



(51) МПК
A61K 31/295 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/295 (2019.02); *A61P 35/00* (2019.02); *A61P 39/06* (2019.02); *A61K 9/08* (2019.02)

(21) (22) Заявка: 2016151670, 28.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 28.12.2016

Дата регистрации:
 13.05.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2016

(43) Дата публикации заявки: 02.07.2018 Бюл. №
 19

(45) Опубликовано: 13.05.2019 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-кт Академика Семенова, 1, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской Академии наук (ИПХФ РАН), Н.А. Саниной

(72) Автор(ы):

Санина Наталия Алексеевна (RU),
 Шматко Наталья Юрьевна (RU),
 Терентьев Алексей Алексеевич (RU),
 Балакина Анастасия Александровна (RU),
 Ступина Татьяна Сергеевна (RU),
 Алдошин Сергей Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 "Фарма-Нит" (ООО "Фарма-Нит") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2567245 C1, 10.11.2015. RU 2429242 C2, 20.09.2011. WO 2009/148346 A1, 10.12.2009. ТАТЬЯНЕНКО Л.В. и др. Нитрозильные комплексы железа с функциональными лигандами тиокарбамидом и его алифатическими производными как потенциальные антимиастатики. Российский биотерапевтический журнал 2016, том 15, N1, с.107. САНИНА Н.А. Противоопухолевая (см. прод.)

(54) Применение нитрозильного комплекса железа с N,N-диэтилтиомочевинной в качестве нового NO-донорного противоопухолевого средства

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Предложено применение нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной состава $[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]\text{Cl} \cdot [\text{Fe}(\text{SR})\text{Cl}(\text{NO})_2]$, где $\text{R}=\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5)$, в качестве противоопухолевого средства для NO терапии опухоли, выбранной из карциносаркомы Hs578T, инвазивной

гормонозависимой erbb2-амплифицирующей карциномы протоков молочной железы BT-474, аденокарциномы прямой кишки человека Caco2 и глиобластомы A-172. Технический результат: заявленный комплекс вызывает гибель клеток перечисленных опухолей, при этом является нетоксичным по отношению к нормальным клеткам. 9 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

активность нитрозильных комплексов железа - новых доноров монооксида азота. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хи. об-ва им.Д.И.Менделеева) 2009, т. LIII, N1. US 2012/0082673 A1, 05.04.2012. WO 2016/181110 A1, 17.11.2016.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(19) **RU** (11) **2 687 269**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 31/295 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(52) CPC

A61K 31/295 (2019.02); A61P 35/00 (2019.02); A61P 39/06 (2019.02); A61K 9/08 (2019.02)(21) (22) Application: **2016151670, 28.12.2016**(24) Effective date for property rights:
28.12.2016Registration date:
13.05.2019

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2016**(43) Application published: **02.07.2018 Bull. № 19**(45) Date of publication: **13.05.2019 Bull. № 14**

Mail address:

142432, Moskovskaya obl., g. Chernogolovka, pr-
kt Akademika Semenova, 1, Federalnoe
gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
Institut problem khimicheskoy fiziki Rossijskoj
Akademii nauk (IPKHF RAN), N.A. Saninoj

(72) Inventor(s):

**Sanina Nataliya Alekseevna (RU),
Shmatko Natalya Yurevna (RU),
Terentev Aleksej Alekseevich (RU),
Balakina Anastasiya Aleksandrovna (RU),
Stupina Tatyana Sergeevna (RU),
Aldoshin Sergej Mihajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Farma-Nit" (OOO "Farma-Nit") (RU)**

(54) **USE OF NITROSYL IRON COMPLEX WITH N,N-DIETHYLTHIOUREA AS NEW NO-DONOR ANTICANCER AGENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: application of nitrosyl iron complex with N-ethylthiourea of composition $[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]\text{Cl}$ · $[\text{Fe}(\text{SR})\text{Cl}(\text{NO})_2]$, where $\text{R} = \text{C}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5)$, as an antitumour agent for NO tumor therapy selected from carcinosarcoma Hs578T, invasive hormone-dependent

erbb2-amplifying carcinoma of ducts of mammary gland BT-474, adenocarcinoma of human rectum Caco2 and glioblastoma A-172.

EFFECT: technical result: the declared complex causes cell death of the listed tumours, wherein is nontoxic in relation to normal cells.

1 cl, 9 dwg, 3 tbl

RU 2 687 269 C 2

RU 2 687 269 C 2

Изобретение относится к применению нитрозильного комплекса железа с N,N-диэтилтиомочевинной состава $[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]\text{Cl}\cdot[\text{Fe}(\text{SR})\text{Cl}(\text{NO})_2]$, где $\text{R}=\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5)$ (ETM), в качестве нового противоопухолевого средства для NO терапии карциносаркомы Hs578T (IC50 составляет около 275.30 мкМ), инвазивной

5 гормонозависимой erbB2-амплифицирующей карциномы протоков молочной железы BT-474 (IC50 составляет 202.71 мкМ), аденокарциномы прямой кишки человека Caco2 (IC50 составляет около 240.89 нМ), а также, глиобластомы A-172 (IC50 составляет 0.41 ± 0.15 мкМ).

