофенак в дозе 10 мг/кг.

Через 1 час после введения веществ мыши субплантарно получали 20 мкл конканавалин А (Кон А) в концентрации 5 мг/мл; в контралатеральную конечность вводили тот же объем изотонического раствора натрия хлорида.

Через 1 час животных забивали, определяли массу лап и подсчитывали индекс реакции воспаления [Методические рекомендации по оценке аллергизирующих свойств лекарственных средств // в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М. Гриф и К, 2012, с. 61].

Показано, что введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг мышам подавляет реакцию воспаления на Кон А в 3,5 раза, а СНК-411 – в 2 раза по сравнению с показателем контрольной группы, получавшей только Кон А (табл. 1).

Таблица 1.

Изучение противовоспалительных свойств СНК-411 и СНК-578 в сравнении с диклофенаком на модели реакции воспаления на Кон А

Группа, доза вещества, способ введения	Индекс реакции	
	Контроль ИР Кон А, n= 10	17,8±2,1
Диклофенак, 10 мг/кг в/б, n= 10	11,2±1,1*	9,1±1,3*
	СНК-411	СНК-578
10 мг/кг в/б, n= 10	8,7±2,1*	4,6±2,0**
25 мг/кг в/б, n= 10	6,0±2,3*	5,2±2,5*
50 мг/кг в/б, n= 10	9,5±2,3*	6,0±1,8*

Примечание: n – количество животных; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента.

При этом у новых производных 5-оксипримидина – СНК-411 и СНК-578 выявлены более выраженные противовоспалительные свойства в сравнении с диклофенаком,

наиболее значимые при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг на фоне которого отмечалось снижение в 1,98 раза индекса реакции по сравнению с показателем группы, получавшей диклофенак (на уровне тенденции: $p=0,075$).

Таким образом на модели реакции воспаления, вызванной субплантарным введением Конканавалин А, показана выраженная противовоспалительная активность нового соединения СНК-578: хлоргидрата 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиримидина, превосходящая активность препарата сравнения диклофенака и СНК-411.

Пример 3

Противоаллергенная активность СНК-578 на экспериментальной модели анафилаксии на овальбумин у морских свинок альбиносов

По данным литературы, в В-лимфоцитах запуск каскада фосфорилирования по пути IL-4R/STAT6 индуцирует переключение синтеза изотипов иммуноглобулинов на IgE. Учитывая данные о подавлении СНК-411 уровня ИЛ-4 в опытах с карциномой легкого Lewis (LLC), была изучена противоаллергенная активность СНК-578 на модели анафилаксии на овальбумин.

Исходя из экспериментальных доказательств алергизирующих свойств классического аллергена овальбумина была выбрана модель сенсibilизации интактных морских свинок альбиносов массой 250-300 г 0,6% раствором белка куриного яйца (БКЯ), основным аллергенным компонентом которого является овальбумин [Хлопушина Т.Г., Кринская и др. Влияние зиксорина на фармакокинетику антипирина у интактных и сенсibilизированных морских свинок. Бюлл. exper. биол. 1991. № 7. с. 67-69]. Введение 2-3 мкг овальбумина приводит к 100% гибели всех животных. Для получения более слабой системной реакции анафилаксии животных контрольной и опытных групп иммунизировали перорально 0,6% раствором БКЯ, основным компонентом которого является овальбумин, в дозе 1 мл на 250 г массы тела в течение трех дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводили через мягкий пластмассовый зонд). Через 12 дней после начала иммунизации БКЯ животным опытных групп в течение трех дней внутрибрюшинно вводили СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг, контрольным животным - соответствующий объем физиологического раствора. На следующие сутки животным опытных групп внутрисердечно вводили СНК-578 в дозе 50 мг/кг, контрольным животным - физиологический раствор. Через 1 час животным всех групп внутрисердечно вводили БКЯ, после чего регистрировали развитие анафилактической реакции. Затем проводили вычисление анафилактического индекса по Weigle. У всех животных развивалась реакция анафилаксии различной степени тяжести (табл. 2).

