



(51) МПК
C07F 15/02 (2006.01)
A61K 31/295 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009140102/04, 30.05.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 30.05.2007

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.05.2007

(43) Дата публикации заявки: 20.05.2011 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 10.02.2012 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RAUCHFUSS T.B. et al, ROUSSIN. S RED SALT REVISITED: REACTIVITY OF Fe₂(μ-E)₂(NO)₄ (E=S, Se, Te) AND RELATED COMPOUNDS, INORGANIC CHEMISTRY, 1982, v.21, №2, p.827-830. SIMONA COSTANZO et al, RE-EXAMINATION OF THE FORMATION OF DINITROSYL-IRON COMPLEXES DURING REACTION OF S-NITROSOTHIOLS WITH Fe(II), INORGANICA CHIMICA ACTA, 2001, v.318, (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 29.10.2009

(86) Заявка РСТ:
 RU 2007/000286 (30.05.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2008/147243 (04.12.2008)

Адрес для переписки:
 142432, Московская обл., г.Черноголовка, пр-кт Акад. Семенова, 1, директору ИПХН РАН, академику С.М.Алдошину

(72) Автор(ы):

Санина Наталия Алексеевна (RU),
 Жукова Ольга Степановна (RU),
 Смирнова Зоя Сергеевна (RU),
 Руднева Татьяна Николаевна (RU),
 Шилов Геннадий Викторович (RU),
 Алдошин Сергей Михайлович (RU),
 Давыдов Михаил Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
 Институт проблем химической физики РАН
 (ИПХФ РАН) (RU),
 Учреждение Российской академии
 медицинских наук Российский
 онкологический научный центр имени
 Н.Н.Блохина РАМН (РОНЦ
 им.Н.Н.Блохина РАМН) (RU)

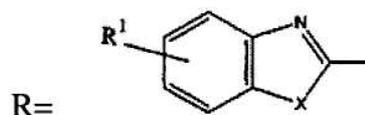
RU 2 441 872 C2

RU 2 441 872 C2

(54) БИЯДЕРНЫЕ НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С БЕНЗАГАТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биядерному нитрозильному комплексу железа с бензагетероциклическими производными общей формулы [Fe₂(SR)₂(NO)₄], где



и где X представляет собой NH, S, R¹ представляет низший алкил. Также предложены способ его получения, донор

монооксида азота, применение в качестве противоопухолевого лекарственного средства и для получения противоопухолевого лекарственного средства, фармацевтическая композиция и набор, применяемый для лечения онкологических заболеваний. Технический

результат заключается в получении биядерного нитрозильного комплекса железа, используемого как противоопухолевое средство с повышенной эффективностью и пониженной токсичностью. 7 н. и 9 з.п. ф-лы, 4 табл., 3 ил.

(56) (продолжение):

р.1-7. **ВАНИН А.Ф.** Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы - две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. Биохимия, 1998, т.63, вып.7, с.924-938. RU 2223072 С2, 10.02.2004.

R U 2 4 4 1 8 7 2 С 2

R U 2 4 4 1 8 7 2 С 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07F 15/02 (2006.01)
A61K 31/295 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2009140102/04, 30.05.2007

(24) Effective date for property rights:
30.05.2007

Priority:

(22) Date of filing: 30.05.2007

(43) Application published: 20.05.2011 Bull. 14

(45) Date of publication: 10.02.2012 Bull. 4

(85) Commencement of national phase: 29.10.2009

(86) PCT application:
RU 2007/000286 (30.05.2007)(87) PCT publication:
WO 2008/147243 (04.12.2008)

Mail address:

142432, Moskovskaja obl., g.Chernogolovka, pr-kt
Akad. Semenova, 1, direktoru IPKhN RAN,
akademiku S.M.Aldoshinu

(72) Inventor(s):

Sanina Natalija Alekseevna (RU),
Zhukova Ol'ga Stepanovna (RU),
Smirnova Zoja Sergeevna (RU),
Rudneva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Shilov Gennadij Viktorovich (RU),
Aldoshin Sergej Mikhajlovich (RU),
Davydov Mikhail Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut
problem khimicheskoy fiziki RAN (IPKhF RAN)
(RU),
Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk Rossijskij onkologicheskij nauchnyj tsentr
imeni N.N.Blokhina RAMN (RONTs
im.N.N.Blokhina RAMN) (RU)

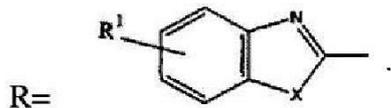
(54) **BINUCLEAR NITROSYL IRON COMPLEXES WITH BENZAZEHETEROCYCLIC DERIVATIVES, WAYS OF ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: invention refers to binuclear nitrosyl iron complexes with benzazeheterocyclic derivatives with general formula $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ where

R is



And where X

is NH, S, R¹ is lower alkyl. Also there is proposed method for its production, nitrogen monoxide donor, application as oncology drug and for production of oncology drug, pharmaceutical composition and set used for treatment of oncology diseased.

EFFECT: production of binuclear nitrosyl iron complex that is used as an oncology drug with increased effectiveness and decreased toxicity.

15 cl, 3 ex, 4 tbl, 3 dwg

Область техники

Изобретение относится к биядерным нитрозильным комплексам железа и может быть использовано в медицинской практике для создания лекарственных средств нового поколения для лечения онкологических заболеваний.

Предшествующий уровень техники

В последние годы с целью создания лекарственных препаратов нового поколения, применяемых в терапии онкологических заболеваний, ведется интенсивный поиск противоопухолевых средств на основе комплексов переходных металлов с улучшенным спектром активности и уменьшенными побочными эффектами по сравнению с уже используемыми клиническими препаратами, например цисплатином, нитропруссидом натрия и т.п.

Интерес к нитрозильным комплексам металлов усилился благодаря открытым возможностям их использования в качестве эффективных доноров NO в медицине, в частности для терапии опухолевых заболеваний. Применение доноров NO как нового класса противоопухолевых агентов связано с важной ролью NO в процессе роста злокачественных опухолей [Wink D., Vodovoz J., Cook J., Biochemistry, 1998, 63, 7, pp. 948-957]. Показано, что монооксид азота изменяет уровень апоптоза опухолевых клеток, активность гена p53 и неоангиогенез [Brune B., Scheneiderhan N., Nitric oxide evoked p53-accumulation and apoptosis, Toxicol Letters, 2003, 193, 2, pp.19-23], подавляет активность ключевого белка репарации Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы млекопитающих [L. Liu, M. Xu-Welliver, S. Kanagula, H.E. Pegg, Inactivation and degradation of Ob-alkylguanine-DNA alkyltransferase after reaction with nitric oxide., Canser. Res., 2002, 62, pp.3037-3043].

Связывание NO с активными центрами металлоферментов, в частности с негемовыми железосодержащими белками, изучается особенно интенсивно [Ford P.C., Lorkovic I.M., Chem. Rev., 2002, 102, 993; Hoshino M., Laverman L.E., Ford P.C., Coord. Chem. Rev., 1999, 187, p.75]. Установлено, что одной из форм природных резервуаров NO являются нитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами [Butler A.R., Megson I.I., Chem. Rev., 2002, 102, pp.1155-1165].

Их синтетические модели - эфиры "красной соли" Руссена - имеют состав $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R = Et, t-Bu, $(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{F}$, Ph [T. Thomas, J.H. Robertson, E.G. Cox, Acta. Crystalogr., 1958, 11, p.599; C. Glidewell, M.E. Harman, M.B. Hursthouse, I.L. Johnson, M. Motevalli, J. Chem.Res., 1998, 212, p.1676; R.E. Marsh, A.L. Spek, Acta. Crystalogr., Sect. B. Struct. Sci., 2001, 57, p.800; C. Jinhua, M. Shaoping, H. Jinling, L. Jiayi, Chinese J. Struct. Chem., 1983, 2, p. 263; T. B. Rauchfuss, T.D. Weatherill, Inorg. Chem., 1982, 21, pp. 827-830].

Эти биядерные диамагнитные серанитрозильные комплексы с R = Alk генерируют NO при термо- или фотоактивации [J.L. Bourassa, P.C. Ford, Coord. Chem. Rev., 2000, 200-202, pp. 887-900] и могут служить новыми перспективными противоопухолевыми NO-донирующими агентами.