10 Синтез и изучение противоопухолевой активности соединений-доноров NO вызывает в последние годы огромный интерес специалистов в области химиотерапии опухолевых заболеваний. В предклинических исследованиях надежно установлено, что использование экзогенных NO доноров (Таблица 1), таких как GTN, DETA/NO и PABA/NO ведет к каспаз-зависимому апоптозу человеческих клеток карциномы кишечника *in vitro*, ингибированию канцерогенеза кожи в модели JB6 мыши, регрессии роста метастазов

15 B16F10 меланомы и человеческой карциномы яичника у SCID мышей. YC-1 - NO-миметик с мощными sGC активирующими свойствами - показывает значительные антиангиогенные и проапоптотические эффекты на опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo*. Накоплены экспериментальные доказательства по противораковым эффектам NO-донорных агентов, состоящих из традиционных NSAID, в которых NO-донирующий

20 фрагмент ковалентно связан со спейсоровой молекулой, обеспечивая ингибирование COX энзиматической функции. Celecoxib и др. селективные COX-2 ингибиторы предотвращают канцерогенез кишечника. ASA значительно уменьшает развитие кишечных полипов у пациентов с карциномой кишки [S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti, Medicinal Research Reviews 27 (2007) 317.; S. Mocellin, Curr. Cancer Drug Tar. 9 (2009) 214].

25 Известны также работы по применению соединений - доноров NO для усиления действия существующих химиотерапевтических средств или радиотерапии [D. Wink, J. Vodovoz, J. Cook, Biochemistry 63 (1998) 948, N.P. Konovalova, S.A. Goncharova, L.M. Volkova, T.A. Raevskaya, L.T. Eremenko, A.M. Korolev, Nitric Oxide: Biology and Chemistry 8 (2003) 59-64, W. Yang, P.A. Rogers, H., J. Ding, Biol. Chem. 277 (2002) 12868, O. Siri, A. Tabard, P. Pullumbi,

30 R. Guillard, Inorg. Chim. Acta 350 (2003) 633, J.L. Burgaud, E. Jngini, Del Soldato P. Ann, N.Y. Acad. Sci. 962 (2002) 360, T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, G.S. Kalendo, Toxicology Letters 121 (2001) 5].

Основные требования к соединениям - донорам NO сформировались благодаря накопившемуся опыту в их исследовании и, в определенной степени, являются

35 обоснованием целесообразности поиска новых биологически активных веществ в этом ряду соединений: 1) целевые продукты синтеза NO доноров должны быть выделены в чистом виде и твердом состоянии; 2) NO-доноры должны быстро разлагаться в водных растворах при физиологическом значении pH с высвобождением NO без дополнительной активации; 3) при разложении NO доноров должен образовываться оксид азота с

40 количественным выходом [V.G. Granik, N.A. Grigor'ev, Russ. Chem. Bull. 51 (2002) 1375, L.A. Ridnour, D.D. Tomas, C. Switzer, W. Flores-Santana, J.S. Isenberg, S. Ambs, D.D. Roberts, D.A. Wink. Nitric Oxide: Biology and Chemistry 19 (2008) 73]. Большинство соединений - доноров NO, применяемых в предклинических исследованиях как противоопухолевые агенты, являются органическими веществами. Но с тех пор, как было выявлено участие

45 нитрозильных комплексов железа в биохимии NO, появилось новое направление, основанное на применении в качестве перспективных противоопухолевых агентов нитрозильных комплексов железа. Цитотоксическое действие нитрозильного комплекса железа состава $\text{Na}[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$ было изучено впервые в работе [A. Janczyk, A. Wolnicka-

