

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191040** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.07

(51) Int. Cl. *A61K 31/343* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.15

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ФЛАВАГЛИНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВАЦИИ ОНКОГЕНА KRAS

(31) 18200610.6

(32) 2018.10.16

(33) EP

(86) PCT/EP2019/077916

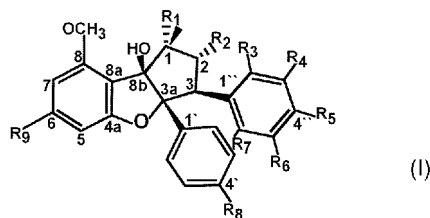
(87) WO 2020/078975 2020.04.23

(71) Заявитель:
КХР БИОТЕК ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Раджалингам Кришнарадж, Иуруги
Хадзие (DE)

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

(57) Изобретение относится к ингибиторам активации онкогена KRAS, которые представляют собой производные флаваглина, обладающие способностью к нацеливанию на прохибитин для ингибирования активации KRAS. Производное флаваглина согласно изобретению имеет общую формулу (I)



в которой R_1 представляет собой -HO, -COO, -C(NH)O, -CO(NH)N-(CH₃)₂, -CO(NH)(NH₂); R_2 представляет собой -H, -COO-CH₃, -CO(NH)-CH₃, -NO(CH₃)₂; каждый из R_3 , R_4 , R_5 независимо представляет собой -H, -OH; R_6 представляет собой -H, -OH, -F; R_7 представляет собой -H, -OH; R_8 представляет собой -H, -OCH₃, -Br, -F, -Cl; R_9 представляет собой -O-CH₃, -O-(CH₂)₂-NH-CH₃. Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько из указанных производных флаваглина, и к применению в способах ингибирования активации KRAS.

202191040

A1

A1

202191040

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 568244EA/022

ПРОИЗВОДНЫЕ ФЛАВАГЛИНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВАЦИИ ОНКОГЕНА KRAS

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новым ингибиторам активации онкогена KRAS, которые представляют собой производные флаваглина, обладающие способностью к нацеливанию на прохибитин, для специфического и эффективного ингибирования активации онкогена KRAS. Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько из указанных производных флаваглина, и к их применению в способах для ингибирования активации KRAS как *in vitro*, так и *ex vivo*. Кроме того, изобретение относится к применению указанных производных флаваглина для предупреждения или лечения заболеваний, в которые патологически вовлечена передача сигнала RAS, в частности пролиферативного нарушения или генетического нарушения с мутантным KRAS.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Белки RAS представляют собой группу близкородственных мономерных глобулярных белков, которые ассоциированы с плазматической мембраной и способны связываться либо с GDP, либо с GTP. RAS, который содержит связанный с ним GDP, соответствует "неактивному" состоянию, в то время как связывание GTP с RAS взамен GDP соответствует "активному" состоянию, так что белок способен взаимодействовать с другими белками нижеследующих мишеней. Белки RAS можно считать малыми GTP-азами, которые функционируют в качестве молекулярных переключателей, контролирующих передачу внеклеточных сигналов снаружи клетки в ядро посредством различных эффекторных белков (Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev.Cancer* **3**, 11-22 (2003)). Существует три изоформы RAS (KRAS, HRAS и NRAS), и их цикл активации регулируется связыванием GDP или GTP, которое в свою очередь контролируется посредством GAP или GEF (Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R. & Albert, S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim.Biophys.Acta* **1773**, 1177-1195 (2007)). В связанной с GTP форме они связываются с их эффекторными белками и запускают множество каскадов передачи сигнала, которые контролируют различные фундаментальные клеточные процессы. Практически 30% злокачественных опухолей человека имеют мутации с приобретением функции в онкогене RAS, и среди трех изоформ KRAS (85%) является одним из наиболее часто мутирующих онкогенов, за которым следуют NRAS (11%) и HRAS (4%) (база данных COSMIC). Многочисленные исследования продемонстрировали роль RAS в качестве "онкогенной движущей силы" при нескольких злокачественных опухолях (Hobbs, G. A., Der, C. J. & Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* **129**, 1287-1292, doi:10.1242/jcs.182873 (2016)). Обычно мутации RAS приводят к дефектам GAP-опосредуемого гидролиза GTP и, таким образом, приводят к накоплению RAS в связанном с GTP активном состоянии.

Большинство из мутаций в изоформах RAS задействуют три остатка, являющихся горячими точками (G12, G13 и Q61), и последние исследования продемонстрировали, что биологические последствия этих мутаций не являются идентичными (Miller, M. S. & Miller, L. D. RAS Mutations and Oncogenesis: Not all RAS Mutations are Created Equally. *Front Genet* **2**, 100, doi:10.3389/fgene.2011.00100 (2011)).

Несмотря на тщательные усилия на протяжении трех десятилетий, лекарственные средства, прямо нацеленные на онкогены RAS, не достигли клинического применения. Три изоформы RAS демонстрируют идентичность последовательностей 82-90%, и большинство отличий ограничиваются С-концевой областью HVR. То, вносит ли различие аминокислотных последовательностей в области HVR прямой вклад в различия биологических ответов, индуцируемых этими тремя изоформами RAS, не до конца понятно. Посредством альтернативного сплайсинга образуется две изоформы KRAS (KRAS4A и KRAS4B), причем KRAS4B преимущественно экспрессируется в злокачественных опухолях. В то время как мутации KRAS часто идентифицируют в карциномах поджелудочной железы, легкого и толстого кишечника, мутации NRAS часто возникают в меланоме и мутации HRAS преобладают в раке головы и шеи. Механизмы, лежащие в основе конкретных мутаций изоформ RAS и их конкретные роли в тканях в настоящее время неясны. Кроме того, существуют значительные различия между изоформами RAS в отношении их посттрансляционных модификаций и внутриклеточной локализации (Simanshu, D. K., Nissley, D. V. & McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **170**, 17-33, doi:10.1016/j.cell.2017.06.009 (2017)).

KRAS4A и KRAS4B имеют многоосновные участки, которые ответственны за их аффинность в отношении фосфолипидов в липидных наноклстерах плазматической мембраны (Zhou, Y. & Hancock, J. F. Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signalling platforms. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 841-849, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.09.008 (2015)). KRAS4B также может быть фосфорилированным в положении S181, что может определять его локализацию на эндомембранах (Prior, I. A. & Hancock, J. F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 145-153, doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.002 (2012)). В то время как HRAS является пальмитоилированным по двум остаткам, KRAS4A и NRAS являются пальмитоилированными по одному остатку в области HVR. Эти модификации в свою очередь определяют их распределение в микродомены плазматической мембраны, что в свою очередь определяет дальнейшую передачу сигнала.

Поскольку KRAS является наиболее часто мутирующим онкогеном при злокачественной опухоли у человека, с особенно высокой частотой в злокачественных опухолях поджелудочной железы, толстого кишечника и легкого, предпринимаются усилия для развития терапевтических стратегий. В WO 2017/058768 A1 описаны соединения, обладающие активностью в качестве ингибиторов мутантного белка KRAS G12C. Аналогичные соединения также описаны в US 2014/288045 A1. Мутация KRAS ассоциирована с плохим прогнозом, но, между тем, не существует эффективных способов

терапии для специфического лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих мутантные формы онкобелка KRAS.

Последние исследования показали, что флаваглины, которые являются природными противоопухолевыми лекарственными средствами, прямо нацелены на взаимодействие прохибитин 1 (PHB1)-CRAF, что приводит к инактивации CRAF, ведущей к блокированию каскада MAPK, который требуется для RAS-опосредуемого образования опухоли. Поскольку структура киназных доменов является сходной, низкомолекулярные ингибиторы киназ часто вызывают нежелательные побочные эффекты. Более того, у пациентов со злокачественной опухолью часто развивается резистентность к ингибиторам киназ (Lovly CM, Shaw AT. Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. Clin Cancer Res 2014; 20: 2249-2256). Таким образом, нацеливание на онкогенную киназу вне киназного домена или домена белок-белкового взаимодействия для инактивации онкогенной киназы, может быть привлекательной стратегией для борьбы со злокачественными опухолями у человека или другими нарушениями, связанными с передачей сигнала.

Хотя лечение рокагламидом ингибирует активацию RAS в клеточных линиях с мутантным KRAS, это вещество не является достаточно специфическим для различения между KRAS и близкородственной изоформой HRAS и NRAS (H Yurugi et al., targeting prohibitants with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours, oncogene (2017), Vol. 36:4778-4789)).

Также известно, что различные производные флаваглина обладают цитотоксическими свойствами. В WO 2010/060891 A1 описаны производные рокаглаола и применение этих производных для предупреждения или ограничения кардиотоксичности антинеопластического средства.

В WO 2012/0666002 A1 описаны производные флаваглина и их применение в качестве нейропротекторных, и/или кардиопротекторных, и/или противоопухолевых средств.

В WO 2005/1 13529 A2 описаны производные циклопента[b]бензофурана и их применение для производства лекарственных средств, особенно для профилактики и/или терапии острых или хронических заболеваний. Более того, флаваглины описаны в качестве мощных средств против злокачественной опухоли и цитопротекторных средств (Journal of Medicinal Chemistry, vol. 55, no. 22, 26. November 2012 (2012-11-26), pages 10064-10073; Yurugi H et al., "Targeting prohibitions with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours (vol. 36, page 4778, 2019), Oncogene, vol. 36, no. 42, 19 October 2017 (2017-10-19), page 5914).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

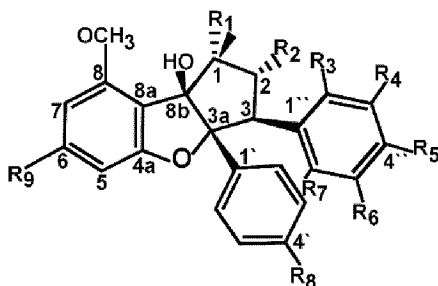
Таким образом, задачей настоящего изобретения является предоставление фармацевтически активных соединений, которые обладают способностью ингибировать активацию KRAS в клетках в наномолярных концентрациях с высокой специфичностью. Эта задача решается посредством производных флаваглина в соответствии с пунктом 1

формулы изобретения. Предпочтительные варианты осуществления изобретения являются частью зависимых пунктов формулы изобретения.