Известны также биядерные парамагнитные серанитрозильные комплексы железа с лигандами типа $\mu\text{-N-C-S}$, являющиеся синтетическими аналогами природных доноров NO-динитрозильных комплексов железа (DNIC) с цистеином, глутатионом и другими тиолсодержащими лигандами малой молекулярной массы [O.A. Rakova, N.A. Sanina, S.M. Aldoshin, N.A. Goncharova, G.V. Shilov, Yu.M. Shulga, N.S. Ovanesyan, Inorganic Chemistry Communications 2003, 6, 145-148; A. F. Vanin, N.A. Sanina, V. A. Serezhenkov, D. Sh. Burbaev, V.I. Lozinsky и S.M. Aldoshin, Nitric oxide: biology & chemistry 2007, 16, 82-93].

Однако известные к настоящему времени синтетические доноры NO различных

классов не используются в качестве терапевтических средств для лечения онкологических заболеваний, а применяются только для усиления (в различной мере в зависимости от химической природы) действия существующих химиотерапевтических средств или радиотерапии [Wink D., Vodovoz J., Cook J., Biochemistry, 1998, 63, 7, pp. 948-957; N.P. Konovalova, S.A. Goncharova, L.M. Volkova, T.A. Raevskaya, L.T. Eremenko, A.M. Korolev, Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 2003, 8, pp. 59-64; Yang, W., Rogers P.A., Ding H., J. Biol. Chem., 2002, 277, pp. 12868-12873; O. Siri, A. Tabard, P. Pullumbi, R. Guilard, Inorg. Chim. Acta 2003, 350, p. 633; J.L. Burgaud, E. Jngini, Del Soldato P. Ann, N.Y. Acad. Sci. 2002, 962, p.360; T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, G.S. Kalendo, Toxicology Letters, 2001, 121, p.57].

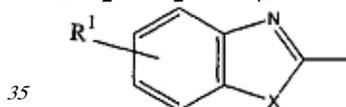
В работе A. Janczyk et al. Nitric Oxide, 2004, 10, 1, pp. 42-50, изучено непосредственное цитотоксическое действие нитрозильного комплекса железа $\text{Na}[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$ на клетки меланомы человека и мыши. Однако этот нитрозильный комплекс железа генерирует NO при фотоактивации (даже в темноте), а также не может быть использован в качестве противоопухолевого лекарственного средства из-за высокой токсичности в отношении нормальных клеток.

Таким образом, существует потребность в других противоопухолевых средствах с повышенной эффективностью и пониженной токсичностью.

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала противоопухолевых средств и создание противоопухолевых лекарственных средств на основе комплексов переходных металлов с улучшенным спектром активности и уменьшенными побочными эффектами, в частности, лекарственного средства на основе биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными, действующими как доноры NO, с повышенной активностью и пониженной токсичностью.

Краткое описание существа изобретения

В одном аспекте изобретение относится к новым биядерным нитрозильным комплексам железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R представляет собой



где X представляет собой NH, S или O, R¹ представляет собой низший алкил.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ обработкой тиосульфатного нитрозильного комплекса железа соответствующим бензазагетероциклическим тиолом в стехиометрическом соотношении в присутствии восстановителя, в щелочной среде. Этот способ позволяет впервые получить заявляемые комплексы в кристаллической форме.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к донору монооксида азота, представляющему собой биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными, охарактеризованный выше.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к применению биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ в качестве противоопухолевого лекарственного средства.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ для получения противоопухолевых

лекарственных средств.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество биядерного нитрозильного комплекса железа с бензазагетероциклическими производными формулы

[Fe₂(SR)₂(NO)₄] и фармацевтически приемлемый носитель.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к набору, применяемому для лечения онкологических заболеваний, содержащему: (1) фармацевтическую композицию, включающую биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными формулы [Fe₂(SR)₂(NO)₄], где R имеет вышеуказанные значения, в герметичной упаковке; и (2) вспомогательные средства.

Описание фигур:

На фиг.1 представлена молекулярная структура комплекса (Fe₂S₂N₈C₁₄H₁₀O₄) [комплекс I].

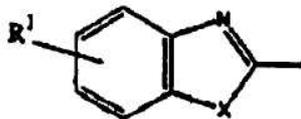
Комплекс имеет centrosymmetric димерную биядерную структуру (фиг.1). В димере два тетраэдрически координированных двумя группами NO и двумя бензазагетероциклическими тиолилами атома железа связаны мостиком: Fe-S-C-N-Fe. Комплекс содержит две молекулы растворителя - ацетона.

На фиг.2 представлена кристаллическая структура комплекса (Fe₂S₂N₈C₁₄H₁₀O₄) [комплекс I].

На фиг.3 показано изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии комплекса I (Fe₂S₂N₈C₁₄H₁₀O₄) с гемоглобином (Hb). Растворитель - 0,05% фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 3,3% диметилсульфоксида, 25°C.

Подробное описание изобретения

Новые биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными согласно настоящему изобретению имеют общую формулу [Fe₂(SR)₂(NO)₄], где R представляет собой



где X представляет собой NH, S, R¹ представляет собой низший алкил.

Предпочтительно R представляет собой бензимидазол-2-ил, 5-метил-бензимидазол-2-ил или бензтиазол-2-ил.

Используемый здесь термин «низший алкил» означает алкильный радикал с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Примеры таких алкильных радикалов включают метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, гексил.

В уровне техники отсутствуют сведения о заявляемых соединениях и способе их получения.

Способ получения новых биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы [Fe₂(SR)₂(NO)₄], где R имеет вышеуказанные значения, заключается в том, что тиосульфатный нитрозильный комплекс железа бис(μ-тиосульфато-S)-бис(динитрозилферрат)(2-) натрия Na₂[Fe₂(S₂O₃)₂(NO)₄] (ТНКЖ) обрабатывают соответствующим бензазагетероциклическим тиолом в стехиометрическом соотношении в присутствии восстановителя, и процесс ведут в щелочной среде с последующим выделением целевого продукта известными приемами.

Предпочтительно, процесс осуществляют при комнатной температуре,

преимущественно при 18-25°C.

Предпочтительно, процесс ведут в бескислородной атмосфере.

В качестве бензазагетероциклического тиола, предпочтительно, используют бензимидазол-2-тиол, 5-метилбензимидазол-2-тиол или бензтиазол-2-тиол.

В качестве восстановителя в способе по настоящему изобретению используют водород, тиосульфаты металлов, например $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, сероводород и алифатические тиолы.

Авторы изобретения установили, что биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными настоящего изобретения являются эффективными донорами NO, генерируя монооксид азота самопроизвольно при разложении в протонных средах (таких, как вода, кровь и ее компоненты, физиологические растворы и т.п.), в отсутствие хемо-, фото- или ферментативной активации. Таким образом, комплексы по настоящему изобретению представляют собой новый перспективный класс доноров монооксида азота - синтетических аналогов активных участков нитрозильных негемовых железо-серных белков - природных "депо" NO. Поэтому настоящее изобретение в дополнительном аспекте относится к донорам монооксида азота, представляющим собой биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными, представленные выше.

Биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными природных ароматических тиолов настоящего изобретения обладают противоопухолевой активностью в отношении опухолевых клеток млекопитающего, в частности человека.

Настоящее изобретение далее направлено на применение биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R имеет вышеуказанные значения, в качестве противоопухолевого лекарственного средства.

В частности, соединения настоящего изобретения могут быть использованы для лечения следующих онкологических заболеваний: рака яичника, аденокарциномы молочной железы, меланомы B-16, эпидермоидной карциномы Льюиса.

Комплексы железа согласно настоящему изобретению пригодны для ингибирования роста опухолей у млекопитающих и их предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, включающей эффективное противоопухолевое количество соединения согласно настоящему изобретению в комбинации с, по меньшей мере, одним фармацевтически или фармакологически приемлемым носителем и/или эксципиентом. Носитель, также известный из уровня техники, как эксципиент, наполнитель, вспомогательное вещество, добавка или разбавитель, представляет собой любое вещество, которое фармацевтически инертно, придает соответствующую консистенцию или форму композиции и не ослабляет терапевтической эффективности противоопухолевых соединений. Носитель является "фармацевтически или фармакологически приемлемым", если он не вызывает побочной, аллергической или другой неблагоприятной реакции при введении млекопитающему или человеку соответственно.

Настоящее изобретение относится также к применению биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R имеет вышеуказанные значения, для получения противоопухолевого лекарственного средства.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает фармацевтические композиции,

содержащие эффективное количество биядерного нитрозильного комплекса железа с бензазагетероциклическими производными формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R имеет вышеуказанные значения, и фармацевтически приемлемый носитель.