Glubisz, A. Chmura, M. Elas, Z. Matuszak, G. Stochel, K. Urbanska, Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 10 (2004) 42]. Комплекс обладает высокой токсичностью. Одним из путей уменьшения степени токсичности доноров NO этого класса и, одновременно, сохранения высокого противоопухолевого эффекта является применение нитрозильных комплексов железа меньшей ядерности. В качестве таких доноров NO весьма перспективны миметики моноядерных динитрозильных комплексов железа (DNICs) - природных доноров NO. Эти синтетические аналоги DNICs содержат в своем составе одновременно два лекарственных фармакофора: функциональные серосодержащие тиолилы - антиметаболиты пуриновых оснований ДНК, ингибиторы роста злокачественных опухолей различного генеза и NO группы, ключевые молекулы, регулирующие процесс опухолевых новообразований. Ранее авторами заявки были синтезированы комплексы - структурные аналоги активных центров нитрозильных [2Fe-2S] протеинов и продемонстрирован их противоопухолевый эффект [Санина Н.А., Жукова О.С., Алдошин С.М., Емельянова Н.С., Герасимова Г.К., Патент РФ №2429242, Применение тетранитрозильного комплекса железа с тиофенолом в качестве противоопухолевого лекарственного средства, 2011; N.A. Sanina, K A. Lysenko, O.S. Zhukova, T.N. Roudneva, N.S. Emel'yanova, S.M. Aldoshin, Water-soluble binuclear nitrosyl iron complexes with natural aliphatic thiolyls possessing cytotoxic, apoptotic and NO donor activity, Patent US 8,067,628 B2, 2011; T.S. Stupina, I.I. Parkhomenko, I.V. Balalaeva, G.V. Kostyuk, N.A. Sanina, A.A. Terent'ev, Russ. Chem. Bull. 60 (2011) 1488; Санина Н.А., Жукова О.С., Смирнова З.С., Руднева Т.Н., Шилов Г.В., Алдошин С.М., Давыдов М.И., Биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными, способ их получения, Патент РФ №2441872, 2012; Санина Н.А., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А., Алдошин С.М., Моноядерные динитрозильные комплексы железа, способ их получения моноядерных динитрозильных комплексов железа, донор монооксида азота, применение моноядерного динитрозильного комплекса железа в качестве противоопухолевого лекарственного средства, Патент РФ №2494104, 2013; N.A. Sanina, G.I. Kozub, O.S. Zhukova, N.S. Emel'yanova, T.A. Kondrat'eva, D.V. Korchagin, G.V. Shilov, N.S. Ovanesyan, S.M. Aldoshin, J. Coord. Chem. 60 (2013) 3602; N.A. Sanina, O.S. Zhukova, Z.S. Smirnova, T.N. Roudneva, G.V. Shilov, S.M. Aldoshin, Binuclear nitrosyl-iron complexes with benzo-trans-heterocyclic derivatives and a method for the production thereof, Patent of India №268939, 2015].

Особый интерес для медицинской практики представляют солевые формы моноядерных DNICs, из-за их более высокой растворимости и биодоступности. Недавно были впервые синтезированы и исследованы моноядерные DNICs катионного типа [Моноядерные динитрозильные комплексы железа, способ их получения и доноры монооксида азота, Н.А. Санина, Н.Ю. Шматко, С.М. Алдошин, Патент РФ №2014115252, 2015] и выявлен их высокий противоопухолевый эффект в сравнении с клиническими агентами - цисплатином и сатраплатином [Nataliya A. Sanina, Natal'ya Yu. Shmatko, Denis V. Korchagin, Gennadii V. Shilov, Alexey A. Terent'ev, Tatyana S. Stupina, Anastasiya. A. Balakina, Natal'ya.V. Komleva, Nikolay S. Ovanesyan, Alexander V. Kulikov and Sergey M. Aldoshin, A new member of cationic dinitrosyl iron complexes family with N-ethylthiourea as an effective NO donor agent against human HeLa and MCF-7 tumor cell lines, Journal of Coordination Chemistry, 69 (2016) 5, 812-825].

Задачей настоящего изобретения является исследование противоопухолевой активности моноядерного катионного динитрозильного комплекса железа с N,N-диэтилтиомочевинной на опухолевых клетках человека различного гистогенеза и линии нормальных клеток в качестве стандарта для изучения цитотоксичности [ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5.

Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*»].

В одном аспекте изобретение относится к применению катионного динитрозильного комплекса железа в качестве противоопухолевого средства против карциносаркомы Hs578T (IC50 составляет около 275.30 мкМ), инвазивной гормонозависимой erbB2-амплифицирующей карциномы протоков молочной железы BT-474 (IC50 составляет 202.71 мкМ), аденокарциномы прямой кишки человека Caco2 (IC50 составляет около 240.89 нМ), а также, глиобластомы A-172 (IC50 составляет около 0.41±0.15 нМ).

Кроме того настоящее изобретение относится к донору монооксида азота, представляющему собой моноядерный динитрозильный комплекс железа с лигандами - NO и N,N-диэтилтиомочевинной, охарактеризованными выше.

Описание фигур:

На фиг. 1 показана зависимость концентрации NO, генерируемого комплексом ЕТМ в воде (рН 6.5) и DMSO в анаэробных условиях при T=25°C (концентрация комплекса 0.4·10⁻⁵ М) от времени. [NO]_{max}=29.2 нМ в воде; [NO]_{max}=7.3 нМ в DMSO.

На фиг. 2. показана зависимость концентрации NO, генерируемого комплексом ЕТМ в воде в анаэробных условиях при рН 7.0, T=25°C (концентрация комплекса 0.4·10⁻⁵ М) от времени. [NO]_{max}=33.0 нМ.

На фиг. 3. показана зависимость концентрации NO, генерируемого комплексом ЕТМ в воде в анаэробных условиях при рН 7.4, T=25°C (концентрация комплекса 0.4·10⁻⁵ М) от времени. [NO]_{max}=19.1 нМ.

На фиг. 4. показана зависимость концентрации NO, генерируемого комплексом ЕТМ в биологическом буферном растворе Tris-HCl в анаэробных условиях при рН 7.4, T=25°C (концентрация комплекса 0.4·10⁻⁵ М) от времени. [NO]_{max}=21.1 нМ.

На фиг. 5 показаны кривые «доза-эффект» при действии комплекса ЕТМ на клетки разных линий.

На фиг. 6 показана кривая «доза-эффект» при действии комплекса ЕТМ на клетки линии PANC-1.