Новые производные флаваглина по настоящему изобретению относят к ингибиторам активации онкогена RAS посредством ингибирования каскада прохибитина, в частности, ингибирования индуцируемой EGF нагрузки RAS-GTP в клетках. Кроме того, авторы изобретения показали, что производные флаваглина по настоящему изобретению нарушают нагрузку KRAS посредством GTP в клетках, имеющих мутантный KRAS в наномолярных концентрациях. Чтобы идентифицировать потенциальные вещества-кандидаты, авторы изобретения провели скрининг соединений флаваглина, которые способны ингибировать активацию RAS посредством прямого нарушения взаимодействия между активированным KRAS (как посредством EGF, так и мутационная активация) и Ras-связывающим доменом (RBD) CRAF-киназы в клетках. В качестве одного из исходов этого скрининга авторы изобретения идентифицировали несколько производных флаваглинов, которые относятся к ингибиторам KRAS. Идентифицированные соединения флаваглина основаны на общей структуре центральной части, но отличаются друг от друга различными боковыми цепями.

Термин "производные флаваглина" используют в настоящем описании для обозначения группы флаваглинов, которые ингибируют KRAS посредством GTP, тем самым вызывая инактивацию GTP-азы.

Производные флаваглина по настоящему изобретению содержат цикlopентабензофурановое кольцо, которое также может присутствовать в натуральных флаваглинах, выделенных из растений рода *Aglaia* (Basmadjian, C., Thuaud, F., Ribeiro, N. & Desaubry, L. Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase elF4A. *Future Med Chem* 5, 2185-2197, doi:10.4155/fmc.13.177 (2013)). Таким образом, производные флаваглина, которые обладают желаемой активностью в соответствии с настоящим изобретением, основаны на следующей общей формуле (I)



в которой

R1 представляет собой -HO, -COO, -C(NH)O, -CO(NH)N-(CH₃)₂, -CO(NH)(NH₂);

R2 представляет собой -H, -COO-CH₃, -CO(NH)-CH₃, -NO(CH₃)₂;

каждый из R3, R4, R5 независимо представляет собой -H, -OH;

R6 представляет собой -H, -OH, -F;

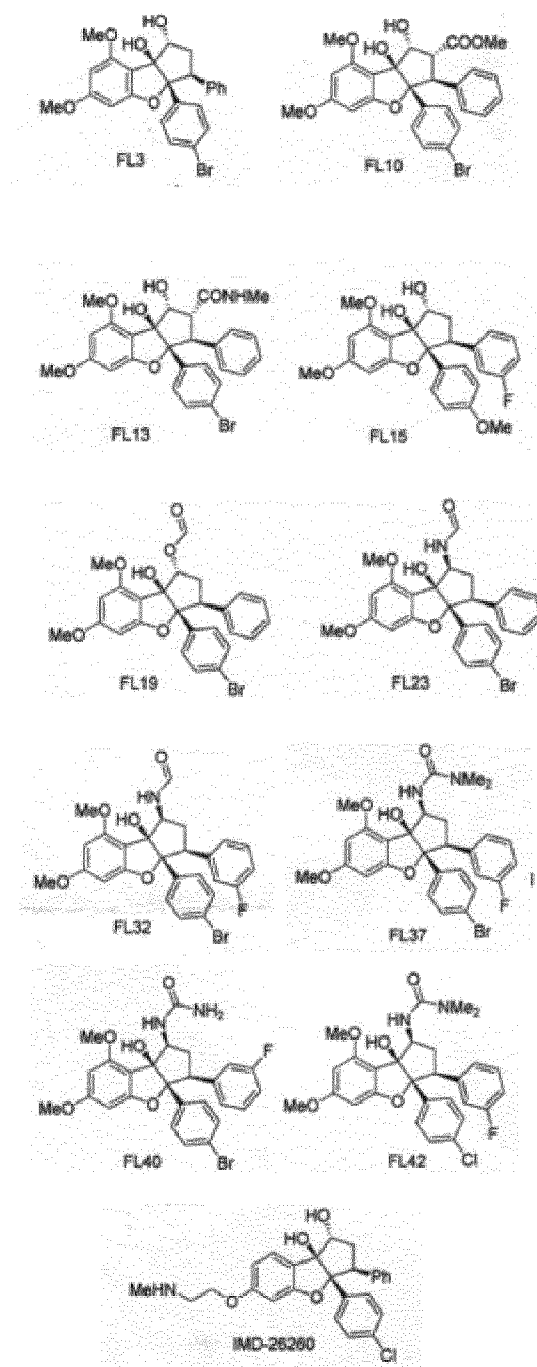
R7 представляет собой -H, -OH;

R8 представляет собой -H, -OCH₃, -Br, -F, -Cl;

R9 представляет собой -O-CH₃, -O-(CH₂)₂-NH-CH₃.

Наиболее неожиданно, что только конкретный набор флаваглинов способен специфически ингибировать KRAS при очень низких наномолярных концентрациях. Это определяет соединения по изобретению как эффективные терапевтические средства для лечения заболеваний, в которые патологически вовлечена передача сигнала RA. Производные флаваглина по изобретению эффективно ингибируют активацию KRAS и препятствуют онкогенному росту опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, как показано с использованием моделей на животных.

Наиболее мощными ингибиторами KRAS в соответствии с настоящим изобретением, помимо рокагламида, являются любые из FL3, FL10, FL13, FL15, FL19, FL23, FL32, FL37, FL40, FL42 или IMD-26260, имеющие одну из следующих структур:

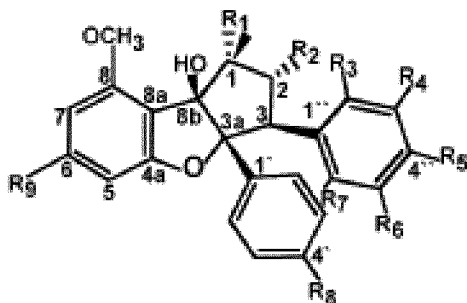


Производные флаваглина по настоящему изобретению эффективно ингибируют нанокластеризацию KRAS, тем самым препятствуя активации эффекторного белка. Эти эффекты воспроизводились посредством истощения прохибитина, что указывает на прямую роль прохибитина в регуляции активации KRAS. Еще более конкретно, соединения по изобретению ингибируют взаимодействие конкретных мутантов KRAS с CRAF-RBD, в частности, мутантных генов KRAS, имеющих по меньшей мере одну или несколько из мутаций KRAS G12V, G12C, G12D, G13C, G13D, G13S, Q61H, Q61R, Q61K. Неожиданно, наномолярные концентрации являются достаточными, чтобы соединения флаваглина по изобретению индуцировали желаемый ингибиторный эффект в отношении мутантного KRAS. Как показано посредством анализа Nano-bit и проведения кинетических экспериментов, активация KRAS эффективно ингибируется при IC₅₀ 25

нМ.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению идентифицированных производных флаваглина для ингибирования активации KRAS в клетках *in vitro* или *ex vivo*. В предпочтительном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению можно использовать в способе специфического ингибирования пролиферации клеточной популяции посредством специфического нацеливания на KRAS. В предпочтительных вариантах изобретения происходит специфическое ингибирование нанокластеризации KRAS4A или KRAS4B, но не HRAS или NRAS. Способ включает стадию приведения клеточной популяции в контакт с производным флаваглина по настоящему изобретению. Предпочтительно, ингибирование пролиферации клеточной популяции измеряют как уменьшение жизнеспособности клеток в клеточной популяции. Предпочтительно, способ представляет собой способ *in vitro* или *ex vivo*.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, которое представляет собой производное флаваглина, имеющее общую формулу (I)



в котором

R1 представляет собой -HO, -COO, -C(NH)O, -CO(NH)N-(CH₃)₂, -CO(NH)(NH₂);

R2 представляет собой -H, -COO-CH₃, -CO(NH)-CH₃, -NO(CH₃)₂;

каждый из R3, R4, R5 независимо представляет собой -H, -OH;

R6 представляет собой -H, -OH, -F;

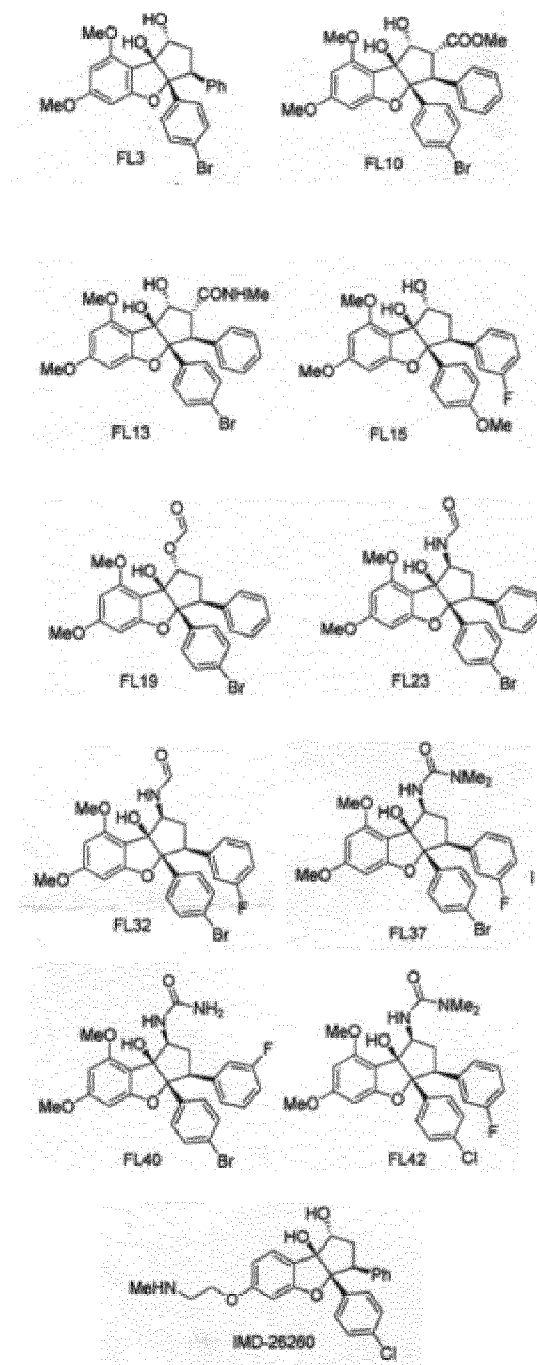
R7 представляет собой -H, -OH;