Предпочтительно, в качестве фармацевтически приемлемого носителя в композиции по изобретению используют протонсодержащую среду.

В качестве фармацевтически приемлемого носителя в композиции по изобретению используют, предпочтительно, также смесь протонсодержащей среды и диметилсульфоксида.

Предпочтительно, в качестве протонсодержащей среды используют воду, физиологический раствор, водорастворимые биополимеры.

Предпочтительно, биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическим производным присутствует в композиции в количестве 50-100 мкМ.

Фармацевтические композиции, содержащие противоопухолевые соединения согласно настоящему изобретению, могут быть получены любым обычным способом. Необходимую препаративную форму выбирают в зависимости от выбранного способа введения. Композиции согласно изобретению могут быть приготовлены для любого способа введения так, чтобы ткань-мишень была доступна при таком пути введения. Пригодные пути введения включают, но не ограничены ими, пероральное, парентеральное (например, внутривенное, внутриартериальное, подкожное, ректальное, внутримышечное, интраорбитальное, интракапсулярное, интраспинальное, интраперитонеальное или интрастернальное), локальное (назальное, чрескожное, внутриглазное), внутривезикулярное, внутриоболочечное, в тонкую кишку, легочное, интралимфатическое, внутривезикулярное, вагинальное, трансуретральное, интрадермальное, ушное, интрамаммарное, трансбуккальное, ортотопическое, внутритрахеальное, внутриочаговое, чрескожное, эндоскопическое, чресслизистое, подъязычное и кишечное введения.

Фармацевтически приемлемые носители для использования в композициях согласно настоящему изобретению хорошо известны специалисту и их выбирают в зависимости от ряда факторов: используемое конкретное противоопухолевое соединение и его концентрация, стабильность и ожидаемая биологическая доступность; заболевание, нарушение или состояние человека, которого лечат композицией; субъект, его возраст, вес и общее состояние; и способ введения. Пригодные носители легко определяемы специалистом (J.G. Nairn в: Remington's Pharmaceutical Science (изд. A. Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1985, pp. 1492-1517).

Композиции, предпочтительно, получают в виде таблеток, диспергирующихся порошков, пилюль, капсул, желатиновых капсул, каплет с покрытием, гелей, липосом, гранул, растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров, пастилок, драже, лепешек или любой другой лекарственной формы, которая может быть введена перорально.

Композиции согласно настоящему изобретению для перорального введения включают эффективное противоопухолевое количество соединения согласно изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Пригодные носители для твердых дозированных форм включают сахара, крахмалы и другие обычные вещества, включающие лактозу, тальк, сахарозу, желатин, карбоксиметилцеллюлозу, агар, манит, сорбит, фосфат кальция, карбонат кальция, карбонат натрия, каолин, альгиновую кислоту, гуммиарабик, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, сахаринат натрия, карбонат магния, трагакант, микрокристаллическую целлюлозу, коллоидный диоксид кремния, натрийкроскармеллозу, тальк, стеарат магния и

стеариновую кислоту. Далее, такие твердые лекарственные формы могут быть без покрытия или могут быть с нанесенным известными способами покрытием, например, для задержки разрушения и абсорбции.

5 Протипоопухолевые соединения согласно настоящему изобретению также предпочтительно используют для приготовления дозированной формы для парентерального введения, например, в виде дозированной формы для инъекции внутривенным, внутривартериальным, подкожным, ректальным, внутримышечным, интраорбитальным, интракапсулярным, интраспинальным, интраперитонеальным 10 или интравастеральным путями. Композиции согласно изобретению для парентерального введения включают эффективное протипоопухолевое количество протипоопухолевого соединения в фармацевтически приемлемом носителе. Пригодные для парентерального введения лекарственные формы включают 15 растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии или любую другую лекарственную форму, которая может быть введена парентерально. Методики и композиции для получения парентеральных лекарственных форм известны из уровня техники.

В композиции согласно изобретению может быть включено для различных целей незначительное количество дополнительных компонентов, хорошо известных в 20 фармацевтической промышленности. Эти компоненты большей частью придают свойства, которые увеличивают время удерживания протипоопухолевого соединения в месте введения, способствуют стабильности композиции, обеспечивают регулирование значения рН, облегчают введение протипоопухолевого соединения в фармацевтические композиции и т.п. Каждый из этих компонентов индивидуально 25 присутствует в количестве, предпочтительно, меньше примерно 15 масс.%, более предпочтительно, меньше примерно 5 масс.% и, наиболее предпочтительно, меньше примерно 0,5 масс.% в расчете на общую массу композиции. Некоторые компоненты, такие как наполнители или разбавители, могут составлять вплоть до 90 масс.% в 30 расчете на общую массу композиции, как хорошо известно в технологии приготовления лекарственных средств. Такие добавки включают криозащитные компоненты для предотвращения осаждения комплекса железа с тиофенолом, поверхностно-активные вещества, смачивающие или эмульгирующие агенты (например, лецитин, полисорбат-80, Твин® 80, плуроник-60, полиоксиэтиленстеарат), 35 консерванты (например, этил-п-гидроксibenзоат), предохраняющие от воздействия микробов средства (например, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол, сорбиновая кислота, тимеросал и парабен), агенты для регулирования значения рН или буферирующие агенты (например, кислоты, основания, ацетат натрия, сорбитан-монолаурат), компоненты для регулирования осмомолярности (например, глицерин), 40 загустители (например, моностеарат алюминия, стеариновая кислота, цетиловый спирт, стеариловый спирт, гуаровая смола, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, тристеарин, сложные цетиловые эфиры воска, полиэтиленгликоль), пигменты, красители, добавки, придающие текучесть, нелетучие 45 силиконы (например, циклометикон), глины (например, бентониты), адгезивы, увеличивающие объем агенты, ароматизаторы, подслащивающие вещества, адсорбенты, наполнители (например, вода, солевой раствор, растворы электролитов), связующие (например, крахмалы, такие как кукурузный крахмал, пшеничный 50 крахмал, рисовый крахмал или картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, сахара, полимеры, гуммиарабик), разрыхляющие агенты (например, крахмалы, такие как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый

крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилкрахмал, структурированный поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия, натрийкроскармеллоза или кросповидон), смазывающие агенты (например, диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота или ее соли, такие как стеарат магния, или полиэтиленгликоль), агенты для покрытий (например, концентрированные растворы сахара, включающие гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбополгель, полиэтиленгликоль или диоксид титана) и антиоксиданты (например, метабисульфит натрия, бисульфит натрия, сульфит натрия, декстроза, фенолы и тиофенолы).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления фармацевтическая композиция согласно изобретению включает, по меньшей мере, один неводный фармацевтически приемлемый растворитель и противоопухолевое соединение, обладающее растворимостью в нем, по меньшей мере, примерно 10-60 мг/мл. Без связи с какой-либо конкретной теорией полагают, что растворимость в диметилсульфоксиде противоопухолевого соединения может быть непосредственно связана с его эффективностью. Также предпочтительным является то, что противоопухолевое соединение имеет значение ID_{100} (то есть концентрация лекарственного средств, вызывающая 100%-ное ингибирование образования колонии), по меньшей мере, в 4 раза меньше, чем цисплатин, при проведении измерения в соответствии с методикой, описанной в книге «Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США» под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США) М.: Медицина, 1979 г., с. 71-105.

Введение дозированной формы указанными путями может быть непрерывным или периодическим, зависящим, например, от физиологического состояния пациента, от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных или оцениваемых практикующим врачом.

Доза и схемы введения фармацевтических композиций согласно изобретению могут быть легко определены онкологом. Понятно, что доза противоопухолевых соединений зависит от возраста, пола, состояния здоровья и веса реципиента, типа проводимого одновременно лечения, если оно имеется, частоты обработки и природы желаемого эффекта. Для любого способа введения точное количество используемого противоопухолевого соединения, а также назначаемая доза, необходимая для достижения описанных здесь полезных воздействий, также зависит, в частности, от таких факторов, как биодоступность противоопухолевого соединения, заболевание человека, которое лечат, желаемая терапевтическая доза, и других факторов, которые очевидны специалисту.

Концентрация противоопухолевого соединения в жидкой фармацевтической композиции составляет наиболее предпочтительно 50-100 мкМ. Как правило, предпочтительны относительно низкие концентрации, так как противоопухолевое соединение наиболее растворимо при низких концентрациях.

