



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26953 (13) C1  
(51) A 61 K 31/35ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІД

(54) РЕЧОВИНА ДЛЯ ПОДОЛАННЯ МУЛЬТИЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ

1

2

(21) 93002239

(22) 30.09.93

(24) 29.12.99

(31) P 4233113.7

(32) 02.10.92

(33) DE

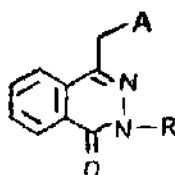
(46) 29.12.99. Бюл. № 8

(56) Cancer Chemother. Pharmacol, 1992, 29, 413-429.

(72) Енгель Юрген (DE), Кутшер Бернхард (DE), Флейшхауер Ілона (DE), Сзелен'ї Стефан (DE), Метзенауер Петер (DE), Вернер Ульріх (DE)

(73) АСТА МЕДІКА АКЦІЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(57) 1. Вещество для преодоления мультилекарственной устойчивости, отличающееся тем, что в качестве активного вещества оно содержит, по меньшей мере, одно производное фталазинона формулы I

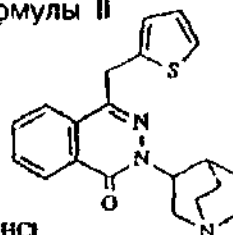
где А - незамещенный или одно- или многократно галоидозамещенный фенил, водород, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил, 2-фурил или 2-тионил,

R означает остаток формул

где Y означает водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, причем алкильный остаток может быть замещен гидроксигруппой или алкоксикарбонильной группой, или его оптический изомер или физиологически переносимую кислотно-аддитивную соль этого фтала-

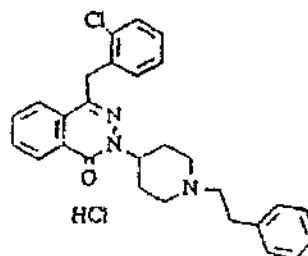
зинонового производного или ее оптические изомеры в эффективном количестве.

2. Вещество по п. 1, отличающееся тем, что в качестве производного фталазинона оно содержит соединенные формулы II



HCl

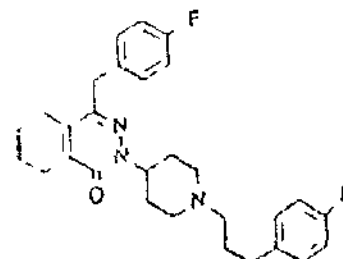
3. Вещество по п. 1, отличающееся тем, что в качестве производного фталазинона оно содержит соединенные формулы III



HCl

4. Вещество по п. 1, отличающееся тем, что производным фталазинона является флезеластин или его оптический изомер.

5. Вещество по п. 1, отличающееся тем, что производным фталазинона является соединение формулы IV

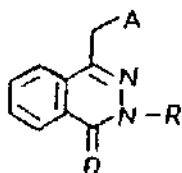
(19) UA (11) 26953 (13) C1

Изобретение относится к производным фталазинона, обладающим противоаритмическими и анальгетическим действием.

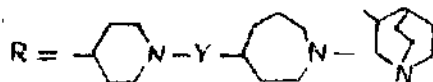
Известно производное фталазинона-азеластин, успешно применяемое для лечения и профилактики бронхиальной астмы и аллергических и сезонных ринитов, синтез которого описан в патенте ФРГ ДЕ 2164058.

В европейском патенте EP 222191 описано получение производного азеластина-флезеластина (Д-18024-гидрохлорид) в виде рацемической смеси.