R8 представляет собой -H, -OCH₃, -Br, -F, -Cl;

R9 представляет собой -O-CH₃, -O-(CH₂)₂-NH-CH₃,

и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или эксципиент, для применения для предупреждения или лечения заболевания, в которое патологически вовлечена передача сигнала RAS. Предпочтительно заболевание представляет собой пролиферативное нарушение или генетическое нарушение с мутантным KRAS.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит производное флаваглина, которое представляет собой FL3, FL10, FL13, FL15, FL19, FL23, FL32, FL37, FL40, FL42 или IMD-26260, имеющие следующую химическую структуру:



В предпочтительном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или эксципиент может представлять собой любой носитель, разбавитель, консервант, пигмент/краситель, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, разрыхлитель, суспендирующее вещество, стабилизатор, обеспечивающее изотоничность средство, растворитель или эмульгатор, которые известны специалисту в данной области и являются приемлемыми для применения у человека или домашних животных.

"Фармацевтическая композиция" согласно изобретению относится к составу из одного или нескольких соединений по изобретению и среды, являющейся общепризнанной в данной области для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например, человеку или животным.

Термин "ex vivo" в контексте настоящего изобретения относится к событию, которое происходит вне организма человека или животного.

Как показано посредством настоящего изобретения, лечение производными флаваглина по настоящему изобретению прямо ингибируют нагрузку KRAS посредством GTP в клетках, что делает соединения пригодными в качестве биологически и фармацевтически эффективных средств для применения для предупреждения или лечения заболевания, в которое патологически вовлечена передача сигнала RAS, в частности пролиферативного нарушения или генетического нарушения с мутантным KRAS. Такое заболевание может представлять собой любое из неопролиферативного заболевания, злокачественной опухоли, RAS-патий или краниофациального синдрома. В частности, любая злокачественная опухоль, в которой играет роль KRAS или другие изоформы RAS, является подходящей мишенью для соединений по настоящему изобретению, предпочтительно, такая злокачественная опухоль, как рак ободочной и прямой кишки, рак легкого, гематологическая злокачественная опухоль, MYH-ассоциированный полипоз, рак мочевого пузыря, меланома, острый миелоидный лейкоз (AML) или рак поджелудочной железы. Предпочтительными мишенями заболевания, в которые патологически вовлечена передача сигнала RAS, являются мутантные гены KRAS, в частности, такие как гены, которые содержат мутацию G12V, G12C, G12D, G13C, G13D, G13S, Q61H, Q61R, Q61K. Однако также другие мутанты KRAS, восприимчивые к ингибированию KRAS, в частности, мутанты KRAS, в которых взаимодействие с CRAF-RBD или другими эффекторными белками Ras ингибируется посредством производного флаваглина, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение более подробно иллюстрируется приведенными ниже примерами.

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Приведенные ниже эксперименты показывают эффекты *in vitro* и *in vivo* производных флаваглина по настоящему изобретению.

Ниже авторы изобретения показывают, что нацеливание на ассоциированные с плазматической мембраной прохИБитины посредством производных флаваглина по настоящему изобретению ингибируют нагрузку GTP на KRAS, что приводит к инактивации активности GTP-азы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлен контрольный эксперимент для тестирования того, препятствует ли рокагламид активации RAS в ответ на EGF в клетках HeLa. Клетки HeLa обрабатывали Ros в течение 1 ч перед стимуляцией посредством EGF. На левой панели показан блот, полученный для условий без стимуляции посредством EGF, и на правой панели показаны условия со стимуляцией посредством EGF. Детекцию Ras, нагруженного GTP, проводили посредством анализа с соосаждением с доменом RAF RBD и доменом Rap GDS RA (последние 2 панели снизу). Анализ с соосаждением проводили для крипт с использованием доменов CRAF-RBD и Ral-GDS-RA. Активация RAS в ответ на EGF

ингибировалась посредством предварительной обработки клеток рокагламидом в концентрации 200 нМ. Затем был разработан анализ Nano-bit с использованием KRAS и CRAF-RBD для количественного определения активации KRAS.

На фиг.2 показано, что KRAS S17N, неактивный мутант KRAS, не взаимодействовал с CRAF-RBD, подтверждая чувствительность и надежность используемого анализа. Анализ Nano Bit в отношении нагрузки KRAS посредством GTP проводили на клетках Hela. Экспрессирующими мутантами плазмид KRAS трансфицировали клетки Hela и клетки использовали для анализа NanoBit. Для каждого мутанта KRAS величины, полученные для клеток, обработанных DMSO, принимали за 1, и на фиг. представлена кратность ингибирования соединения. Планки соответствуют среднему значению $\pm$ SEM для 3 независимых экспериментов.

На фиг.3 представлены различные производные флаваглинов, включающие рокагламид, которые тестировали в анализах активности KRAS, чтобы видеть, какие из этих соединений способны ингибировать активацию (мутантного) KRAS. Соединения отличаются друг от друга их боковыми цепями. Потенциальных кандидатов идентифицировали посредством анализа Nano-bit, в котором определяли ингибирование KRAS.

На фиг.4 показано, что не все протестированные соединения приводят к инактивации KRAS, а подгруппа флаваглинов, в частности, FL3, FL10, FL13, FL15, FL19, FL23, FL32, FL37, FL40, FL42 или IMD-26260, а также рокагламид. Несколько кандидатов, таких как FL1, FL6, FL26, FL30, не ингибировали активацию KRAS, несмотря на присутствие характерного кольца цикlopентабензофурана, что указывает на то, что структурные части в этих боковых частях вносят вклад в способность ингибировать KRAS. Сходные результаты были получены, когда KRAS дикого типа активировали посредством EGF. Для оценки эффекта соединения использовали систему NanoBit. Для клеток, трансфицированных KRAS WT, клетки обрабатывали 100 нМ соединениями в течение 4 ч в бессывороточной среде, после чего проводили стимуляцию посредством EGF (100 нг/мл) в течение 30 мин. Для клеток, трансфицированных KRAS G12V, клетки обрабатывали 100 нМ соединениями в течение 4 ч. После обработки или стимуляции проводили анализ NanoBit в соответствии с инструкциями. Данные демонстрируют результаты относительной величины люминесценции, и величину для клеток, обработанных DMSO, принимали за 1. Планки погрешности соответствуют среднему значению $\pm$ SEM (n=4).

На фиг.5 представлен анализ посредством FRET-FLIM нанокластеров RAS (KRAS, HRAS и NRAS) на плазматической мембране. Производные флаваглина по настоящему изобретению специфически ингибируют образование нанокластера KRAS на плазматической мембране, как показано посредством FRET нанокластеризации для K-RasG12V, H-RasG12V и N-RasG12V. Клетки HEK-293 EBNA трансфицировали мечеными посредством pmGFP K-RasG12V или H-RasG12V или N-RasG12V (1 пг) на период времени жизни флуорофора. Для клеток, экспрессирующих пары FRET, клетки

совместно трансфицировали pmGFP-KRasG12V (0,5 пг) и pmCherry-KRasG12V (1,5 пг), или pmGFP-H-RasG12V (0,5 пг) и pmCherry-H-RasG12V (1,5 пг), или pmGFP-N-RasG12V (0,5 пг) и pmCherry-N-RasG12V (1,5 пг). Через 24 часа после трансфекции клетки обрабатывали контролем в виде 0,1% DMSO или 25 нМ или 50 нМ рокагламидом. Через 24 часа после обработки клетки фиксировали 4% PFA. Числа на столбиках указывают на количества проанализированных клеток. Статистически значимые отличия между контрольными и обработанными образцами исследовали с использованием одностороннего ANOVA, дополненного сравнением Тьюки (значимые; **** $P < 0,0001$; ns, не значимые). Столбики соответствуют средним величинам $\pm$ SEM для 3 независимых биологических экспериментов.

На фиг.6 представлен эффект наномолярных концентраций производных флаваглина (100 нМ) на активацию RAS в клеточных линиях с мутантным KRAS (Calu-1, ASPC-1 и HCT-116). Мониторинг активации RAS проводили посредством анализа соосаждения для крипт, описанного выше. Активацию CRAF и MEK1 проверяли посредством иммуноблоттинга.

На фиг.7 представлены эффекты трех производных флаваглина на жизнеспособность опухолевых клеточных линий при тестировании посредством анализа с МТТ. Представлены данные для трех независимых экспериментов ($n=3$).

На фиг.8 представлена анализ образования колоний на мягком агаре, демонстрирующий эффекты производных флаваглина по настоящему изобретению. Представлены данные для трех независимых экспериментов ($n=3$).

Данные иллюстрируют, что производные флаваглина по настоящему изобретению нарушают образование нанокластеров KRAS, но не нанокластеров HRAS или NRAS. Таким образом, соединения по настоящему изобретению являются специфичными в отношении ингибирования KRAS, возможно посредством влияния на зависимую от прохибитина сегрегацию липидов в плазматической мембране.

Также данные демонстрируют, что рост злокачественных клеток может ингибироваться *in vitro* посредством использования МТТ и анализа на мягком агаре. Производные флаваглина по настоящему изобретению являются эффективными в отношении блокирования роста клеток HCT-116, ASPC-1 и Calu-1, которые имеют мутации KRAS, с IC50 в низком наномолекулярном диапазоне (6-20 нМ).