На фиг. 7 показана кривая «доза-эффект» при действии комплекса ЕТМ на клетки A-172.

На фиг. 8 показано влияние комплекса ЕТМ на морфологию клеток линий PANC-1, A431, HepG2 и BT-20.

На фиг. 9 показано влияние комплекса ЕТМ на морфологию клеток линий Vero, BT-474, Caco-2, A-172.

Сущность изобретения заключается в следующем. Цитотоксичность комплекса изучали на культуре клеток млекопитающих. В качестве модели нормальных клеток использовали клеточную линию Vero - клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки. В качестве модели опухолевых клеток человека использовали линейку культур рака груди (линии BT-20, BT-474, Hs578T), а также культуры A431, HepG2, Caco2 и PANC-1 различного происхождения. Все культуры клеток получены из коллекции ИНЦ РАН (Институт цитологии Российской Академии наук), и рекомендованы ATCC (American Type Culture Collection) в качестве моделей для изучения противоопухолевой активности соединений. Линия клеток Vero рекомендована для изучения цитотоксичности [ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*»] и использовалась в работе в качестве стандарта.

Методики экспериментов.

Культивирование клеток проводили по общепринятой методике в атмосфере 5%

CO₂ и температуре 37°C. Клетки линий Vero, A431, PANC-1 культивировали в среде DMEM (культуральная среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки линий BT-20 и HepG2 культивировали в среде EMEM (культуральная среда Игла (Eagle's Minimum Essential Medium) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки линии Caso-2 культивировали в среде DMEM с добавлением 15% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки линий BT-474 и Hs578T культивировали в средах RPMI и EMEM соответственно с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и человеческого рекомбинантного инсулина в концентрации 1 мкг/мл.

Изучение цитотоксических свойств комплекса ЕТМ проводили с использованием МТТ-теста. Все исследуемые линии клеток рассеивали в культуральные 96-луночные планшеты в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток/мл. Изучаемое соединение вносили в культуральную среду через 24 ч после посева. Краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) добавляли в инкубационную среду через 72 ч после введения исследуемого комплекса. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО). Измерение оптической плотности проводили при основной длине волны 570 нм и фоновой длине волны 620 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Spark 10M. Индекс цитотоксичности (IC50) определялся на основе дозозависимых кривых. Опыты проводили в 3-кратной повторности. Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Оценку морфологических изменений клеток при действии комплекса проводили с помощью микроскопии. Клетки рассеивали на покровные стекла с плотностью культуры $2 \cdot 10^5$ клеток/мл. Изучаемое соединение вносили в культуральную среду через 24 ч после посева. Через сутки после нанесения комплекса клетки фиксировали 4% формальдегидом. Затем проводили пермеабиллизацию в 0.2% растворе Тритон X-100 и окрашивали ядра 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI). Микроскопию проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Scope. A1 в проходящем свете (объектив Zeiss A-Plan, 40x/0.65 Ph2) и с использованием фильтра Fs38 (возбуждение BP470/40, испускание BP525/50, объектив Zeiss A-Plan, 40x/0.65).

В предлагаемом изобретении исследована NO - донорная активность комплекса ЕТМ. Для определения количества NO, генерируемого комплексом в растворе, использовали сенсорный электрод "amiNO-700" системы "inNO Nitric Oxide Measuring System" (Innovative Instruments, Inc., Tampa, FL, USA). Концентрацию NO для исследуемого комплекса фиксировали в течение ~500 секунд (с шагом 0.2 сек.) в водном растворе с концентрацией донора NO (0.1 мкмоль). Кинетические измерения зависимости количества NO, выделившегося в раствор при разложении комплекса в водных растворах от времени проводились в течение ~2,5 часов. При этом, каждая последующая проба отбиралась из основного раствора комплекса с интервалом в 30 минут. Для калибровки электрохимического сенсора использовали стандартный водный раствор NaNO₂ (100 мкмоль), который добавляли в смесь 0.12M KI и 2 мл 1M H₂SO₄ в 18 мл воды. Все эксперименты проводились в при 25°C. Использовался коммерческий буфер Hydriion (from Sigma-Aldrich, No.239089). pH растворов были измерены мембранным pH-метром "HI 8314" (HANNA instruments, Germany).

Комплекс имеет 100% растворимость в воде и полярных растворителях. По данным электрохимического анализа (см. Фиг. 1), комплекс при разложении в водных растворах выделяет NO в первые секунды.