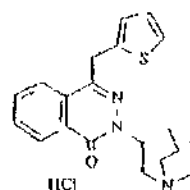
Неожиданно было найдено, что производные фталазинона общей формулы I



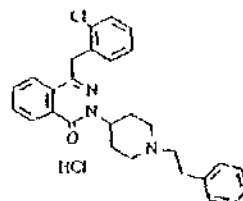
где А - фенил (незамещенный, одно- или многократно замещенный галоидом), Н или  $C_{1-3}$ -алкил, 2-фурил или 2-тиенил и R представляет собой



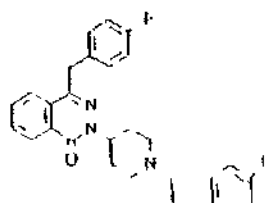
при Y - Н или  $C_{1-6}$ -алкил, причем алкильный радикал может быть замещен возможно замещенные фенильным кольцом, гидроксильной или алкоксикарбонильной группой, их физиологические приемлемые соли - продукты кислотного присоединения, так же как оптические изомеры азеластина и оптические изомеры флезеластина обладают антиаритмической активностью.



(III)



(III)



(IV)

20

25

30

35

40

Предположительно их можно объединить в класс III-соединения, обладающие антиаритмической активностью. Кроме того, соединения обладают анальгетическим действием.

Представляемые изобретением соединения обладают также противорвотным действием. Противорвотное действие установлено в результате торможения рвоты, вызванной цисплатином, у бодрствующих домашних свиней после орального или внутреннего применения последнего.

Торможение рвоты у бодрствующих свиней, вызванной цисплатином. Результаты представляют собой количество случаев (приступов) рвоты за период наблюдения. Данные следует рассматривать как средние значения 5 различных экспериментов.

Соединение	Доза, шт. на свинью	Время, ч		
		0-4	0-8	0-24
Контроль D 20602 I-V		10	10	12
	5	8	9	18
	15	0	3	11
D 20602 p.c.	50	0	0	2
	10	3	3	3
	25	0	0	3
	50	0	1	2
	100	0	0	1
	200	0	0	0

Получение соединений формулы I происходит в соответствии с пат. ФРГ DE 2164058, соединения формулы II получают по аналогии с методикой, изложенной в DE 2164058 (пример 10).

Соединение формулы III получают аналогично данным примера 2 в EP 174464. Соединение формулы IV синтезируют в соответствии с методикой, представленной в EP 0222191 (пример 36).

Оптические изомеры азеластина и флезеластина получают с применением метода фракционной кристаллизации. Абсолютную структуру азеластина определяют с помощью рентгеноструктурного анализа.

Испытание противоаритмической активности проводят в соответствии со следующими рекомендациями:

Отбирают двадцать молодых кроликов смешанной породы обоего пола весом  $1475 \pm 75$  г (среднее значение  $\pm S.E.$ ). Животных забивают ударом по голове, извлекают сердце и полосы передней свободной стенки правого желудочка, а также вскрывают одну из сосочковых (папиллярных) мышц правого желудочка и закрепляют ее на дне термической ванны для органов ("нетоксичная резина"), заполненной раствором Лока. Раствор имеет следующий состав:  $Na^+$  140;  $K^+$  5,63;  $Ca^{2+}$  2,17; глюкоза 11;  $HCO_3^-$  25; Cl 125, всего 309 молей/л, pH 7,4. Путем пропускания смеси 95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$  раствор постоянно перемешивают и заряжают кислородом. Температуру в ванне поддерживают на уровне  $32^\circ C$ . Выделенное левое предсердие, папиллярную мышцу и полосы передней свободной стенки правого желудочка раздражают электрическим путем с помощью прямоугольных импульсов 1 мсек (продолжительность), двояной пороговой интенсивности и частотой 100/мин. В ходе эксперимента определяют следующие электрофизиологические параметры: электрическое пороговое значение, эффективный рефракторный период и электропроводность. Эффективный рефракторный период, т.е. минимальный интервал между двумя следующими одна за одной электромеханическими реакциями измеряют с помощью трехкратного порогового раздражения (1 мсек, прямоугольные волны) с применением DISA Multisim на различных временных отрезках по стимулу поступательного раздражения. Проводимость измеряют с применением осциллографа (Тектроник 2230) как разницу во времени между подачей поступательного стимула и появлением поверхностного потенциала, регистрируемого с помощью биполярного платинового электрода. Измеряется также возрастающая по силе способность к сокращению (максимальная сократительная способность (сосочковая мышца, левое предсердие)).