Эти исследования были расширены в моделях на животных *in vivo* с использованием моделей на аутохтонных мышах. Использовали модель на мышах с NSCLC, запускаемым KRAS G12D. Экспрессию KRAS G12D индуцировали посредством введения доксицилина в течение приблизительно 2 месяцев, после чего проводили введение мышам производных флаваглина по настоящему изобретению в дозе 2,5 мг/кг в течение 6 недель. Введение производного флаваглина приводило к значительному уменьшению количества узелков в легких, что указывает на то, что рост и поддержание NSCLC, запускаемого KRAS G12D, *in vivo* успешно ингибировались (данные не представлены).

Данные демонстрируют природное противоопухолевое лекарственное средство, которое специфически ингибирует KRAS в наномолярных концентрациях как в моделях на клеточных культурах *in vitro*, так и в моделях на аутохтонных мышах. По существу, соединения по настоящему изобретению являются пригодными при заболеваниях, в которые патологически вовлечена передача сигнала RAS, в частности, неопролиферативных заболеваниях, злокачественной опухоли, RAS-патии или краниофациальном синдроме. Злокачественные заболевания, которые характеризуются мутантным KRAS, представляют собой рак ободочной и прямой кишки, рак легкого, гематологическую злокачественную опухоль, MYH-ассоциированный полипоз, рак мочевого пузыря, меланому, острый миелоидный лейкоз (AML) или рак поджелудочной железы.

Материалы и способы

Клетки

Клетки 482T1 были любезным подарком от Tyler Jack's lab, и их культивировали в DMEM (с 10% инактивированной нагреванием FBS). Клетки Calu-1 получали от Sigma-Aldrich и культивировали в среде McCoy's 5A (с 10% инактивированной нагреванием FBS). HeLa (DSMZ) и HCT-116 (подарок от Ulf Rapp) были проверены в Eurofin genomics, и их культивировали в DMEM (с 10% инактивированной нагреванием FBS). Клетки ASPC-1 приобретали от DSMZ и культивировали в RPMI-1640 (с 10% инактивированной нагреванием FBS). Клетки HeLa подвергали голоданию в бессывороточной среде с рокагламидом или флаваглинами в течение 4 часов и стимулировали EGF (100 нг/мл) в течение 30 мин. Клетки, содержавшие мутацию KRAS, обрабатывали Ros в полной среде для роста в течение 24 часов.

Трансфекция ДНК/миРНК

Клетки HeLa собирали посредством 0,05% трипсина/0,02% EDTA в PBS и высевали в 6-ячеечные или 12-ячеечные планшеты для культивирования клеток в концентрации 5×10^4 клеток в полной DMEM (2 мл для 6-ячеечного планшета и 1 мл для 12-ячеечного планшета). Через 1 сутки после посева ДНК или миРНК смешивали с различными реагентами для трансфекции (описаны ниже) и добавляли в ячейки на 1-2 суток. Среду заменяли на бессывороточную DMEM и инкубировали при 37°C в течение 4 ч с флаваглинами (100 нМ). После голодания клеток их стимулировали EGF (100 нг/мл) в течение 30 мин. Затем клетки лизировали, и активированный RAS улавливали из клеток посредством гранул с RAF-RBD, как описано ниже. Клетки HCT-116 собирали посредством 0,05% трипсина/0,02% EDTA в PBS и высевали в 6-ячеечные планшеты для культивирования в концентрации 5×10^4 клеток/мл, 2 мл. Через 1 сутки в лунки добавляли реагент для трансфекции миРНК и клетки далее культивировали в течение 2 суток. Клетки промывали PBS и использовали для анализа соосаждения для активного Ras.

Реагент для трансфекции ДНК

Плазмида	PEI (10 mM)	PBS
1 мкг/2 мкг (12-ячеечный/6-	5 мкл/10 мкл	100 мкл/200 мкл

ячеечный)		
-----------	--	--

Реагент для трансфекции миРНК

PHB1: 5'-CCCAGAAAUCACUGUGAAA-3, 5'-UUUCACAGUGAUUUCUGGG.
CRAF: 5'-GGAUGUUGAUGGUAGUACATT-3', 5'-UGUACUACCAUCAACAUCAC-3'

миРНК (100 мкМ)	Saint Red	HBS
2 мкл	10 мкл	200 мкл

Анализ соосаждения для активного Ras

После стимуляции или обработки в каждую лунку добавляли буфер для соосаждения активного Ras (25 mM Tris-HCl pH7,2, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 5% глицерин с коктейлем ингибиторов протеаз) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки обрабатывали ультразвуком в течение 3 секунд, клеточные лизаты центрифугировали в течение 15 мин при 4°C, 13000 об/мин. Концентрацию белка корректировали посредством реагента для белкового анализа при 660 нм (Thermoscientific) и 20% лизата собирали для контроля в виде общего клеточного лизата. К остальной части лизатов добавляли 10 мл покрытых белком CRAF-RBD агарозных гранул, и вращали при 4°C в течение 60 мин. После инкубации гранулы два раза промывали буфером для связывания и добавляли 50 мл буфера для образца для SDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 10% глицерин, BPB).

SDS-PAGE и вестерн-блоттинг

Образцы загружали на 14% SDS-PAGE, а затем проводили вестерн-блоттинг. После переноса мембрану блокировали 3% BSA/TBST (20 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану инкубировали с первичным антителом, разбавленным в 1% BSA/TBST, и инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубации в течение ночи мембрану промывали посредством TBST (5 мин×5) и инкубировали с конъюгированным с HRP вторичным антителом в TBST в течение 1 ч при к.т. После обработки вторичным антителом мембрану промывали и сигнал визуализировали посредством хемилюминесцентного субстрата (Millipore) и Chemidoc touch (Bio-Rad).

Анализ с использованием микроскопии

Через одни сутки после трансфекции клетки собирали и высевали на покровные стекла (18 мм×18 мм) и культивировали в течение 24 ч. Среду заменяли на бессывороточную DMEM и инкубировали при 37°C в течение 4 ч с соединением (100 нМ). После голодания клетки стимулировали EGF (100 нг/мл) в течение 30 мин. Стекло фиксировали Riti HistoFix в течение 15 мин при к.т., а затем осуществляли пермеабелизацию посредством 0,1% TritonX-100 в PBS в течение 3 мин, и стекло блокировали 0,5% BSA/PBS в течение 1 ч при к.т. Покровное стекло инкубировали с первичным антителом (1/500, антитело против FLAG M2, Sigma) в 0,5% BSA/PBS в течение 2 ч при к.т. Затем его инкубировали с конъюгированным с Cy3 противомышиным IgG с красителем Хехст (5 пг/мл) в 0,5% BSA/PBS в течение 1 ч при к.т. Покровное стекло

промывали PBS (5 раз) и устанавливали на предметное стекло с использованием раствора Mowiol/DABCO.

Анализ NanoBit

N-концевую конструкцию LgBit и C-концевую конструкцию smBit приобретали от Promega и KRAS (полноразмерный) клонировали посредством Xho I и Bgl II в LgBit, и CRAF-RBD(1-149) клонировали посредством EcoRI и Bgl II в SmBit. Конструкциями трансфицировали клетки HeLa, и клетки собирали через 1 сутки после трансфекции и высевали в 96-луночный белый планшет. Клетки культивировали в 96-луночном планшете в течение 1 суток, а затем среду заменяли на бессывороточную среду DMEM на 0-4 ч с соединениями. После предварительной обработки клетки, трансфицированные KRAS WT, стимулировали посредством EGF в течение 30 мин. Анализ Nano Glo проводили для стимулированных EGF клеток, трансфицированных KRAS WT, или клеток, трансфицированных KRAS G12V, в соответствии с инструкциями изготовителя. Люминесценцию определяли с использованием Tecan infinite (Tecan).

Анализ с МТТ

Клетки HCT-116, Calu-1 и ASPC-1 высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/мл в объеме 50 мкл, и культивировали в течение 1 суток. В лунку добавляли 50 мкл среды для роста, содержащей соединение, и планшет культивировали в течение 48 ч. В лунки добавляли 10 мл раствора МТТ и инкубировали в течение 2-3 часов. После инкубации с МТТ добавляли солубилизирующий буфер и инкубировали в течение ночи. МТТ измеряли при O.D. 570 нм с использованием устройства для считывания планшетов (TECAN).

Анализ образования колоний на мягком агаре

1,5% раствор агарозы смешивали с 2× средой для роста (20% FBS, с 100 нМ рокагламидом или без него) и помещали в 6-ячеечный планшет с 1,5 мл 0,75% агарозы/1× среда для роста и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 мин для застывания агарозы. Клетки HCT-116 и ASPC-1 разбавляли в 2× среде для роста (20% FBS, с 100 нМ рокагламидом) и смешивали с 0,9% раствором агарозы. К нижнему слою агарозы добавляли 1,5 мл клеточной суспензии в 0,45% агарозе в 1× среде для роста. Клетки, посеянные на мягкий агар, культивировали в течение 2-4 недель с последующим окрашиванием раствором кристаллического фиолетового. Изображения получали с помощью оборудования ChemiDoc Touch (Bio-Rad) и количество колоний подсчитывали посредством программного обеспечения Image J.