Таблица 2.

Противоаллергенные свойства СНК-578 на модели анафилаксии вызванной введением БКЯ морским свинкам альбиносам

Группа,	Индекс реакции по Weigle	0 (отсутствие реакции)	+ (слабый шок)	++ (умеренный шок)	+++ (тяжелый шок)	++++ (гибель)
Контроль БКЯ 0,6%, n=8	2,5	-	3	1	1	3
БКЯ 0,6% + СНК-578 25 мг/кг, n=8	0,9**	5**	1	1	-	1
БКЯ 0,6% + СНК-578 50 мг/кг, n=8	0,25**	6**	2	-	-	-

Примечание: n – количество животных; ** - $p < 0,01$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента.

Индекс реакции у контрольной группы животных составил 2,5. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг индекс реакции по Weigle составил 0,9, а при введении в дозе 50 мг/кг - 0,25. Таким образом, СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг обладает выраженным противоаллергенным действием, в 2,8 и в 10 раз подавляя реакцию системной общей анафилаксии на овальбумин у морских свинок альбиносов. При этом введение СНК-578 в дозах 50 мг/кг полностью предотвращало развитие анафилактической реакции у 75% животных, и только у 25% наблюдался слабый шок, тогда как в группе, получавшей только БКЯ, гибель отмечалась у 37,5% мышей, а тяжелый и умеренный шок – у 12,5% животных, соответственно, и слабый шок – у 37,5% животных. На фоне введения СНК-578 в дозе 25 мг/кг анафилактической реакции на БКЯ не было у 62,5% животных, и у 12,5% животных наблюдались слабый шок или умеренный шок или гибель.

Таким образом СНК-578 обладает противоаллергенными свойствами, особенно выраженными при применении соединения в дозе 50 мг/кг.

Пример 4

Изучение противоопухолевой активности СНК-578 на экспериментальной модели рака шейки матки у мышей линии СВА

При изучении противоопухолевой активности СНК-578 в качестве экспериментальной модели злокачественного роста был использован рак шейки матки (РШМ-5). Штаммы опухолевых клеток были получены из банка клеточных культур НИИ

ЭДнТО РОНЦ имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток РШМ-5 имплантировали 60 самкам мышей линии СВА подкожно в область подмышечной впадины по 30 мг в 0,3 мл раствора Хэнкса на мыш. Стандартная прививочная доза составляла не менее 3×10^6 клеток/мыш. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли.

СНК-578 в дозе 10 мг/кг и СНК-411 в дозе 25 мг/кг вводили в/б в течение 2-х недель со 2 по 15 дни развития опухоли. В качестве контроля и совместно с СНК-411 и СНК-578 вводили доксорубицин. Доксорубицина гидрохлорид (ЭБВЕ Фарма Гес.м.б.Х.Нфг.КГ, Австрия) вводили однократно в/б на 2 день развития опухоли в дозе 4 мг/кг.

Животных рандомизировали случайным образом в следующие группы:

1. активный контроль (РШМ-5), которым вводили дистиллированную воду,
2. РШМ-5 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг,
3. РШМ-5 и СНК-411 в дозе 25 мг/кг,
4. РШМ-5 и доксорубицин в дозе 4 мг/кг,
5. РШМ-5, СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг,
6. РШМ-5, СНК-411 в дозе 25 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг.

Перевиваемая опухоль РШМ-5 является плоскоклеточной раковой опухолью, высота которой при диаметре 30 мм не всегда достигает 2 мм. В связи с этим измерение ее объема дает необъективные результаты. На 7 сутки после окончания 2-х недельного введения веществ животных забивали, извлекали опухоль и взвешивали на аналитических весах. Противоопухолевый эффект регистрировали по массе опухоли в момент забоя. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО}\% = \frac{M_{\text{контроля}} - M_{\text{опыта}}}{M_{\text{контроля}}} \times 100.$$

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты выражали в виде средней арифметической и ее средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро-Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью критерий Манна-Уитни.