Кривая имеет "колокол" - образную зависимость. Спустя ~100 секунд после растворения в воде комплекс генерирует максимальное количество NO (29,4 нМ/моль комплекса) и к 500 сек эксперимента все еще наблюдается эффективная генерация NO. Присутствие координирующего растворителя (1% DMSO) в воде отражается на NO - генерирующей способности комплекса. Изменяется ход кинетической кривой и максимальное количество выделившегося NO для комплекса значительно меньше: 7,5 нМ на моль комплекса, чем таковое для воды. Кривая проходит через максимум (через ~50 секунд после растворения комплекса) и к 500 секундам количество генерированного NO падает до нуля. Для сравнения, анионные комплексы [Т.-N. Chen, F.-C. Lo, M.-L. Tsai, K.-N. Shih, M.-H. Chiang, G.-H. Lee, W.-F. Liaw, *Inorg. Chim. Acta.* (2006) 359, 2525] в водных растворах имеют существенно меньшую NO донорную активность в аналогичных условиях. Более того, в этих системах NO генерируется в условиях термо- или фотоактивации. В таблице 2 представлены экспериментальные данные по количеству NO, выделившегося в раствор при разложении комплекса в воде от времени. Измерения проводились в течение 3 часов, при этом, каждая последующая проба отбиралась из основного раствора соответствующего комплекса в воде с интервалом в 20 минут. Максимальное выделение NO для комплекса наблюдалось в начальный момент времени и не оставалось постоянным: далее количество NO медленно уменьшалось до значения 3,3 нМ спустя 140 минут после первоначального растворения комплекса в воде, по- видимому образуя, устойчивые нитрозильные интермедиаты, обуславливающие пролонгированное выделение NO.

При увеличении pH до 7.0 изменяется вид кинетической кривой: она выходит на «плато», при этом количество генерированного NO остается практически таким же, что при pH 6.5 (Фиг. 2). Интересно, что дальнейшее увеличение pH до 7.4 снова изменяет кинетическую зависимость: в первые 50 секунд выделяется вдвое меньшее количество NO, но выделение NO комплексом становится пролонгированным (Фиг. 3). Следует отметить, что аналогичная картина наблюдается и при дальнейшем увеличении pH до значения 9.0, и, что, наиболее существенно, для экспериментов в биологической среде (Фиг. 4), т.е. среде, в которой проводились эксперименты на опухолевых клетках человека различного гистогенеза.

Т.о., установлено, что водорастворимый нитрозильный комплекс железа с N'этилтиомочевинной является более эффективным донором NO для медицинского применения по сравнению с анионными ДНИК. При этом, комплекс пролонгировано выделяет NO в необходимом диапазоне концентраций [L.A. Ridnour, D.D. Thomas, Ch. Switzer, W. Flores-Santana, J.S. Isenberg, S. Ambs, D.D. Roberts, D.A. Wink, *Molecular Mechanisms for Discrete Nitric Oxide Levels in Cancer, Nitric Oxide.* 2008 Sep; 19(2) : 73-76].

Изобретение в части заявляемого применения характеризуется следующими примерами. Сравнительный анализ цитотоксичности комплекса для клеточных линий различного происхождения проводился на основании кривых «доза-эффект», значений концентраций IC50, а также морфологических изменений клеток при действии исследуемого соединения. Полученные значения концентраций IC50 показывают, что исследованные клеточные линии сильно различаются по чувствительности к комплексу ЕТМ (таблица 3). В качестве контроля (нормальные клетки) была использована линия Vero. Для клеток Vero вычисленная доза IC50 составляет около 360 мкМ, что позволяет отнести комплекс к низкотоксичным для клеток веществам по классификации [Halle & Göres 1987, Halle W, Göres E: Prediction of LD50 values by cell culture. *Pharmazie* 1987; 42 : 245-248]. Таким образом, данное соединение может быть использовано в качестве

потенциального лекарственного препарата. С точки зрения противоопухолевой активности, важно, чтобы комплекс проявлял большую активность по отношению к опухолевым клеткам, чем к нормальным.

Расчет статистической достоверности различий в действии комплекса позволил разделить исследуемые соединения на несколько групп по чувствительности к ЕТМ (Фиг. 5). Наибольшую устойчивость к исследуемому соединению проявили клетки линии PANC-1. Известно, что раковые клетки поджелудочной железы отличаются низкой восприимчивостью к классическим противоопухолевым соединениям, и механизмы их устойчивости до сих пор не выявлены [Wang OH, Azizian N, Guo M, Capello M, Deng D, Zang F, et al. (2016) Prognostic and Functional Significance of MAP4K5 in Pancreatic Cancer. PLoS ONE 11(3) : e0152300. doi : 10.1371 / journal. pone. 0152300]. Кривая «доза-эффект» для этих клеток, а представлены на Фиг. 6.

Линии клеток близкие по восприимчивости к комплексу ЕТМ : А431, HepG2 и ВТ-20. Клетки Hs578T, ВТ-474 и Caco2 более чувствительны к ЕТМ по сравнению с клетками Vero. Наибольший эффект комплекс ЕТМ оказывает на клетки глиобластомы А-172, IC50 для этих клеток почти на три порядка ниже, чем для клеток Vero (Фиг. 7).

Изучение данных микроскопии показало, что при действии комплекса ЕТМ наблюдаются изменения в морфологии, характерные для гибнущих клеток (Фиг. 8, 9).

Такие значительные различия в действии комплекса на исследуемые опухолевые клетки человека, могут объясняться их различной восприимчивостью к оксиду азота. Как известно, оксид азота (NO) является сигнальной молекулой, вовлеченной во множество физиологических процессов, включая вазодилатацию, передачу нервного сигнала и иммунный ответ. Роль NO в биологии опухолеобразования является предметом споров, поскольку он обладает как про-, так и антитуморогенной активностью. Физиологические концентрации NO способствуют росту опухолей и ангиогенезу, в то время как повышенные концентрации, наоборот, ингибируют рост раковых клеток [A. Jahani-Asl and A. Bonni iNOS : A Potential Therapeutic Target for Malignant Glioma Curr Mol Med. 2013 September; 13(8) : 1241-1249].