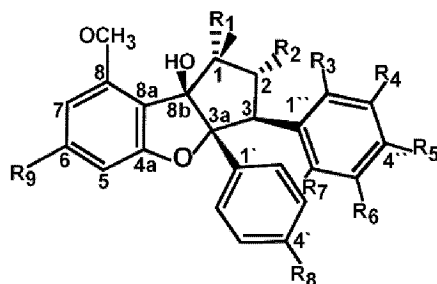
Модели на аутохтонных мышях

Аутохтонные модели были получены и любезно предоставлены в подарок Dr. Woskamp. Мышей SP-C/rtTA (SP-C), полученных Dr. Jeffrey A. Whitstett, скрещивали с мышами Tet-op-K-Ras4b^{G12D} (K-Ras^{G12D})¹⁶ (Fisher, Wellen et al. 2001). Для активации трансгенов мышей кормили DOX-содержавшей пищей. Для получения корма с DOX, 3 г DOX растворяли в 3 л ddH₂O. Затем 900 мл раствора DOX (600 мг/мл) добавляли к 2 кг гранул корма. Пропитанные гранулы инкубировали при 37°C в течение двух суток, и

сухой корм использовали для кормления. Для развития опухоли мышцей кормили рационом с дох в течение 2 месяцев перед лечением, и введение рокагламида (2,5 мг/кг) мышам проводили в течение 6 недель внутрибрюшинно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор активации онкогена KRAS, который представляет собой производное флаваглина, имеющее общую формулу (I)



(I)

в котором

R1 представляет собой -HO, -COO, -C(HN)O, -CO(NH)N(CH₃)₂, -CO(NH)(NH₂);

R2 представляет собой -H, -COO-CH₃, -CO(NH)-CH₃, -NO(CH₃)₂;

каждый из R3, R4, R5 независимо представляет собой -H, -OH;

R6 представляет собой -H, -OH, -F;

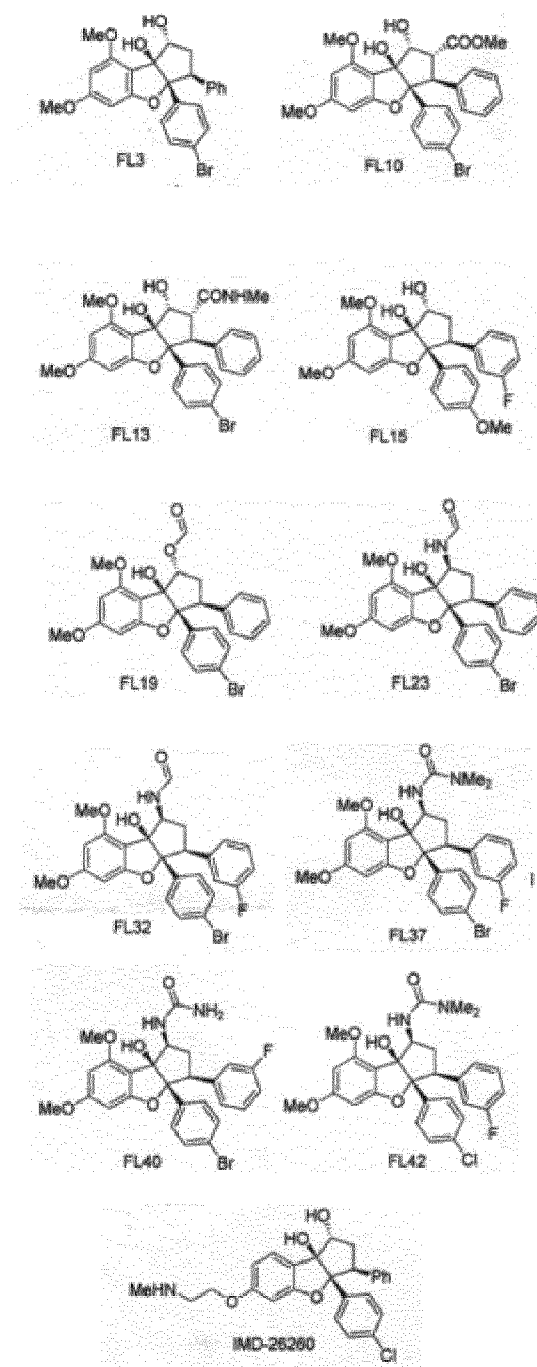
R7 представляет собой -H, -OH;

R8 представляет собой -H, -OCH₃, -Br, -F, -Cl;

R9 представляет собой -O-CH₃, -O-(CH₂)₂NN-CH₃,

предназначенный для предупреждения или лечения пролиферативного нарушения или генетического нарушения с мутантным KRAS.

2. Ингибитор активации онкогена KRAS по п.1, где производное флаваглина представляет собой FL3, FL10, FL13, FL15, FL19, FL23, FL32, FL37, FL40, FL42, IMD-26260, имеющие следующие структуры:



3. Ингибитор активации онкогена KRAS по п.1 или п.2, где передача сигнала RAS вовлекает мутантный ген KRAS.

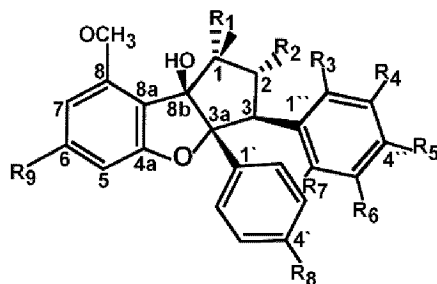
4. Ингибитор активации онкогена KRAS по п.3, где ген KRAS содержит мутацию G12V, G12C, G12D, G13C, G13D, G13S, Q61H, Q61R и/или Q61K.

5. Применение соединения, содержащего любую из структур по любому из пп.1-4, для ингибирования активации KRAS в клетках *in vitro* или *ex vivo*.

6. Способ специфического ингибирования пролиферации клеточной популяции посредством нацеливания на KRAS, причем способ включает стадию приведения клеточной популяции в контакт с соединением по любому из пп.1-4.

7. Способ по п.6, где ингибирование пролиферации клеточной популяции измеряют в качестве снижения жизнеспособности клеток клеточной популяции.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, которое представляет собой производное флаваглина, имеющее общую формулу (I)



(I)

в котором

R1 представляет собой -HO, -COO, -C(HN)O, -CO(NH)N(CH₃)₂, -CO(NH)(NH₂);

R2 представляет собой -H, -COO-CH₃, -CO(NH)-CH₃, -NO(CH₃)₂;

каждый из R3, R4, R5 независимо представляет собой -H, -OH;

R6 представляет собой -H, -OH, -F;

R7 представляет собой -H, -OH;

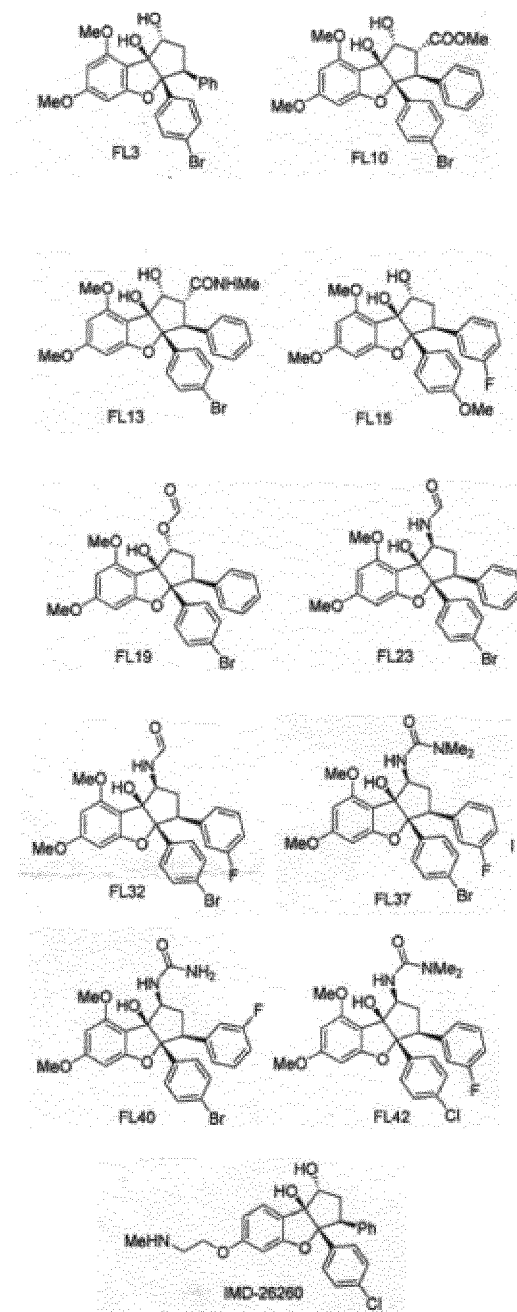
R8 представляет собой -H, -OCH₃, -Br, -F, -Cl;

R9 представляет собой -O-CH₃, -O-(CH₂)₂NN-CH₃,

и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или эксципиент, предназначенная для предупреждения или лечения заболевания, в которое патологически вовлечена передача сигнала RAS.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где заболевание представляет собой пролиферативное нарушение или генетическое нарушение с мутантным KRAS.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-9, где производное флаваглина представляет собой FL3, FL10, FL13, FL15, FL19, FL23, FL32, FL37, FL40, FL42, IMD-26260, имеющие следующие структуры:



11. Фармацевтическая композиция по п.8, где заболевание представляет собой неопролиферативное заболевание, злокачественную опухоль, RAS-патию или краниофациальный синдром.