В таблице 3 приведены результаты, характеризующие массу развивающейся опухоли и ТРО% при введении соединения СНК-578, СНК-411, доксорубицина и совместного введения доксорубицина с СНК-578 и СНК-411. Как видно из таблицы, двухнедельное в/б введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг вызывает выраженное торможение

роста опухоли: степень торможения ТРО на фоне соединения составляет 86,5%. Совместное введение СНК-578 и доксорубина не увеличивало степень торможения роста опухоли, что возможно связано с высокой активностью СНК-578.

Степень торможения роста опухоли при введении СНК-411 составляет 46,3%, что в 1,9 раза ниже соответствующего значения группы, получавшей СНК-578.

При совместном введении СНК-411 и доксорубина отмечается аддитивность эффекта от совместного введения соединений: степень торможения роста опухоли составила 66,4%, что было в 1,43 и в 2,1 раза выше соответствующего показателя при монотерапии СНК-411 в дозе 25 мг/кг и доксорубина в дозе 4 мг/кг, соответственно (табл. 3).

Таблица 3

Противоопухолевое действие СНК-578, СНК-411, их комбинаций с доксорубином и доксорубина на модели рака шейки матки у мышей линии СВА

Группы, доза, количество животных	Масса опухоли (мг)	Степень торможения роста опухоли, ТРО%
Контроль РШМ-5, n=10	1249,8±168,6	-
РШМ-5+СНК-578 10 мг/кг, n=10	168,8±53,6*	86,5
РШМ-5+СНК-411 25 мг/кг, n=10	669,3±155,8*	46,3
РШМ-5+Доксорубин 4 мг/кг, n=10	855,1±148,7	31,6
РШМ-5+СНК-578 10 мг/кг+ Доксорубин 4 мг/кг, n=10	225,0±59,6*	82,00
РШМ-5+СНК-411 25 мг/кг+ Доксорубин 4 мг/кг, n=10	419,5±88,7*	66,4

Примечание: n – количество животных; * - $p < 0,05$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни.

Пример 5

Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности СНК-578 на экспериментальной модели меланомы В-16 у мышей линии С57В1/6

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована меланома В-16, штаммы опухолевых клеток которой получены из банка клеточных культур НИИ ЭДнТО РОНЦ имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток меланомы В-16 имплантировали 40 самцам мышей линии С57В1/6 подкожно в область подмышечной впадины по 50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мыш. Стандартная прививочная доза

составляла не менее 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли.

СНК-578 в дозе 10 мг/кг вводили в/б в течение 2-х недель со 2 по 15 дни развития опухоли. В качестве позитивного контроля и совместно с СНК-578 вводили доксорубицин (однократно в/б на 2 день развития опухоли в дозе 4 мг/кг).

Животных рандомизировали в следующие группы:

1. активный контроль (В-16), 1% раствор крахмала;
2. В-16 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг,
3. В-16 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг + Доксорубицин в дозе 4 мг/кг,
4. В-16 и Доксорубицин в дозе 4 мг/кг.

Измерение объема опухоли проводили после измерения 3-х ее размеров по формуле $V = \text{длина опухоли} \times \text{ширина опухоли} \times \text{высота опухоли}$ на 11, 15 и 21 сутки развития меланомы (7 сутки после окончания 2-х недельного введения веществ).

Противоопухолевый эффект регистрировали на 11, 15 и 21 сутки развития опухоли. Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО}\% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%$$

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты выражали в виде средней арифметической и ее средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро-Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью критерий Манна-Уитни.