После 60-минутного выдерживания в контрольном растворе для уравнивания препараты извлекают и 60 мин подвергают действию 10 мкМ опытного раство-

ра. За исключением воздействия на эффективные рефракторные периоды, измеряемого только на 30 и 60-ой минуте, анализируют все параметры через 15 мин, т.е. четыре раза, при наличии указанной выше концентрации состава.

Данные, приведенные в таблице и на рисунках, представляют собой средние значения  $\pm S.E.$  Влияние составов на различные параметры оценивают статистически с помощью Т-теста. Р-значения более 0,05 считают показателями.

Результаты представлены в табл. 1.

Периферическое анальгетическое действие определяют по модели Writhing-теста, а также по модели Randall-Selitto-теста на боль при воспалительном процессе.

Результаты изложены в табл. 2.

INPAC-тест Writhing'a с использованием уксуснокислотного индуцирования. Данные в % относятся к дозе 6 мг/кг перорально (для мыши).  $ED_{50}$ -значения даются в мг/кг. IRS-тест на боль при воспалении по Randall-Selitto. Данные в % относятся к дозе 10 мг/кг перорально (для крысы).  $ED_{50}$  - значения даются в мг/кг.

При лечении цитостатическими средствами установлено, что после первых успехов в лечении новообразований происходит явление сопротивления лечению. Не приносит успехов и лечение другим цитостатическим средством.

Это явление называют мультиустойчивостью к лекарствам (МУЛ), (Vondrik, Bergers, de Jong, Stterenberg "Устойчивость к цитостатическим лекарствам на клеточном уровне", Cancer Chemother Pharmacol, (1992), 29, 413-429).

Представляемые изобретением соединения могут быть использованы также для получения лекарственных средств, позволяющих воздействовать на это явление.

Пригодность соединения для получения лекарственных средств, способных преодолеть это явление, определяют в ходе описанного ниже эксперимента.

Острая миелоидная лейкемия Brown Norway (МЛБН) напоминает острую миелоклеточную лейкемию у человека в отношении способности роста и химиотерапевтических реакций (для нового обзора по миелоидной лейкемии (МЛБН) см Martens и сотр., Leukemia, 4, 241-257, 1990).

Для разработки клинически приемлемой устойчивой к лекарствам модели лейкемии выбирают одну из снятых с МЛБН клеточных линий, именуемую LT12. Преимущество этой линии состоит в том, что она может расти как in vivo, так и in vitro.

При введении (in vitro) человеческого гена *mdr1* в геном ДНК путем переноса LT12-клетки становятся устойчивыми в отношении веществ. Для такого переноса, осуществляемого под контролем используемого ранее ускорителя для CMV-промотора, следуя сигналам НВУ-полиадениляции, применяют вектор экспрессии pFRCMV *mdr1* 1,6, содержащий весь набор с ДНК *mdr1* 1-гена человека. Трансфицированные отрезки ДНК отбирают с помощью митоксантрона и выдерживают с 200 нм митоксантрона при разделении веществ. Указанный метод дает возможность получить устойчивую к веществам LT12-линию клеток, именуемую LT12/*mdr*.

Конечная точка поточной цитометрии (количественное изучение клеток).

С помощью поточной цитометрии можно идентифицировать клетки на основании горизонтального (параметр величины) и вертикального (параметр структуры) рассеивания света. Для каждой клетки измеряют три величины активности, возбуждая ее лазерным лучом (0,6 Ватт, 488 нм). Вертикальное рассеивание, горизонтальное рассеивание (через ленточный фильтр 488 нм) и флуоресценция даунорубина (через фильтр с длинной лентой 550 нм). Соединив полученные значения рассеивания с данными флуоресценции, можно исследовать содержание дауномицина в популяции клеток. При  $t = 0$  в суспензию клеток добавляют даунорубин (конечная концентрация 2 мкМ) и опытное соединение (конечная концентрация 1,0 мкМ, 3,0 мкМ и 10 мкМ), ( $2 \cdot 10^5$  клеток/мл в RPMI-1640-среде без фенола красного). Клетки выдерживают в течение 90 минут при 37°C. С помощью поточного цитометра путем измерения светлой флуоресценции при возбуждении 488-нм лазерным лучом определяют внутриклеточную концентрацию даунорубина.