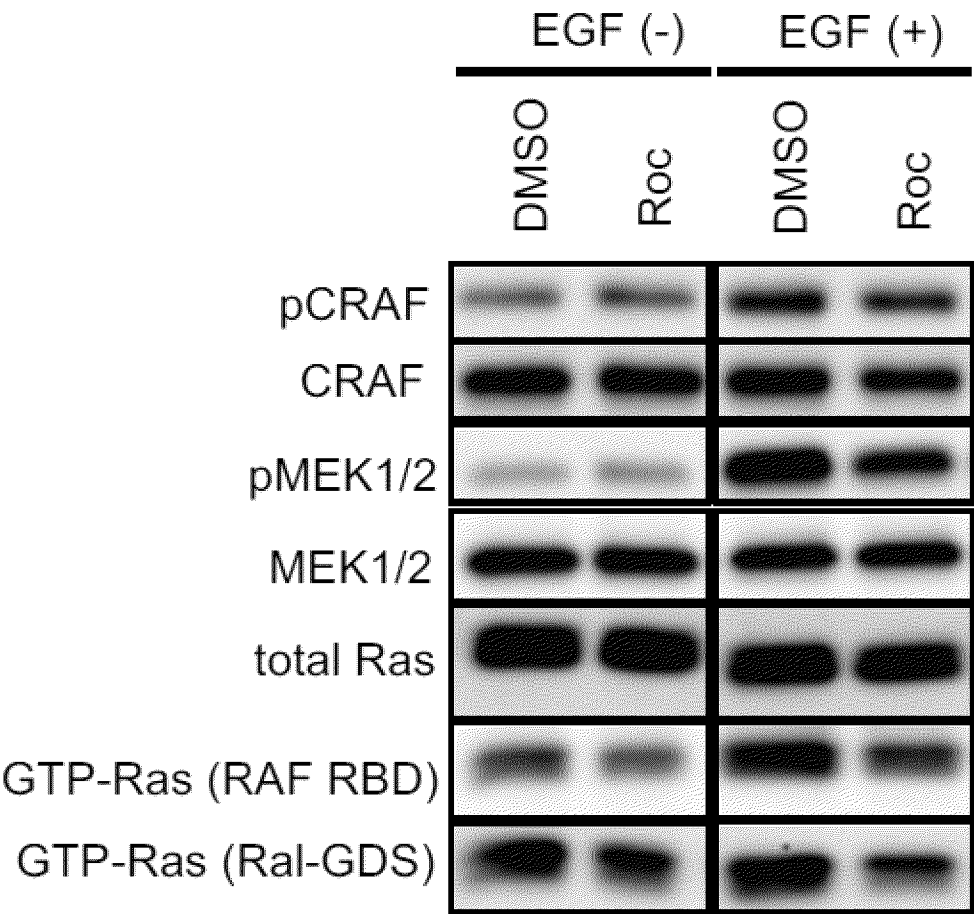
12. Фармацевтическая композиция по п.11, где злокачественная опухоль представляет собой рак ободочной и прямой кишки, рак легкого, гематологическую злокачественную опухоль, MYH-ассоциированный полипоз, рак мочевого пузыря, меланому, острый миелоидный лейкоз (AML) или рак поджелудочной железы.

13. Фармацевтическая композиция по п.8, где передача сигнала RAS вовлекает мутантный ген KRAS.

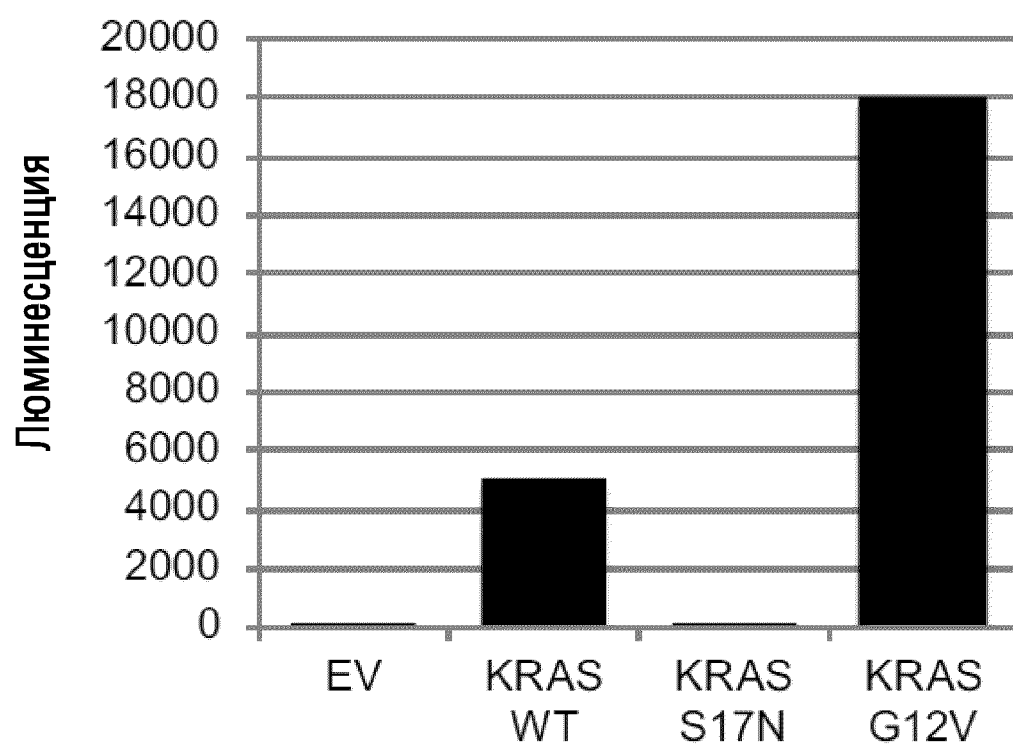
14. Фармацевтическая композиция по п.13, где мутантный ген KRAS содержит мутацию G12V, G12C, G12D, G13C, G13D, G13S, Q61H, Q61R и/или Q61K.