На фоне введения СНК-578 (10 мг/кг, в/б, 14 дней), также как и при введении доксорубицина (4 мг/кг, в/б, однократно) снижения роста опухоли во все сроки наблюдения (11, 15 и 21 сутки) не обнаружено (табл. 4). Однако совместное введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг выявило достоверное уменьшение роста опухоли, что выразилось в снижении показателя ТРО% в 2,3 и 1,9 раза на 11 и 15 дни опыта, соответственно, по сравнению с группой, не получавшей лечения. На 21 сутки наблюдения показатель ТРО% в группе мышей, получавшей СНК-578, был в 1,4 раза меньше значений в контрольной группе, но не достигал статистической значимости.

Таблица 4

Влияние СНК-578 при 14-дневном внутрибрюшинном введении и совместно с доксорубицином на рост меланомы В-16 у мышей С57В1/6

Группы мышей с меланомой В16; n ≥ 9	ТРО % в различные сроки развития меланомы В-16		
	11 сут.	15 сут.	21 сут.
В-16, Крахмал, 1 %	755,3±94	2340±315	4447±1105
В-16 и СНК-578 10 мг/кг	716,1±167,8	2281±126	4675±775
В-16 и СНК-578, 10 мг/кг + Доксорубицин, 4 мг/кг	315,2±95,5**	1206±162**	3113±274
В-16 и Доксорубицин, 4 мг/кг	754,6±42,6	2169,7±399,5	3160,8±647,6

Влияние СНК-578 на процесс метастазирования в легких мышей оценивали на 21 сутки после инокуляции меланомы В-16 и забоя животных. После вскрытия мышей метастазы в легких изучали под лупой с 8-ми кратным увеличением (Magnifier Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). Частота метастазирования у животных контрольной группы составила 100%. В контроле у всех мышей выявили сливные узлы из метастазов различных размеров (табл. 5).

Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определялся по формуле:

$$\text{ИИМ} = (A \times B_k) - (A \times B) / A_k \times B_k \times 100\%,$$

где A_k и A – частота метастазирования в легких у мышей контрольной группы и опытной; B_k и B – среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах.

В случае большого количества метастатических узлов оценивали степень метастатического поражения по общепринятой шкале D. Train и J.E. Price (1979), позволяющей дифференцировать тяжесть поражения в зависимости от количества метастазов и их размеров. Выделяли низкую степень (LCP-low colonisation potential: 1 степень - < 10 узлов и 2 степень - от 10 до 30 узлов) и высокую степень метастазирования (HCP-high colonisation potential: 3 степень - > 30 узлов, отсутствуют сливные узлы; 4 степень - < 100, есть сливные узлы; 5 степень - > 100 узлов).

Согласно полученным данным, новое производное 5-оксипиримидина – СНК-578 обладает выраженной антиметастатической активностью в дозе 10 мг/кг при монотерапии и при совместном введении с доксорубицином в дозе 4 мг/кг на модели меланомы В16 в опытах на мышях С57В1/6 (табл. 5). На фоне монотерапии СНК-578 число метастазов было в 3,6 раза меньше, чем в контрольной группе, а индекс ингибирования метастазирования был равен 72,4%. Наибольший антиметастатический эффект был

обнаружен при совместном в/б введении СНК-578 в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг и доксорубина в дозе 4 мг/кг. Так, в группе получавшей два соединения у 6-и из 9-и мышей метастазы отсутствовали, у 3-х было обнаружено по 1, и 2 и 3 очень мелкие метастазы, подавление метастазирования проявлялось на 96,7%.