Эмульсии для парентерального введения могут быть приготовлены растворением противоопухолевого соединения в любом фармацевтически приемлемом растворителе, способном растворять соединение (например, ДМСО, дихлорметан), с образованием раствора. К раствору при перемешивании добавляют соответствующий объем носителя, который представляет собой эмульсию, такую как эмульсия Liposyn II или Liposyn III, с получением фармацевтически приемлемой эмульсии для парентерального введения пациенту. Если желательно, такие эмульсии могут быть приготовлены с содержанием минимального количества или без него

раствора Cremophor®.

Растворы для перантерального введения могут быть приготовлены растворением противоопухолевого соединения в любом фармацевтически приемлемом растворителе, способном растворять соединение (например, ДМСО), с образованием раствора. К раствору при перемешивании добавляют соответствующий объем носителя, который представляет собой протонсодержащую среду (солевые растворы, растворы сахаров, водорастворимые полимеры, белки, растворы электролитов) для парентерального введения пациенту.

Так, например, для жидких препаративных форм в качестве носителя обычно используют неводные фармацевтически приемлемые полярные растворители, такие как масла, спирты, амиды, сложные эфиры, простые эфиры, кетоны, углеводороды и их смеси, а также воду, солевые растворы, растворы декстрозы (например, DW5), растворы электролитов или любую другую протонную фармацевтически приемлемую среду.

Пригодные неводные фармацевтически приемлемые полярные растворители включают, но не ограничены ими, амиды (например, диметилацетамид (DMA), диметилацетамидбензилбензоат, диметилформаид, N-(β-гидроксиэтил) лактамид, N,N-диметилацетамид, 2-пирролидинон, 1-метил-2-пирролидинон или поливинилпирролидон); сложные эфиры (например, эфиры уксусной кислоты, такие как моноацетин, диацетин и триацетин; алифатические или ароматические сложные эфиры, такие как этилкаприлат или этилоктаноат, алкилолеат, бензилбензоат, бензилацетат, диметилсульфоксид (ДМСО), сложные эфиры глицерина, такие как моно-, ди- или триглицерилцитраты или тартраты, этилбензоат, этилацетат, этилкарбонат, этиллактат, этилолеат, эфиры жирных кислот сорбитана, эфиры жирных кислот и полиэтиленгликоля (ПЭГ), глицерилмоностеарат, сложные эфиры глицеридов, таких как моно-, ди- или триглицериды, эфиры жирных кислот, такие как изопропилмириститат, эфиры на основе жирных кислот и ПЭГ, такие как ПЭГ-гидроксиолеат и ПЭГ-гидроксистеарат, N-метилпирролидинон, плуроник-60, полиоксиэтиленированные сложные полиэфиры на основе сорбита и олеиновой кислоты, такие как поли(оксиэтилен)₃₀₋₆₀сорбитполи(олеат)₂₋₄, поли(оксиэтилен)₁₅₋₂₀моноолеат, поли(оксиэтилен)₁₅₋₂₀моно-12-гидроксистеарат и поли(оксиэтилен)₁₅₋₂₀монорицинолеат; полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры, такие как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат, полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоностеарат и полисорбат® 20, 40, 60 или 80 фирмы ICI Americas, Wilmington, DE; поливинилпирролидон; модифицированные алкиленоксидами эфиры жирных кислот, такие как гидрированное полиоксил(40)-касторовое масло и полиоксиэтиленированные касторовые масла (например, раствор Cremophor® EL или раствор Cremophor® RH 40); эфиры жирных кислот и сахара (то есть продукт конденсации моносахарида (например, пентозы, такие как рибоза, рибулоза, арабиноза, ксилоза, ликсоза и ксилулоза; гексозы, такие как глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза и сорбоза; триозы, тетрозы, гептозы и октозы), дисахарида (например, сахароза, мальтоза, лактоза и трегалоза) или олигосахарида или их смеси с жирной кислотой (жирными кислотами) с 4-22 атомами углерода (например, насыщенные жирные кислоты, такие как каприловая кислота, каприновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота и стеариновая кислота, и насыщенные жирные кислоты, такие как пальмитолеиновая кислота, олеиновая кислота, элаидиновая кислота, эруковая кислота и линолевая

кислота)), или стероидальные сложные эфиры); алкиловые, арильные или циклические простые эфиры с 2-30 атомами углерода (например, диэтиловый эфир, тетрагидрофуран, диметилизосорбит, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля); гликофуrol (простой эфир полиэтиленгликоля и тетрагидрофурурилового спирта);
5 кетоны с 3-30 атомами углерода (например, ацетон, метилэтилкетон, метилизобутилкетон); алифатические, циклоалифатические или ароматические углеводороды с 4-30 атомами углерода (например, бензол, циклогексан, дихлорметан, диоксоланы, гексан, н-декан, н-додекан, н-гексан, сульфолан, тетраметилсульфон,
10 тетраметилсульфоксид, толуол, диметилсульфоксид (ДМСО) или тетраметилсульфоксид); алкил- или арилгалогениды, содержащие 1-30 атомов углерода и необязательно более одного атома галогена в качестве заместителя; дихлорметан; моноэтаноламин; петролейный эфир; троламин; омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты (например, альфа-линоленовая кислота,
15 эйкозапентаеновая кислота, докозапентаеновая кислота или докозагексаеновая кислота); полигликолевый эфир 12-гидроксистеариновой кислоты и полиэтиленгликоля (Solutol® HS-15 фирмы BASF, Ludwigshafen, Germany); полиоксиэтиленглицерин; лаурат натрия; олеат натрия; или сорбитанмоноолеат.

20 Предпочтительно, в качестве фармацевтически приемлемого носителя в настоящем изобретении использовать протонсодержание среды, такие как вода, солевые растворы, водорастворимые полимеры, белки, растворы декстрозы (например, DW5), растворы электролитов или спиртов из каталога "PAA Laboratory's" (2006) p.26.

25 В следующем аспекте настоящего изобретения предлагается набор для лечения онкологических заболеваний, который включает: (1) фармацевтическую композицию, содержащую биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными настоящего изобретения, в герметичной упаковке; и (2) вспомогательные средства.

30 Набор может содержать композицию в виде единичной дозированной формы или в виде множественных доз. Набор может включать формы для перорального или парентерального введения.

35 Фармацевтическая композиция в наборе может быть помещена в стеклянные или полимерные пузырьки, ампулы, флаконы, дозированные картриджи для инъекторов, блистеры, капсулы, пакетики с композицией, применяемые соответственно для пероральной или парентеральной формы.

40 Вспомогательные средства включают жидкости для восстановления композиции, вводимой парентерально, если она в наборе представлена в концентрированной форме, например в виде сухого вещества, высушенного препарата и т.п.; средства для получения пероральных жидких форм и форм для инъекций *ex tempore*. В качестве жидкости для восстановления может быть использована вода для инъекций, физиологический раствор, раствор лидокаина и т.п. Для восстановления композиции, применяемой в жидком виде перорально, может быть использован раствор глюкозы,
45 сахаров, сиропы и т.п.

Необязательные вспомогательные средства набора включают средства для вскрытия укупок, средства для герметизации вскрытых многоразовых укупок, вкладыши-инструкции.

50 Фармацевтическая композиция, представляющая собой твердую дозированную форму для перорального введения, может быть представлена в наборе в виде таблеток, капсул в блистерах, ампулах, флаконах, пузырьках, пакетиках и т.п. Фармацевтическая композиция, представляющая собой жидкую дозированную форму

для парентерального или перорального введения, может быть представлена в наборе во флаконах, капсулах, ампулах, картриджах и т.п.

Пример набора для парентерального введения включает упаковку, в которой размещены инструкции по применению, ампулы или флаконы с сухой композицией и ампулы с физиологическим раствором для инъекций. В упаковку вкладывается приспособление для вскрытия ампул. Ампулы упакованы в блистеры по 10 ампул.

Другие варианты набора очевидны для специалиста в данной области из представленного выше описания.

Следующие примеры приводятся только как дополнительная иллюстрация изобретения и их не следует рассматривать в качестве ограничения изобретения.

Примеры синтеза комплексов

Пример 1

Синтез комплекса (I), где R = бензимидазол-2-ил ($\text{Fe}_2\text{S}_2\text{N}_8\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$)

Для синтеза использовали исходные реактивы $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), NaOH (чда), 2-меркаптобензимидазол (Aldrich). Все операции по приготовлению, смешиванию растворов и выделению комплексов проводили в атмосфере технического аргона при комнатной температуре. Для перекристаллизации использовали органический растворитель.