По доверенности

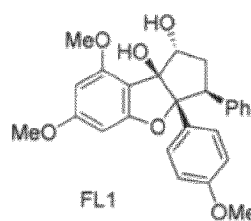
ФИГ.1



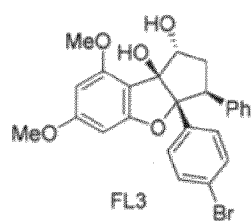
ФИГ.2



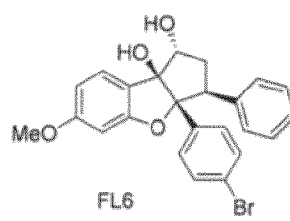
ФИГ.3



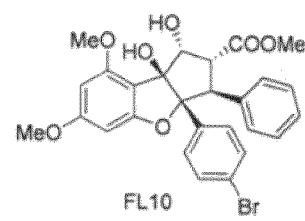
Молек. масса: 434.49
1.4 мг
0.322 мл



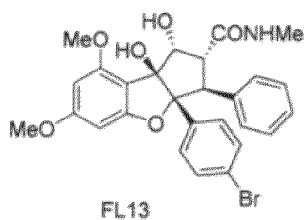
Молек. масса: 483.36
1.2 мг
0.248 мл



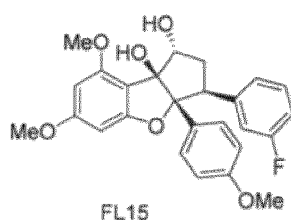
Молек. масса: 453.33
0.9 мг
0.198 мл



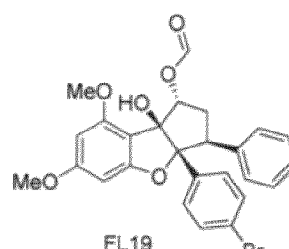
Молек. масса: 541.39
2.0 мг
0.369 мл



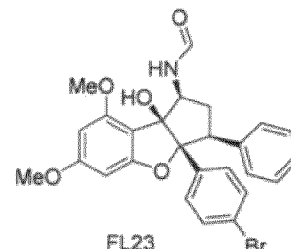
Молек. масса: 540.41
0.8 мг
0.148 мл



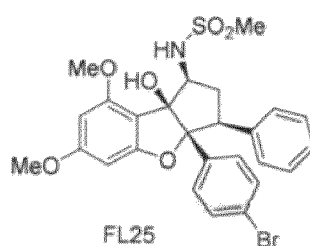
Молек. масса: 452.48
1.9 мг
0.420 мл



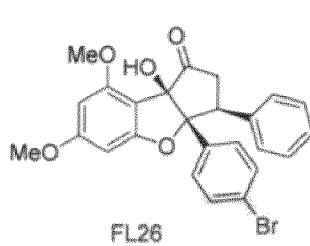
Молек. масса: 511.37
0.9 мг
0.176 мл



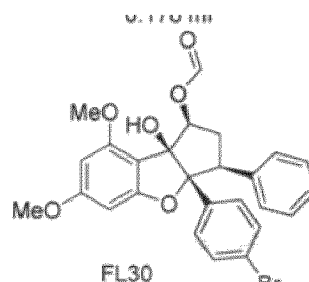
Молек. масса: 510.38
0.8 мг
0.157 мл



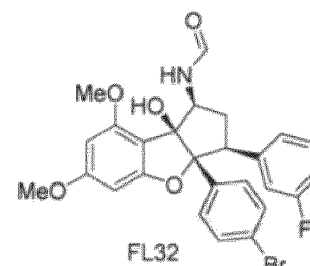
Молек. масса: 560.46
0.9 мг
0.161 мл



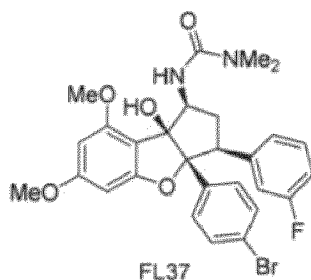
Молек. масса: 481.34
1.0 мг
0.208 мл



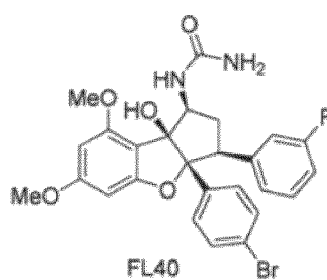
Молек. масса: 511.37
1.3 мг
0.254 мл



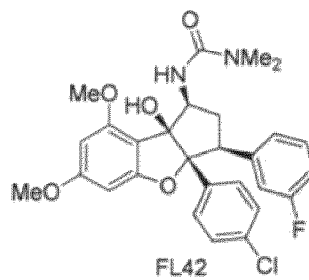
Молек. масса: 528.37
0.7 мг
0.755 мл



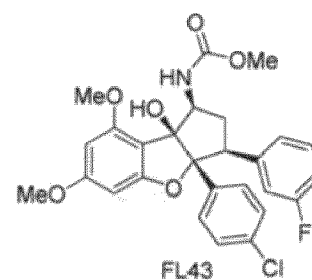
Молек. масса: 571.44
1.2 мг
0.210 мл



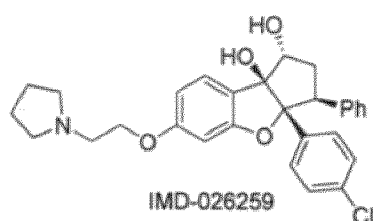
Молек. масса: 543.39
1.3 мг
0.239 мл



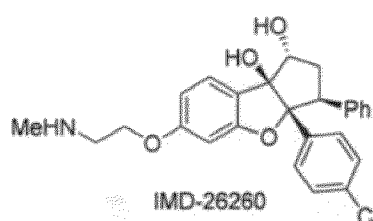
Молек. масса: 526.99
1.8 мг
0.342 мл



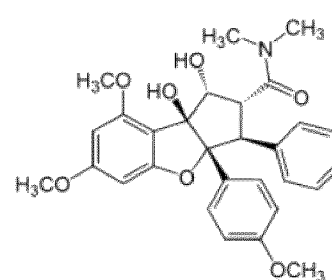
Молек. масса: 513.95
1.3 мг
0.253



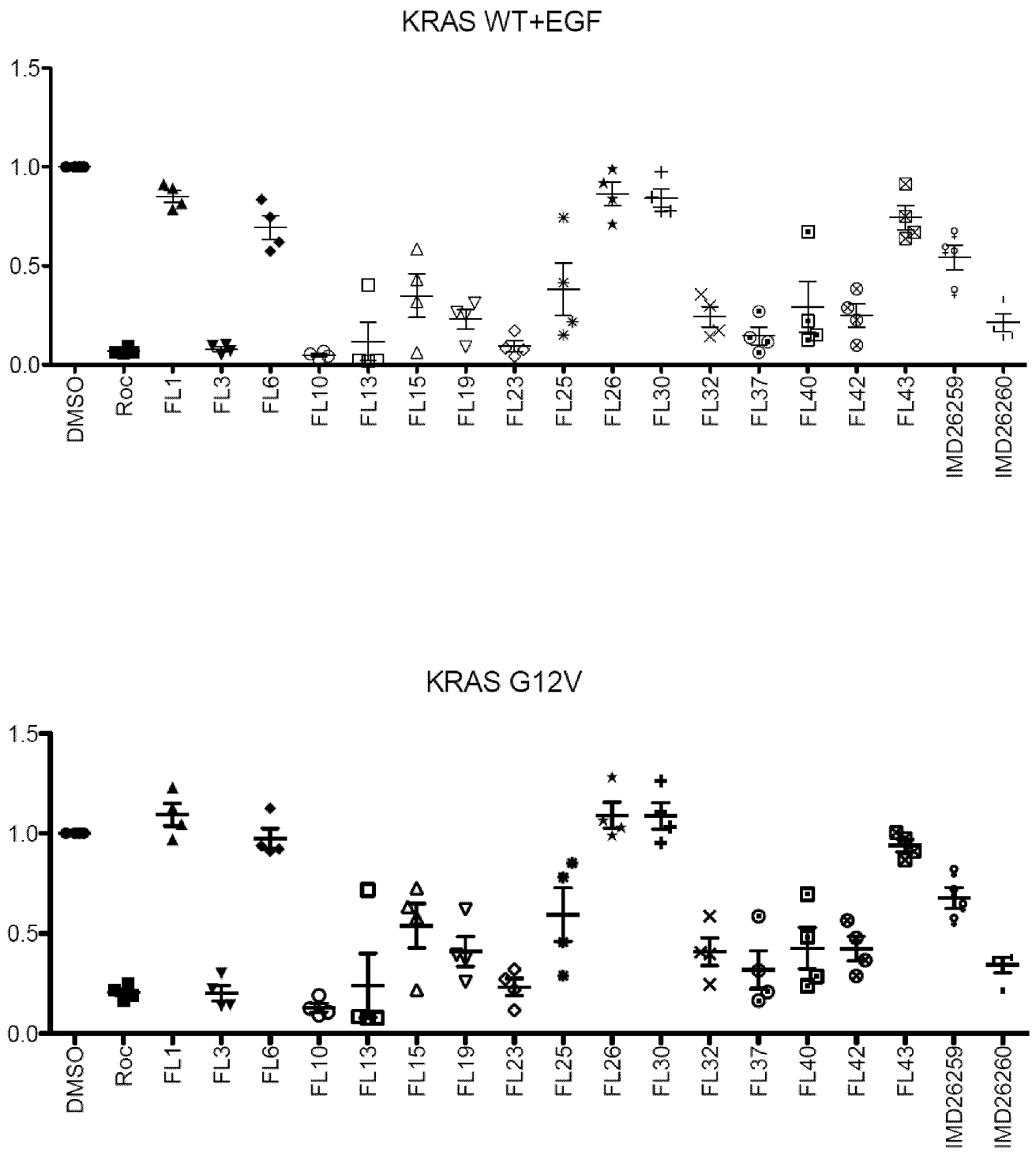
Молек. масса: 492.01
0.7 мг
5 mM: 0.845

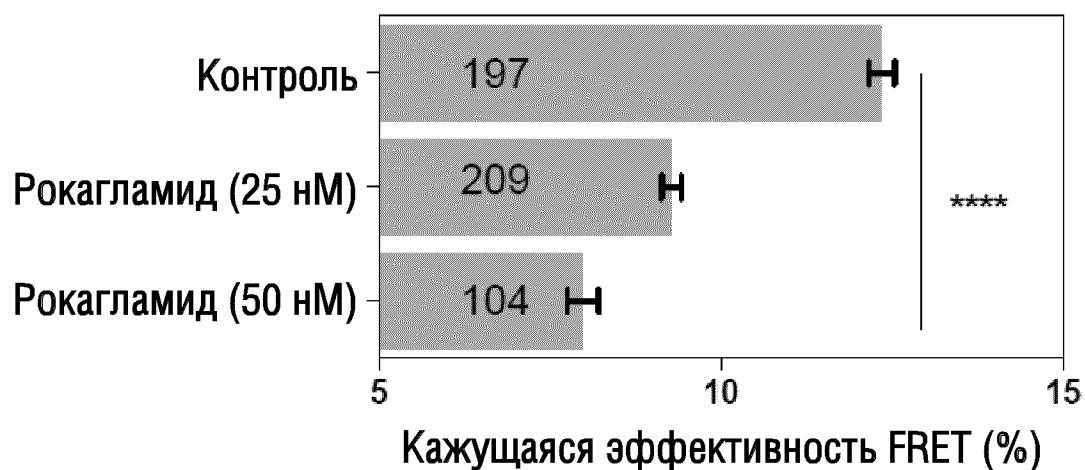
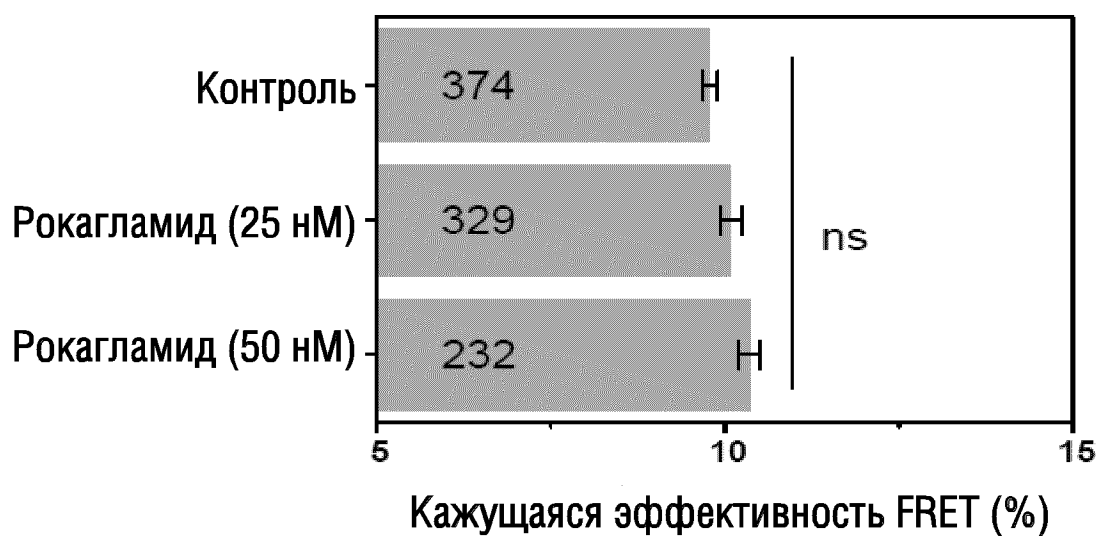
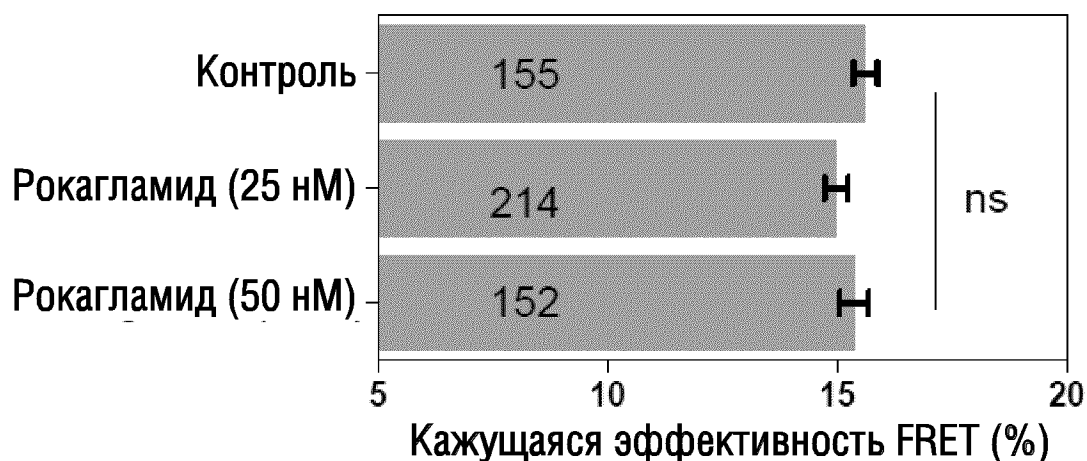