30

35

40

45

Таблица 1. Доноры NO, применяемые в предклинических исследованиях в качестве противоопухолевых агентов (по данным [2]).

NO донирующие лекарства/ Химическое наименование	Примечания
<p>DETA/NO (DETA NONOate) (Z)-1-[N-(2-аминоэтил)-N-(2-аммонийэтил)амин]-диазен-1-иум-1,2-диолат</p> <p>Spermine-NONOate N-(2-аминоэтил)-N-(2-гидрокси-нитрозогидразино)-1,2-этилендиамин</p>	<p>Долго действующее лекарство (время жизни: 20 часов), реализует NO в объеме, продуцируемом активированными макрофагами; не требует биотрансформации</p>
<p>PABA/NO O(2)-[2,4-динитро-5-(N-метил-N-4-карбоксихениламино)фенил] 1-N,N-диметиламино) диазен-1-иум-1,2-диолат</p>	<p>Метаболизируется до NO под действием изоформы глутатион-S-трансферазы - энзима, который экспрессируется с высокими уровнями во многих опухолях</p>
<p>SNP Натрия нитропруссид</p>	<p>Антигипертензивное лекарство; является комплексом железа с пятьюцианидными анионами (CN⁻) и одной NO⁺; взаимодействие SNP с восстанавливающими агентами (например, тиолами) ведет к выделению NO и CN.</p>
<p>GTN Нитроглицерин</p>	<p>Антиангиональный препарат; для фармакологической активности требует энзиматически глутатион-зависимой биотрансформации нитрогрупп в NO</p>
<p>SNAP S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин</p>	<p>S-нитрозотиолы, донирующие нитроксил (NO[•]) и нитрозоний (NO⁺)</p>
<p>GSNO S-нитрозо-глутатион</p>	
<p>NO-B12 Нитрозилсобальтамин</p>	<p>Как B12 рецепторы сверхэкспрессируются некоторыми опухолями, NO выделение является опухоль-специфичным</p>
<p>NO-ASA NCX-4016: 2-ацетоксибензоат 2-(1-нитрокси-метил)-фенил эфир</p>	<p>В клинических исследованиях называется NSAID обладает меньшей желудочной токсичностью (подобно простагландинам, продуцируемым COX-1, NO показывает свойства способствующие восстановлению слизистой оболочки); NO-ASA химически исследуется также как агент, хемио-предотвращающий рак.</p>
<p>NO-naproxen HCT-3012: (S)-6-метокси-α-метил-2-нафтален уксусной кислоты 4-(нитрокси)бутил эфир</p>	

<p>NO-ibuprofen NCX-2210: α-метил-4-(2-метилпропил)-2-метокси-4-[(1E)-3-[4-нитроксипропил]фенил эфир]бензоуксусной кислоты</p>	
<p>YC-1 3-5'-гидроксиметил-2'-фурил-1-бензил индазол</p>	<p>NO миметик, активирует гуанилатциклазный (sGC)/протеин киназный-G (PKG) путь; орального применения; индуцирует апоптоз и ингибирует гипоксии-индуцибельный-1 (HIF-1) путь.</p>
<p>SIN-1 3-морфолиносиднонимин</p>	<p>Активный метаболит лекарства молсидомина (долгодействующего энзиматически антиангинального препарата, который превращается в SIN-1 в печени); SIN-1 разлагается (энзим-независимо) в двухстадийной реакции до SIN-1C (стабильный метаболит) и NO; SIN-1 также реализует супероксид, но в избытке супероксиддисмутазы превращается в чистый NODD.</p>

Таблица 2. Кинетика выделения NO комплексом ЕТМ в воде и ДМСО в анаэробных условиях при pH 7, T=25°C (концентрация комплексов $0.4 \cdot 10^{-5}$ М) через каждые 30 минут.

Время, мин	[NO], нМ	
	H ₂ O	DMSO
0	29.4	7.3
20	26.5	23.8
40	23.2	21.2
60	17.2	19.8
80	13.0	13.7
100	10.5	7.8
120	8.0	-
140	3.3	-

Таблица 3. Цитотоксичность комплекса ЕТМ для клеток различных линий.