Смесь 0,992 г (4 ммоль) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1,074 г (2 ммоль) тиосульфатного нитрозильного комплекса железа бис(μ -тиосульфато-S)-бис(динитрозилферрат)(2-) натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ (ТНКЖ) растворяли в дистиллированной воде. Смесь, состоящую из 1,500 г (10 ммоль) 2-меркаптобензимидазола и 0,44 г (11 ммоль) NaOH, также растворяли в воде.

Оба раствора смешивали. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход полупродукта составлял 0,719 г. Через сутки осадок перекристаллизовывали.

Комплекс хорошо растворяется в этаноле, метаноле, ацетоне, ДМСО и ДМФА. Не растворяется в дихлорметане, воде, гептане и эфире.

Выход: 63,50%;

Для $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{N}_8\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$ найдено, %: Fe, 19,27; S, 10,69; N, 18,54; C, 43,40; H, 4,78; вычислено, %: Fe, 18,99; S, 10,90; N, 19,05; C, 44,93; O, 16,32; H, 4,45.

ИК-спектр (cm^{-1}): 3207, 1787, 1738, 1515, 1467, 1428, 1384, 1272, 1218, 1183, 1002, 742, 713, 603.

Пример 2

Синтез комплекса (II), где R = 5-метилбензимидазол-2-ил ($\text{Fe}_2\text{S}_2\text{N}_8\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$)

Для синтеза использовали исходные реактивы $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), NaOH (чда), 2-меркапто-5-метилбензимидазол (Aldrich). Все операции по приготовлению, смешиванию растворов и выделению комплексов проводили в атмосфере технического аргона при комнатной температуре. Для перекристаллизации использовали органический растворитель. Для синтеза готовили дистиллированную воду, пропуская через нее в течение 30 минут ток технического аргона.

Смесь 0,4960 г (2 ммоль) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5740 г (1 ммоль) тиосульфатного нитрозильного комплекса железа бис(μ -тиосульфато-S)-бис(динитрозилферрат)(2-) натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ (ТНКЖ) растворяли в дистиллированной воде. Смесь, состоящую из 0,8250 г (5 ммоль) 2-меркапто-5-метилбензимидазола и 0,2890 г (7 ммоль) NaOH, также растворяли в воде.

Оба раствора смешивали. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход полупродукта составлял 2,2017 г. Через сутки осадок перекристаллизовывали.

Комплекс хорошо растворяется в ацетоне, ДМСО и ДМФА. Не растворяется в

дихлорметане, воде, гептане и эфире.

Выход: 45,53%;

Для $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{N}_8\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ найдено, %: Fe, 19,27; S, 10,69; N, 19,54; C, 34,26; H, 2,48;
вычислено, %: Fe, 20,01; S, 11,49; N, 20,08; C, 34,43, O, 11,47; H, 2,53.

ИК-спектр (cm^{-1}): 3133, 1790, 1724, 1619, 1490, 1443, 1411, 1373, 1276, 1223, 1189, 1011, 854, 800, 720, 596, 543.

Пример 3

Синтез комплекса (III), где R = бензтиазол-2-ил ($\text{Fe}_2\text{S}_4\text{N}_6\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4$)

Для синтеза использовали исходные реактивы $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), NaOH (чда), 2-меркаптобензтиазол (Aldrich). Все операции по приготовлению, смешиванию растворов и выделению комплексов проводили в атмосфере технического аргона при комнатной температуре. Для перекристаллизации использовали органический растворитель. Для синтеза готовили дистиллированную воду, пропуская через нее в течение 30 минут ток технического аргона.

Смесь 0,4960 г (2 ммоль) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5740 г (1 ммоль) тиосульфатного нитрозильного комплекса железа бис(μ -тиосульфато-S)-бис(динитрозилферрат)(2-) натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ (ТНКЖ) растворяли в дистиллированной воде. Смесь, состоящую из 0,8402 г (5 ммоль) 2-меркаптобензтиазола и 0,2890 г (7 ммоль) NaOH, также растворяли в воде.

Оба раствора смешивали. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход полупродукта составлял 1,1182 г. Через сутки осадок перекристаллизовывали.

Комплекс хорошо растворяется в этаноле, метаноле, ацетоне, хлористом метиле, ацетонитриле, эфире, ТГФ, ДМСО и ДМФА. Не растворяется в воде, гептане.

Для $\text{Fe}_2\text{S}_4\text{N}_6\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4$ найдено, %: Fe, 18,96; S, 22,01; N, 14,54; C, 29,39; H, 1,57; вычислено, %: Fe, 19,78; S, 22,72; N, 14,89; C, 29,79, O, 11,34; H, 1,43.

ИК-спектр (cm^{-1}): 3448, 2923, 2852, 2379, 1787, 1721, 1468, 1429, 1384, 1313, 1270, 1006, 852, 754, 724, 706, 611.

ИК-спектры всех образцов регистрировали на спектрометре Фурье SPECTRUM VX-II. Образец готовили в виде таблеток с KBr (1 мг исследуемого вещества на 300 мг KBr).

Рентгенодифракционный анализ комплекса $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{N}_8\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$ (I) проводили на автоматическом четырехкружном дифрактометре P-4 фирмы BRUKER (графитовый монохроматор, $\lambda(\text{Mo-K}\alpha)=0,71073 \text{ \AA}$, температура 200 К, $\theta/2\theta$ -сканирование). В эксперименте использовали монокристалл черного цвета в виде параллелепипеда размерами 0,35×0,20×0,15 мм. Кристаллы неустойчивы при комнатной температуре и разрушаются со скоростью 10% за 1 час. Структура расшифрована прямым методом. Положения и тепловые параметры неводородных атомов уточнены в изотропном, а затем анизотропном приближении полноматричным методом наименьших квадратов (МНК). Водородные атомы выявлены из разностных синтезов Фурье и уточнены в изотропном приближении.

Молекулярная структура комплекса I представлена на фиг.1. Комплекс имеет centrosymmetric димерную биядерную структуру. В димере два тетраэдрически координированных двумя группами NO и двумя бензагетероциклическими тиолилами, атомы железа связаны мостиком: Fe-S-C-N-Fe'. Комплекс содержит две молекулы растворителя - ацетона.

Кристаллографические данные и основные параметры уточнения представлены в таблице 1.

Межатомные расстояния и углы представлены в таблице 2.

Все расчеты выполнены с использованием комплекса программ SHELXTL (G.M.

Sheldrick, SHELXTL v.6.14, Structure Determination Software Suite, Bruker AXS, Madison, Wisconsin, USA, 2000).

Расстояние Fe(1)....Fe(1a) - 4,057 Å см. (таблица 2).

5

Таблица 1	
Кристаллографические данные и характеристики анализа для комплекса I	
Брутто-формула	C ₂₀ H ₂ Fe ₂ N ₈ O ₆ S ₂
Молекулярная масса	646,28
Температура	200(2) К
10 Длина волны	0,71073 Å
Сингония, пространственная группа	триклинная, P(-1)
a	8,737(1) Å
b	9,072(1) Å
c	9,083(1) Å
альфа	74,82(1)°
15 бета	73,10(1)°
гамма	86,62(1)°
V	664,70(13) Å ³
Z, d _{выч.}	1; 1,615 г/см ³
μ	13,00 см ⁻¹
20 F(000)	330
Размер кристалла	0,35×0,2×0,15 мм
Область съемки по θ	2,33-25,00°
Общее количество рефлексов/ независимых	2572/2080 [R(int) = 0,0205]
N/число параметров	2080/216
25 GOOF по F ²	0,994
R фактор для отражений с I>2(σ(I))	R1 = 0,0270, wR2 = 0,0705
R фактор для всех отражений	R1 = 0,0312, wR2 = 0,0731