Молек. масса: 451.95
0.8 мг
5 mM: 0.354



ФИГ.4

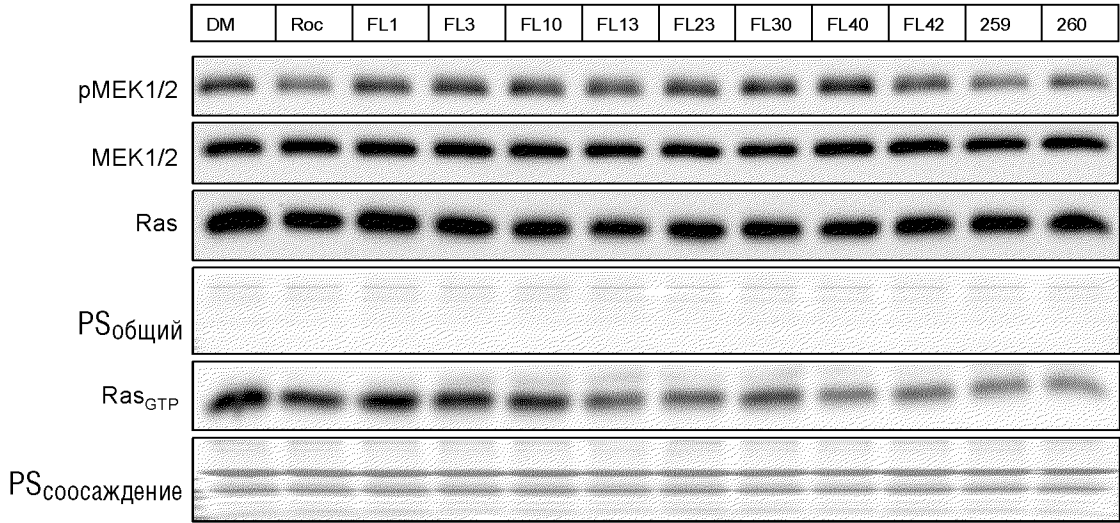


ФИГ.5**FLIM-FRET нанокластеризации для K-Ras G12V****FLIM-FRET нанокластеризации для N-Ras G12V****FLIM-FRET нанокластеризации для H-Ras G12V**

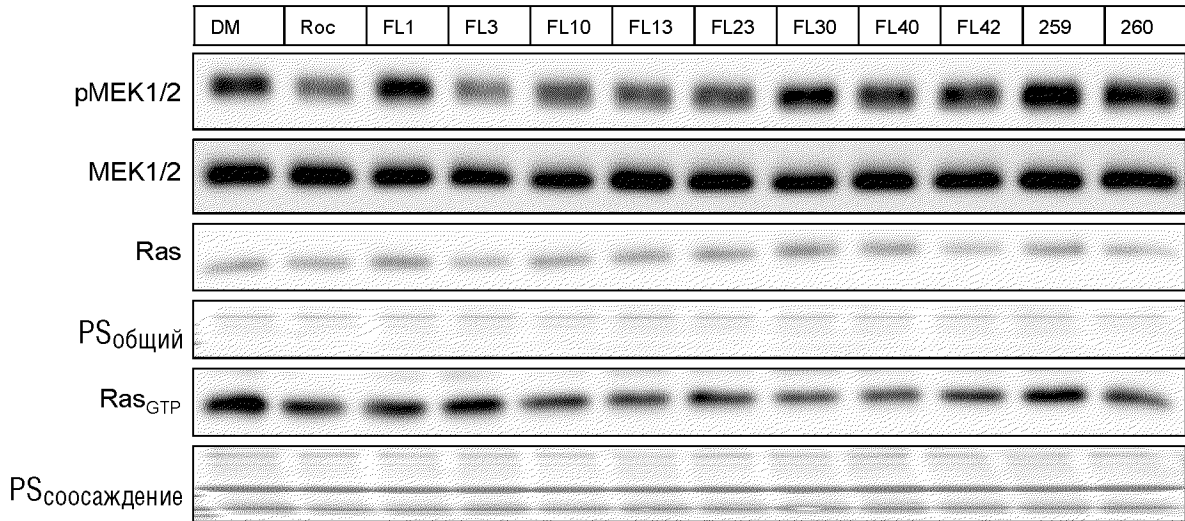
ФИГ.6

6/8

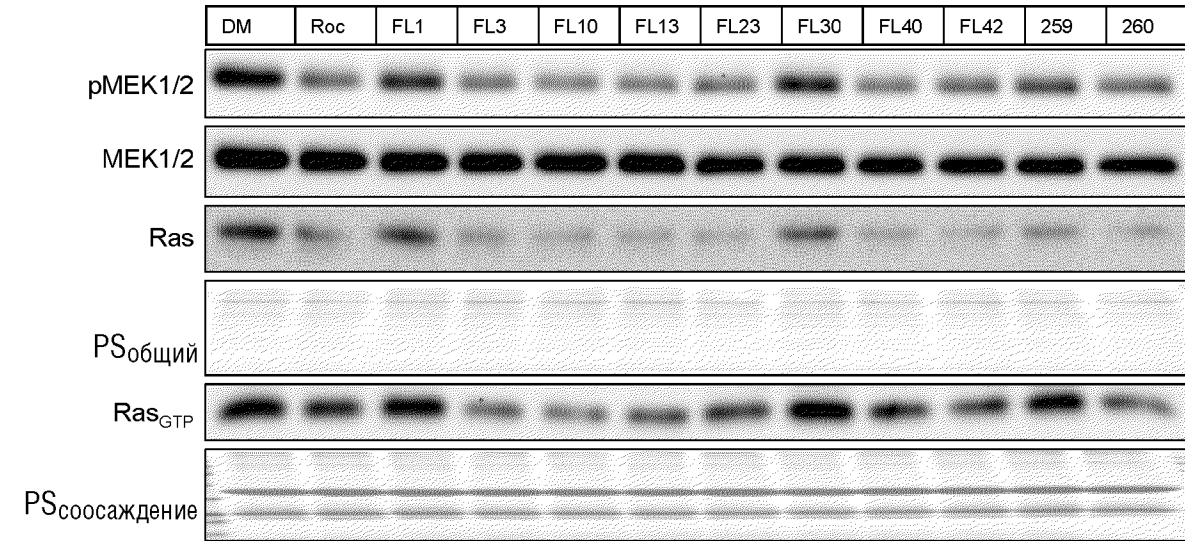
Calu-1



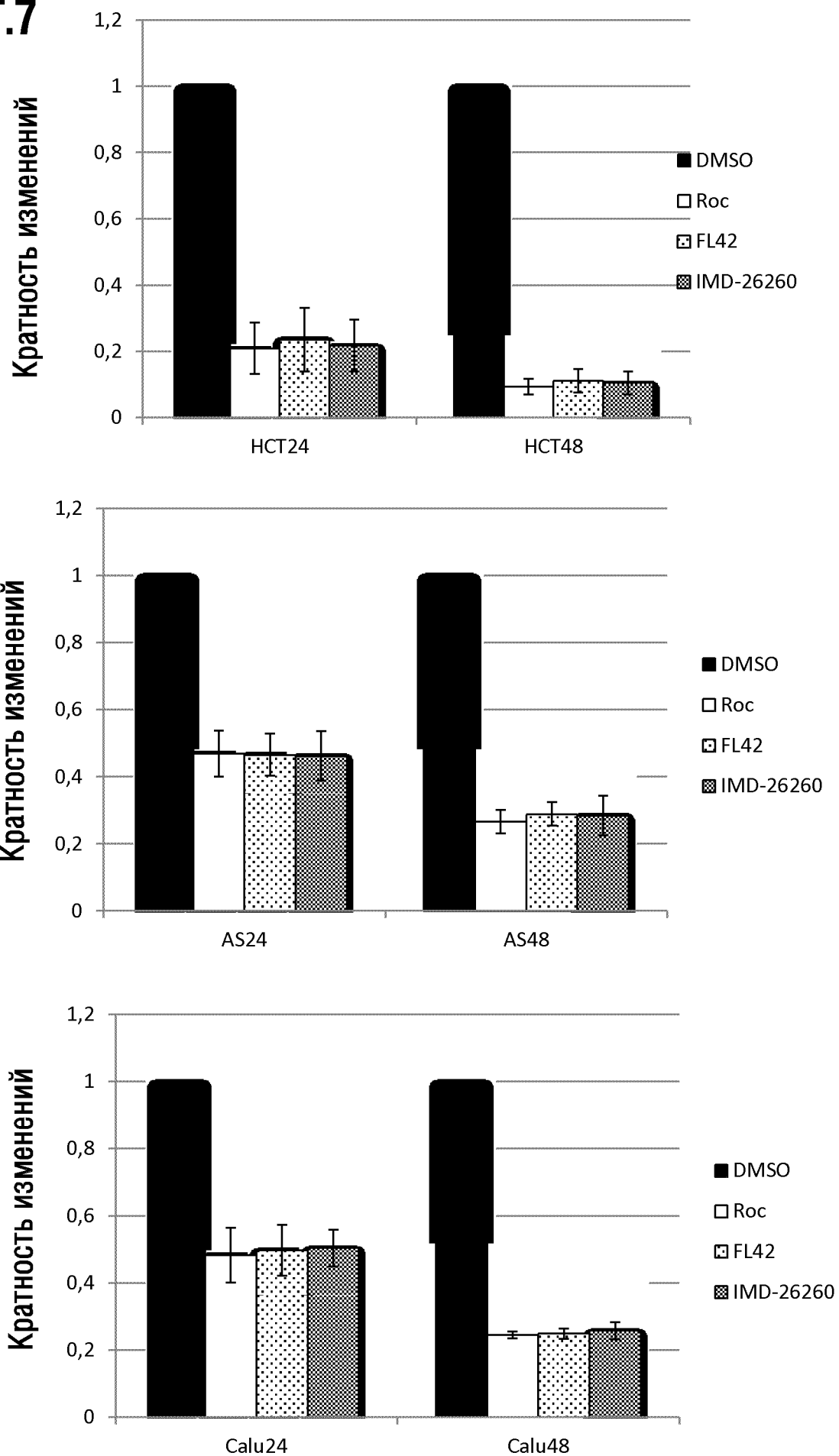
AsPC1



HCT116



ФИГ.7



ФИГ.8