Культура	IC ₅₀ , мкМ
Vero	359.80±14.94

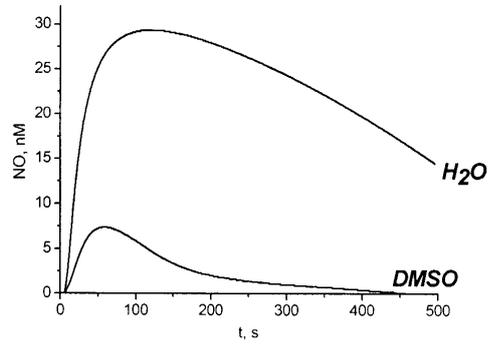
A431	412.84±35.76
BT-20	393.62±10.56
BT-474	202.71±9.25
Hs578T	275.30±22.88
HepG2	356.07±8.30
Caco2	240.89±5.43
A-172	0.41±0.15
PANC-1	638.95±17.62

* - различия статистически значимы при уровне значимости $\alpha = 0,05$

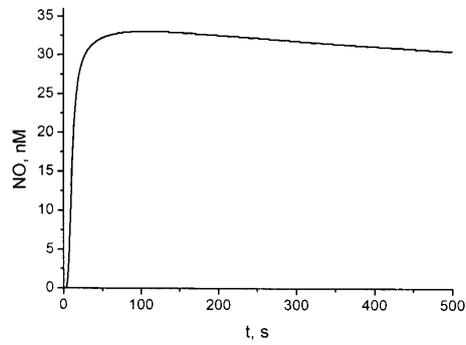
(57) Формула изобретения

Применение нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной состава $[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]\text{Cl} \cdot [\text{Fe}(\text{SR})\text{Cl}(\text{NO})_2]$, где $\text{R}=\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5)$, в качестве противоопухолевого средства для NO терапии опухоли, где опухоль выбрана из карциносаркомы Hs578T, инвазивной гормонозависимой erb2-амплифицирующей карциномы протоков молочной железы BT-474, аденокарциномы прямой кишки человека Caco2, глиобластомы A-172.