30

Таблица 2			
Межатомные расстояния и валентные углы в структуре комплекса I			
Связь	d, Å	Связь	d, Å
Fe(1)-N(1)	1,682(2)	N(2)-O(2)	1,172(3)
Fe(1)-N(2)	1,687(2)	Fe(1)-N(3)#1	2,0215(18)
O(1)-N(1)	1,165(3)	Fe(1)-S(3)	2,3029(7)
35 S(3)-C(1)	1,736(2)		
Угол	Ω, град.	Угол	Ω, град.
O(2)-N(2)-Fe(1)	161,6(2)	N(2)-Fe(1)-S(3)	107,52(7)
O(1)-N(1)-Fe(1)	164,7(2)	N(3)#1-Fe(1)-S(3)	109,73(6)
N(1)-Fe(1)-N(2)	111,05(10)	C(1)-S(3)-Fe(1)	102,48(7)
40 N(1)-Fe(1)-N(3)#1	117,32(9)	C(1)-N(3)-Fe(1)#1	126,14(14)
N(2)-Fe(1)-N(3)#1	106,94(9)	C(3)-N(3)-Fe(1)#1	127,76(15)
N(1)-Fe(1)-S(3)	103,92(7)		
Связь	d, Å	Связь	d, Å
N(3)-C(1)	1,338(3)	C(7)-C(6)	1,378(4)
N(3)-C(3)	1,409(3)	C(3)-C(4)	1,387(4)
45 C(1)-N(4)	1,354(3)	C(4)-C(5)	1,394(3)
N(4)-C(2)	1,375(3)	C(2)-C(3)	1,401(3)
C(2)-C(7)	1,387(3)	C(6)-C(5)	1,389(4)
C(8)-C(10)	1,488(4)	C(8)-C(9)	1,492(4)
O(3)-C(8)	1,220(3)		
50 Угол	Ω, град.	Угол	Ω, град.
C(1)-N(3)-C(3)	105,98(17)	C(4)-C(3)-C(2)	120,2(2)
N(3)-C(1)-N(4)	111,1(2)	C(4)-C(3)-N(3)	131,5(2)
N(3)-C(1)-S(3)	126,47(16)	C(2)-C(3)-N(3)	108,3(2)
N(4)-C(1)-S(3)	122,39(19)	C(3)-C(4)-C(5)	117,4(2)

C(1)-N(4)-C(2)	108,7(2)	O(3)-C(8)-C(10)	121,3(2)
N(4)-C(2)-C(7)	132,1(2)	O(3)-C(8)-C(9)	121,4(2)
N(4)-C(2)-C(3)	105,84(19)	C(10)-C(8)-C(9)	117,2(3)
C(7)-C(2)-C(3)	122,0(2)	C(7)-C(6)-C(5)	120,8(2)
C(6)-C(7)-C(2)	117,6(2)		
Связь	d, Å	Связь	d, Å
C(4)-H(4)	0,96(3)	C(9)-H(9A)	0,96(4)
N(4)-H(1)	0,82(3)	C(9)-H(9B)	0,89(4)
C(6)-H(6)	0,95(3)	C(9)-H(9C)	0,90(4)
C(7)-H(7)	0,94(3)	C(10)-H(10A)	0,87(6)
C(5)-H(5)	0,88(3)	C(10)-H(10B)	0,99(5)
C(10)-H(10C)	0,96(4)		
Угол	Ω, град.	Угол	Ω, град.
C(1)-N(4)-H(1)	124(2)	C(6)-C(5)-H(5)	120,4(17)
C(2)-N(4)-H(1)	127(2)	C(4)-C(5)-H(5)	117,6(17)
C(6)-C(7)-H(7)	126,8(18)	C(8)-C(9)-H(9A)	110(2)
C(2)-C(7)-H(7)	115,5(18)	C(8)-C(9)-H(9B)	109(2)
C(3)-C(4)-H(4)	122,7(16)	C(8)-C(9)-H(9C)	109(2)
C(5)-C(4)-H(4)	119,9(16)	C(8)-C(10)-H(10A)	114(3)
C(7)-C(6)-H(6)	121(2)	C(8)-C(10)-H(10B)	111(3)
C(5)-C(6)-H(6)	118(2)	C(8)-C(10)-H(10C)	111(2)
C(6)-C(5)-C(4)	122,0(3)		

Матрицы генерации эквивалентных позиций атомов:

#1 -x, -y, -z

Кристаллическая структура комплекса I представлена на фиг.2.

Мессбауэровские спектры поглощения снимали на установке WissEl, работающей в режиме постоянного ускорения. Источником служил Co^{57} в матрице Rh. Измерения спектров при низких температурах проводили с помощью проточного гелиевого криостата CF-506 (Oxford Instruments) с регулируемой температурой. Обработку мессбауэровских спектров проводили методом наименьших квадратов в предположении лоренцевой формы индивидуальных спектральных компонент.

Результаты представлены в таблице 3.

Комплекс	δ_{Fe} , мм/с ⁻¹	ΔE_{Q} , мм/с ⁻¹
I	0,202	0,954
II	0,232	0,805
III	0,217	0,994

Исследование NO-донорной активности биядерных нитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими производными

NO-донорная активность комплексов I-III впервые установлена при исследовании их реакций с гемоглобином (Hb). В основе метода исследования лежит реакция образования Hb-NO при взаимодействии гемоглобина со свободным NO в растворе [R. Cassoly, Q.H. Gibson, Conformation, co-operativity and ligand binding human hemoglobin, J. Mol. Biol. 91 (1975) 301-313; T.J. McMahon, J.S. Stamler, Concerted nitric oxide/oxygen delivery by hemoglobin, in: L. Packer (Ed.), Methods In Enzymology, Academic Press, 301 (1999) Part C, 99-114]. Константа связывания Hb с NO составляет $3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, что на три порядка превышает аналогичную константу для CO, и на шесть порядков - константу связывания для O₂ [E. Antonini, M. Brunori, Hemoglobin and myoglobin in the reactions with ligands, in: A. Neuberger, E.L. Tatum (Eds.) North-Holland research monographs.

Frontiers of biology. Vol. 21, North-Holland Publishing company, Amsterdam-London, 21 (1971) 276]. Бимолекулярная константа взаимодействия Hb с NO близка к диффузионной: $1,02 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ в 0,05 М фосфатном буфере, рН7,0 при 20°C. Поэтому Hb является очень удобной ловушкой для NO и активно используется для изучения NO-донорной активности соединений, генерирующих монооксид азота. При этом спектры оптического поглощения свободного Hb и Hb-NO сильно различаются, что позволяет легко детектировать образование нитрозильного аддукта.

Результаты исследования для наглядности представлены на фиг.3 для комплекса I.

Гомогенный препарат бычьего Hb получали из бычьего гемоглобина фирмы «MP Biomedicals», представляющего собой смесь metHb и HbO₂. На всех стадиях получения Hb и во всех экспериментах с Hb использовали 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,0. Для превращения смеси metHb с HbO₂ в Hb предварительно готовили колонку 2×15 см с сефадексом G-25 и переводили ее в анаэробное состояние. На выходе из колонки собирали 5 мл Hb с концентрацией $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹. Хранили Hb замороженным в виде шариков в жидком азоте. Перед использованием Hb размораживали в сосудах объемом 5 мл в токе азота. В анаэробную опытную кювету объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см вводили 2,8 мл буфера, 0,1 мл Hb $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹ и записывали спектр поглощения. К навеске нитрозильного комплекса в сосуде, заполненном азотом, прибавляли анаэробный абсолютный ДМСО с расчетом, чтобы получить раствор комплекса с концентрацией $6 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹. Далее раствор перемешивали в течение 3-5 минут до полного растворения и вводили по 0,1 мл полученного раствора в опытную кювету с Hb и в кювету сравнения, содержащую 2,9 мл анаэробного буфера. Конечная концентрация нитрозильного комплекса была равна $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹, ДМСО - 3,3%. Далее записывали разностные спектры поглощения, первый - через 1 минуту от начала реакции (показано на фиг.3), затем через интервалы в 3 минуты в течение первых 30 минут реакции, и затем с интервалами 15, 30, 60 минут (на фиг.3 показана для наглядности только часть этих спектров). Регистрацию спектров проводили до полного превращения Hb в HbNO, когда спектр переставал изменяться. Количество образовавшегося NO оценивали спектрофотометрически по количеству образовавшегося HbNO. Для определения концентрации HbNO спектр поглощения реакционной системы, содержащей Hb и HbNO, с помощью компьютерной обработки программой MathCad разлагали на составляющие - спектр Hb и HbNO. Расчет проводили в диапазоне длин волн 450-650 нм по 200 экспериментальным точкам. Для регистрации спектров поглощения использовали спектрофотометр Specord M-40, снабженный интерфейсом для компьютерной регистрации спектров и термостатируемым кюветным отделением. Спектры регистрировали при 25°C.