Таблица 5

Влияние СНК-578 при 14-дневном внутрибрюшинном введении и совместно с доксорубицином на метастазирование у мышей С57В1/6 с меланомой В-16

Группы мышей с меланомой В16; n ≥ 9	Среднее число метастазов (M±m)	Степень поражения легких метастазами, %						ИИМ, %
		LCP			HCP			
		0	1	2	3	4	5	
В-16, Крахмал, 1 %	18,1±3,1	-	14,3%	42,9%	-	35,7%	7,1%	-
В-16 и СНК-578 10 мг/кг	5,0±1,5**	12,5%	75%	12,5%	-	-	-	72,4%
		p<0,01						
В-16 и СНК-578, 10 мг/кг и Доксорубин, 4 мг/кг	0,6±0,3**	66,7%	33,3%	-	-	-	-	96,7%
		p<0,01						
В-16 и Доксорубин, 4 мг/кг	3,6±0,8**	14,3%	71,5%	7,1%	-	7,1%	-	80,1%
		p<0,01						

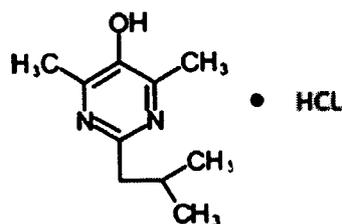
Примечание: ** - p<0,01 по сравнению с контрольной группой по t-критерию Манна-Уитни.

Таким образом, новое производное 5-оксипиридина: хлоргидрат 2-изобутил – 4,6-диметил – 5-оксипиридина (СНК-578) обладает противовоспалительными и противоаллергенными свойствами, выраженной противоопухолевой активностью, в частности, в отношении рака шейки матки (РШМ-5), выраженным антиметастатическим действием, в том числе при лечении меланомы В-16, при монотерапии и в сочетании с доксорубицином.

**СРЕДСТВО С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТЬЮ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И
ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ**

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевое и антиметастатическое средство, обладающее противовоспалительным и противоаллергическим действием, представляющее собой хлоридат 2-изобутил - 4,6-диметил - 5-оксипиримидина формулы 1



2. Применение средства по п.1. в качестве противоопухолевого средства для адъювантной противоопухолевой иммунотерапии и совместно с доксорубицином.
3. Применение средства по п.1 в качестве противоаллергического профилактического средства при сезонных поллинозах.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900310

Дата подачи: 27 июня 2019 (27.06.2019)		Дата испрашиваемого приоритета: 20 июля 2018 (20.07.2018)	
Название изобретения: СРЕДСТВО С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ			
Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В.В. ЗАКУСОВА»			
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)			
<input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
МПК:	A61K 31/505 (2006.01)	СПК:	A61K 31/505 (2013-01)
	A61P 35/00 (2006.01)		A61P 35/00 (2018-01)
	A61P 35/04 (2006.01)		A61P 35/04 (2018-01)
	A61P 37/08 (2006.01)		A61P 37/08 (2018-01)
			A61K 2121/00 (2013-01)
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)			
A61K 31/505, A61P 35/00, 35/04, 37/08			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
X A	RU 2518889 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В.В. ЗАКУСОВА" РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК) 10.06.2014, формула		1 2, 3
X A	DURNEV A. et al. Cytotoxicity testing of a new 5-pyrimidinol derivative (SNK-411) and the SNK 411/doxorubicin combination // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2014. – Vol. 115, Iss. S1. – P. 289, article 937 [Найдено 18.10.19], Найдено в < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcpt.12259_9 > с. 289, статья 937		1, 2 3
<input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении	
* Особые категории ссылочных документов:		"T" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"A" документ, определяющий общий уровень техники		"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"E" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"O" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"P" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"L" документ, приведенный в других целях	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке			
Дата действительного завершения патентного поиска:		22 октября 2019 (22.10.2019)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 Т. Ф. Владимирова Телефон № (499) 240-25-91	

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

ЕАПВ/ОП-2

Номер евразийской заявки:

201900310

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X A	КУЗНЕЦОВА О.С. Исследование иммунофармакологических свойств и противоопухолевой активности производного 5-оксипиримидина СНК-411 // Диссертация кандидата биологических наук, Москва – 2016 [Найдено 18.10.19], Найдено в < https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1289/Kuznecova_dissertacia.pdf > с. 85-88	1, 2 3