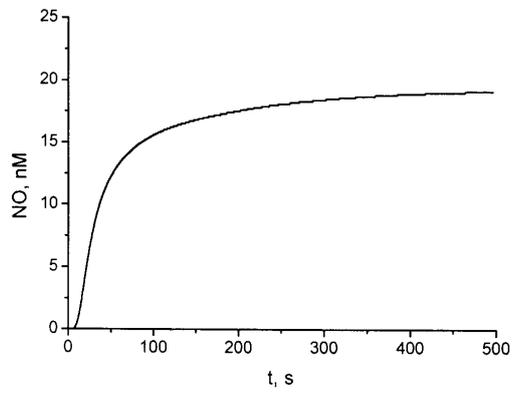
1



Фиг. 1

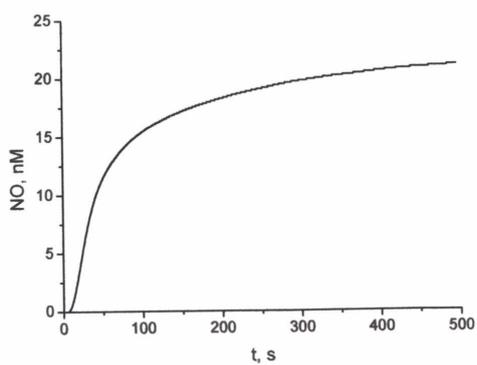


Фиг.2

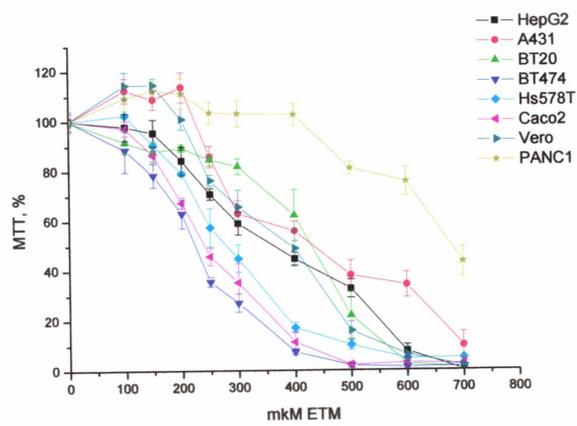


Фиг.3

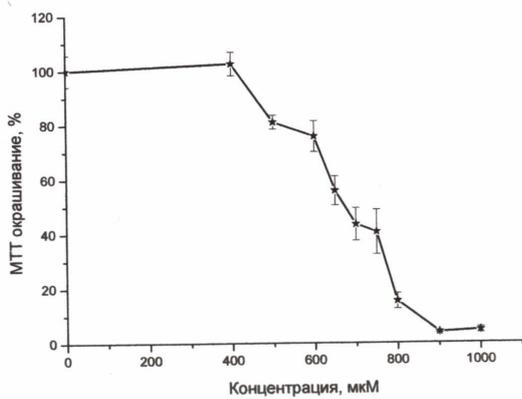
2



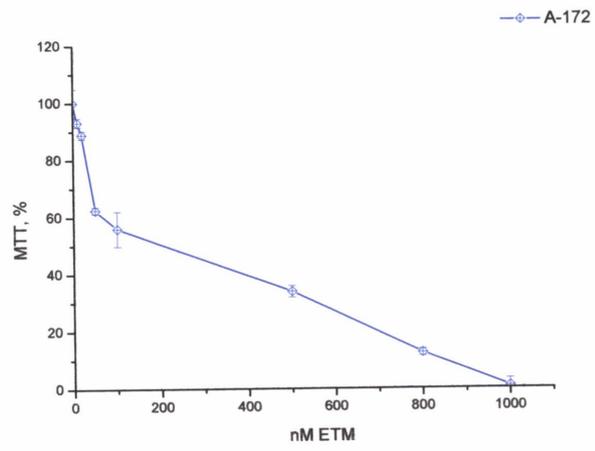
Фиг.4



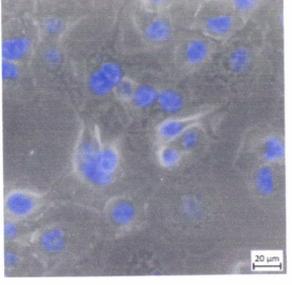
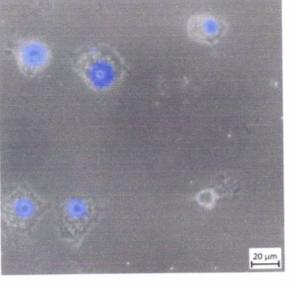
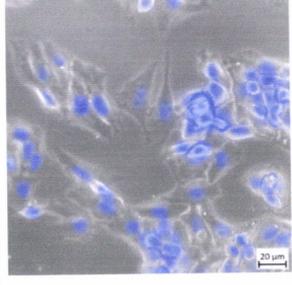
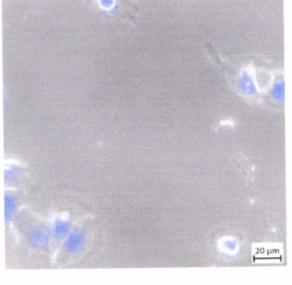
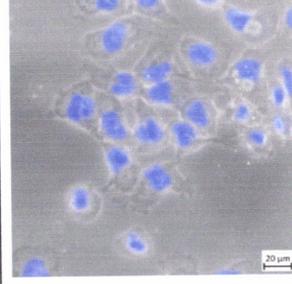
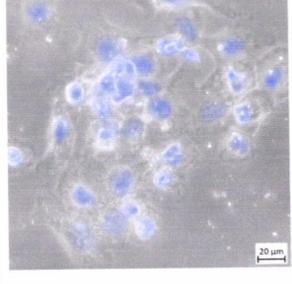
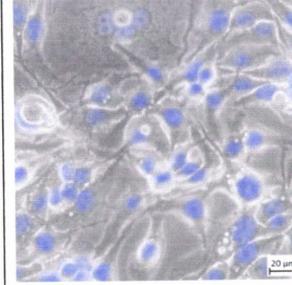
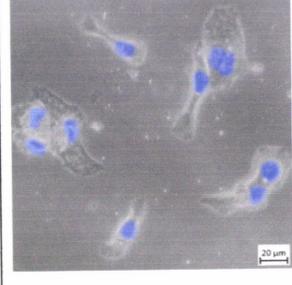
Фиг.5



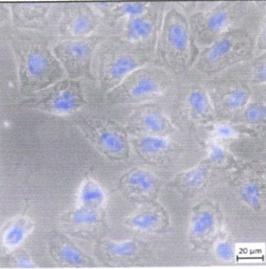
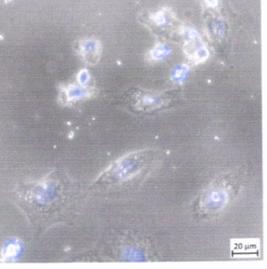
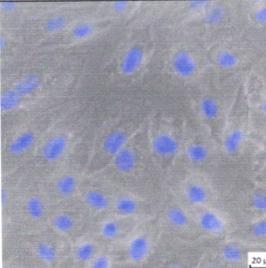
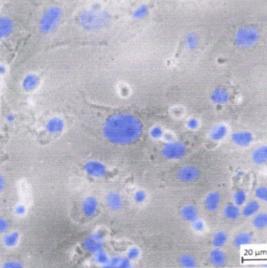
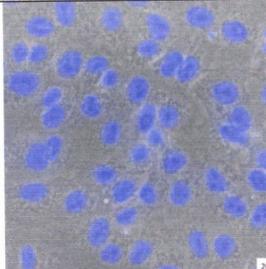
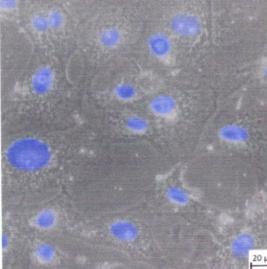
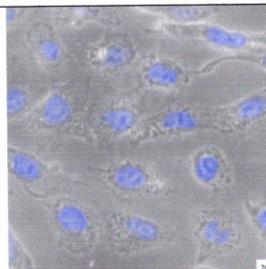
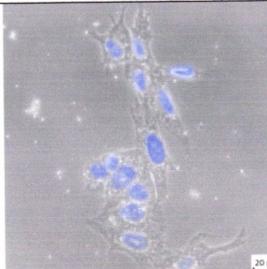
Фиг.6



Фиг.7

Культура	Контроль	Комплекс
PANC-1		
HerG2		
A431		
BT-20		

Фиг.8

Культура	Контроль	Комплекс
BT-474		
Caco-2		
Vero		
A-172		

Фиг.9