В результате этих исследований впервые установлено, что комплексы генерируют NO в водных растворах диметисульфоксида самопроизвольно (т.е. в отсутствие хемо-, фото- или ферментативной активации).

Исследование цитотоксичности тетранитрозильных комплексов железа с бензазагетероциклическими тиолилами на опухолевых клетках человека *in vitro*

Методика эксперимента

Перед началом эксперимента все соединения растворяли в 200 мкл ДМСО, а затем доводили до нужной концентрации питательной средой RPMI1640. Конечная концентрация ДМСО в пробах не превышала 0,2% и не влияла на рост клеток.

Линия клеток - рак яичника человека SKOV3. Клетки выращивали в монослое в

среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, при 37°C и 5% содержании CO₂. Для экспериментов клетки высевали в 96-луночные планшеты и выращивали в тех же условиях.

Тестирование цитотоксического эффекта проводили с помощью МТТ-теста, основанного на способности дегидрогеназы живых клеток восстанавливать неокрашенную соль тетразолия в голубые кристаллы формазана, растворимые в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Все соединения вносили в лунки в объеме 20 мкл в 4-конечных концентрациях (мкМ) 100, 50, 25 и 10. Общий объем инкубации составлял 200 мкл. Клетки с препаратами инкубировали в указанных выше условиях в течение 72 часов. По окончании инкубации к клеткам добавляли МТТ-реагент и инкубировали при тех же условиях в течение 2 часов. Затем образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО при 37°C в течение 20 минут. Оптическое поглощение растворов ДМСО измеряли на оптическом счетчике для многолуночных планшет при длине волны 540 нм. Результаты выражали в виде средних значений для 4-параллельных измерений. Цитотоксический эффект оценивали по выживаемости клеток в опытных пробах по отношению к контролю в %. Соединение считали активным, если при концентрации 100 мкМ количество живых клеток составляло 50% или менее (ИК₅₀ ≤ 100 мкМ). Ошибка измерений не превышала 5%.

Результаты исследования представлены в таблице 4.

Два из изученных нитрозильных комплекса железа - I и III, содержащие тиобензимидазольный и тиобензтиазольный лиганды, проявили цитотоксическую активность на линии клеток SKOV₃. Для I и III ИК₅₀ составила 57 мкМ и 25 мкМ соответственно.

Изученные нитрозильные комплексы железа I и III продемонстрировали различный цитотоксический эффект на опухолевых клетках человека *in vitro*. Максимальную активность проявил комплекс III (ИК₅₀ = 25 мкМ).

В качестве препарата сравнения был использован цисплатин (cis-DDP), противоопухолевый препарат, применяемый в клиниках России и за рубежом (ИК₅₀ = 16 мкМ). Установлено, что при понижении концентрации в два раза комплекс III сохраняет такую же активность, как и при концентрации 100 мкМ (выживаемость опухолевых клеток 12,5% (таблица 4). Факт, что токсичность комплекса III значительно ниже (его индекс общей токсичности LD₁₀₀ составляет 50 мг/кг), чем для цисплатина (LD₁₀₀ = 16 мг/кг), может иметь значение в высокодозной химиотерапии, сопровождающейся тяжелыми побочными эффектами, как способ повышения чувствительности опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям, и позволит снизить концентрации применяемых цитостатиков.

№ п/п	Концентрация, мкМ	Соединение. Выживаемость клеток, %		
		I	II	III
1	100	12,4	100	12,5
2	50	56,32	100	12,5
3	25	87,5	100	50,1
4	10	100	100	88,5
5	ИК ₅₀ , мкМ	57	>100	25

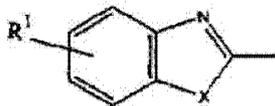
В соответствии с методическими указаниями по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ проведены исследования на перевиваемых

опухолях мышей на Ca-755, лимфолейкозе P-388 и меланоме B-16 (на мышах-гибридах первого поколения BDF₁ (C₅₇Bl/6 × DBA/2) и DBA/2 массой 18-25 г, полученных из отдела лабораторных животных ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Выявлен статистически значимый противоопухолевый эффект заявляемых препаратов.

Формула изобретения

1. Биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными общей формулы $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$,

где R



и где X представляет собой NH, S, R¹ представляет низший алкил.

2. Биядерный нитрозильный комплекс железа по п.1, где R представляет бензимидазол-2-ил, 5-метил-бензимидазол-2-ил или бензтиазол-2-ил.

3. Способ получения биядерных нитрозильных комплексов железа по п.1, заключающийся в том, что тиосульфатный нитрозильный комплекс железа обрабатывают соответствующим бензазагетероциклическим тиолом в стехиометрическом соотношении в присутствии восстановителя, а процесс ведут в щелочной среде с последующим выделением целевого продукта известными приемами.

4. Способ п.3, отличающийся тем, что процесс ведут при комнатной температуре, преимущественно при 18-25°C.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что процесс ведут в бескислородной атмосфере.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве бензазагетероциклического тиола используют бензимидазол-2-тиол, 5-метил-бензимидазол-2-тиол или бензтиазол-2-тиол.

7. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве восстановителя используют водород, тиосульфата металлов, сероводород и алифатические тиолы.

8. Донор монооксида азота, представляющий собой биядерный нитрозильный комплекс железа по п.1.

9. Применение биядерного нитрозильного комплекса железа по п.1 в качестве противоопухолевого лекарственного средства.

10. Применение биядерных нитрозильных комплексов железа по п.1 для получения противоопухолевого лекарственного средства.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество биядерного нитрозильного комплекса железа с бензазагетероциклическим производным по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель, в качестве противоопухолевого лекарственного средства.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где в качестве фармацевтически приемлемого носителя используют протонсодержащую среду.

13. Фармацевтическая композиция по п.11, где в качестве фармацевтически приемлемого носителя используют смесь протонсодержащей среды и диметилсульфоксида.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.12 или 13, где в качестве протонсодержащей среды используют воду, физиологический раствор, водорастворимые биополимеры.

15. Фармацевтическая композиция по п.11, где биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными присутствует в количестве 50-100 мкМ.

5 16. Набор, применяемый для лечения онкологических заболеваний, включающий:
(1) фармацевтическую композицию, содержащую биядерный нитрозильный комплекс железа с бензазагетероциклическими производными по п.1, в герметичной упаковке;
и (2) вспомогательные компоненты.

10

15

20

25

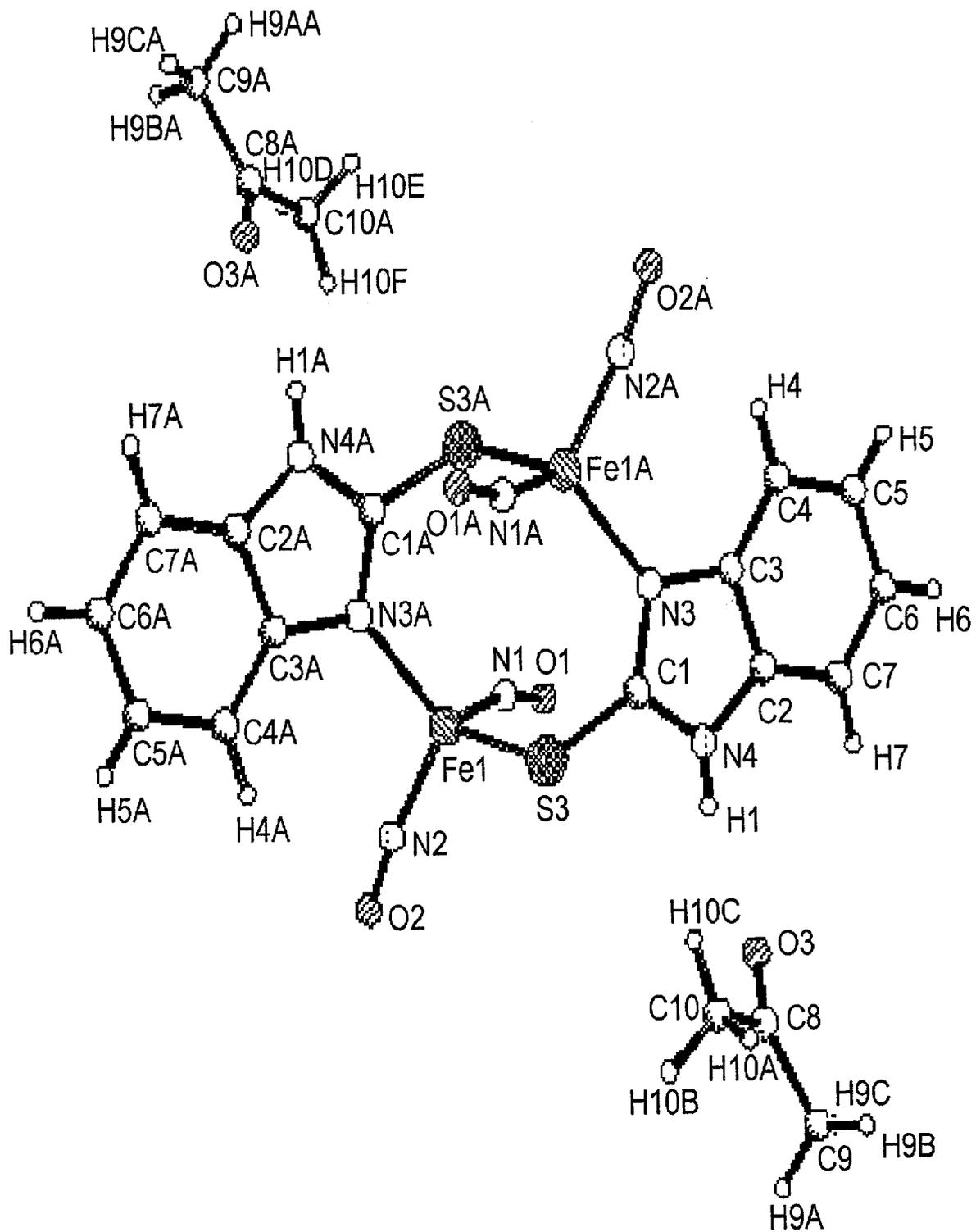
30

35

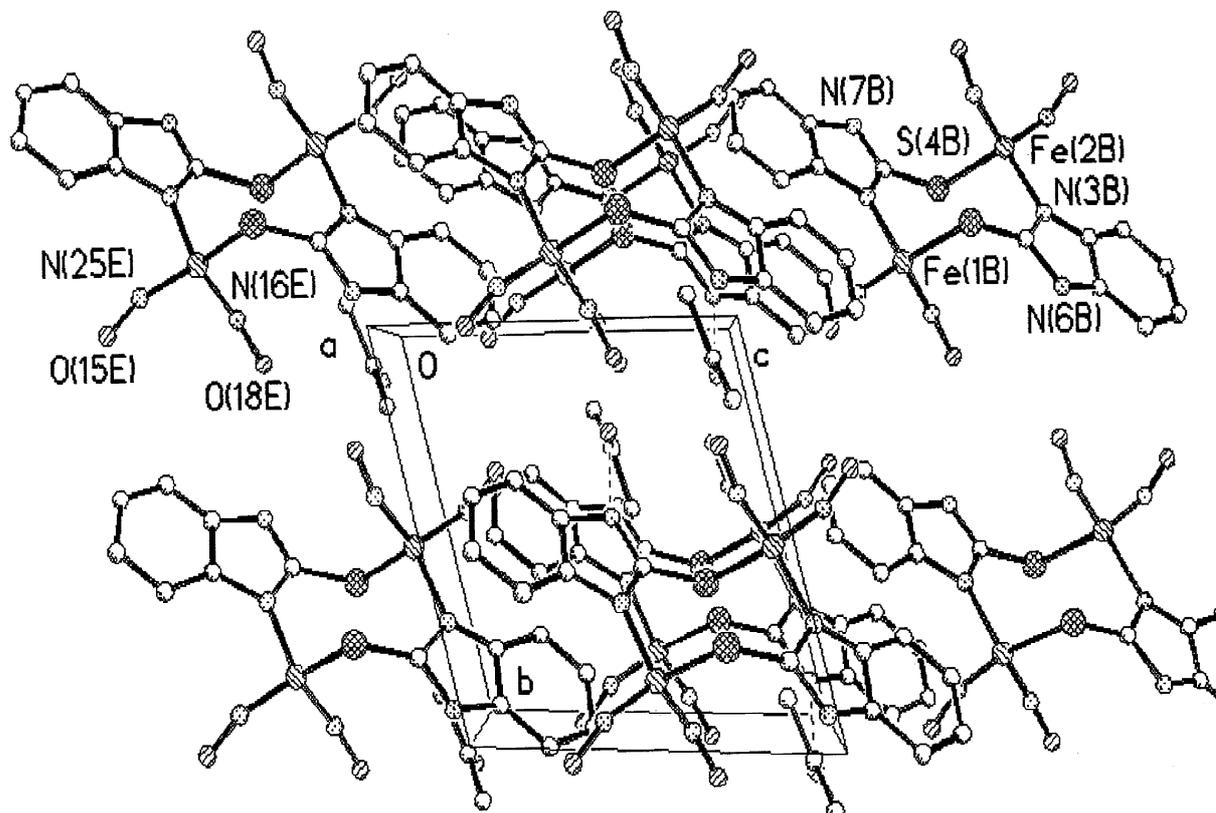
40

45

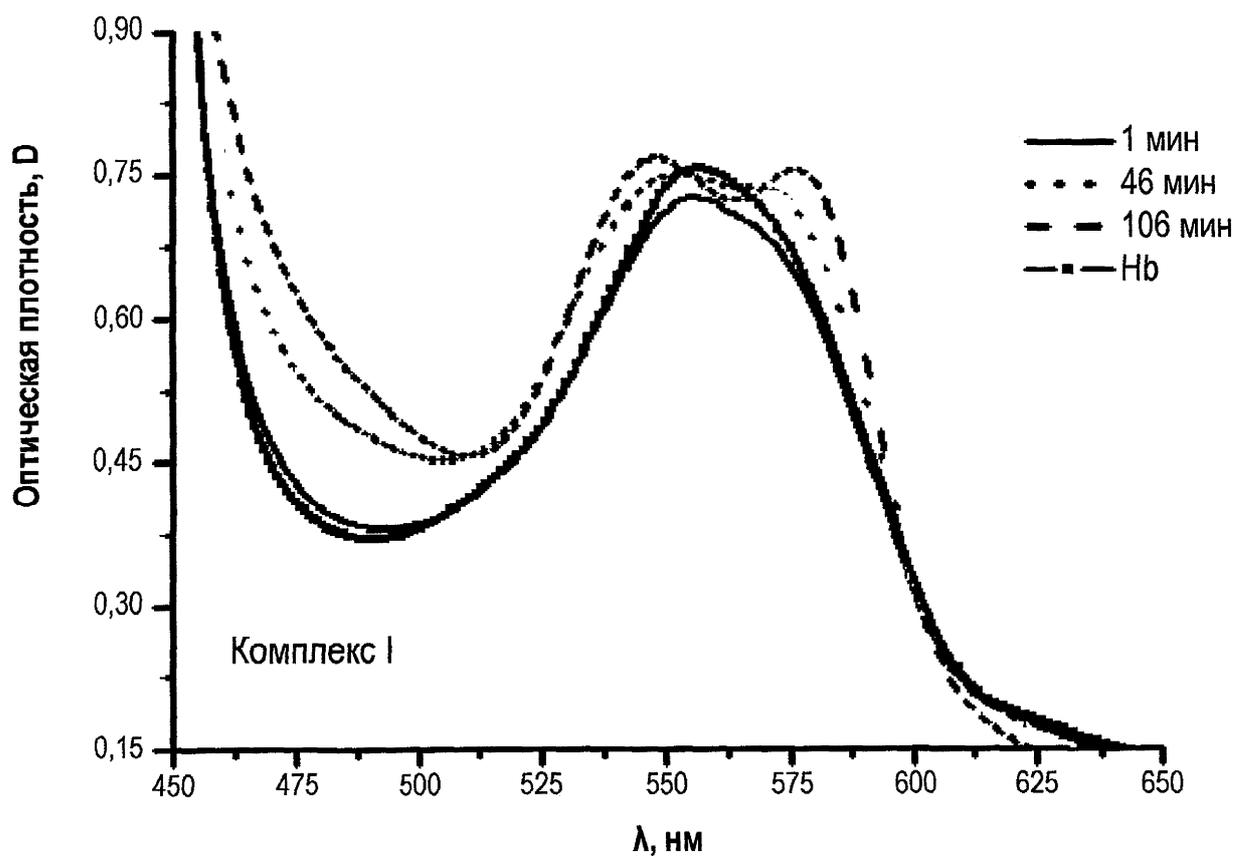
50



ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3