RPMI-1640 среда без фенола-красного выполняет роль отрицательного контроля. При каждом эксперименте применяют циклоспорин А (0,3, 1 и 3 мкМ) в качестве активного вещества. Мертвые клетки идентифицируют с применением невитального красителя Хехст АГ 33258 (по изменению окрашивания, возбуждение производят) (0,2 Ватт/УФ-лазерным лучом через длиннопроходной фильтр 405 нм). Мертвые клетки и детрит при анализе всегда исключают.

Периодическая поточная цитометрия.

Периодическая поточная цитометрия представляет собой разновидность обыч-

ной поточной цитометрии, когда производят периодическое измерение пробы через интервалы в несколько часов. Периодические предварительно определенные временные интервалы заложены в микрокомпьютер с указанием данных для 2000 клеток в так называемом List-Mode-Data. Так как все необходимые параметры (например, величина, структура, аккумуляция веществ и т.д.) для каждой клетки получены, можно провести последовательный обзорный анализ данных и повторные исследования.

Суспензию клеток хранят в реакционном сосуде с термостатической водной рубашкой, соединенной с кюветой цитометра, при 37°C. Среду, содержащую клетки, сжимают, пропуская под давлением воздуха через кювету. Другой вход в реакционный сосуд служит для добавления веществ, осуществляемый под наблюдением клеток. Поэтому метод периодической поточной цитометрии особенно пригоден для измерения (быстрых) кинетических изменений внутриклеточных концентраций веществ.

При таком эксперименте измерения начинают без даунорубина в клеточной суспензии ( $2 \cdot 10^5$  клеток/мл) в RPMI-1640-среде без фенола-красного. При  $t = 0$  в клетки добавляют даунорубин (конечная концентрация 2 мкМ). Непто-поглощение даунорубина клетками измеряют с интервалом в 60 минут, пока не будет достигнут равномерный уровень аккумуляции веществ. В этот момент в клеточную суспензию добавляют испытуемое вещество и снова в течение 60 минут измеряют аккумуляцию веществ. В суспензию клеток в качестве контрольного вещества (положительного) вводят циклоспорин А.

Результаты показывают пригодность представляемого изобретения вещества для данных целей. Необработанные LT 12/*mdr*-клетки показывают 23% флуоресценцию даунорубина, неустойчивые клетки дают 100% флуоресценцию даунорубина. Контрольное вещество цикло-А при концентрации 0,3 мкмоль дает 120%, при 1,0 мкмоль – 110% и при концентрации 3,0 мкмоль – соответственно 130% флуоресценцию даунорубина.

Флезеластин при концентрации 0,1 мкмоль дает 60%, при 0,3 мкмоль – 110%, при 0,5 мкмоль – 130%, при 1,0 мкмоль – 130% и при 3,0 мкмоль – 140% флуоресценцию даунорубина.

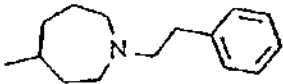
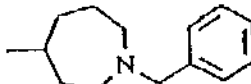
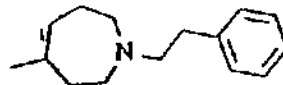
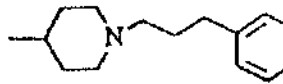
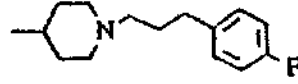
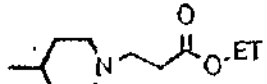


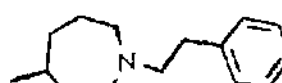
Азеластин при концентрации 0,1 мкмоль показывает 50%, при 0,3 мкмоль – 70%, при 0,5 мкмоль – 90%, при 1,0 мкмоль – 110% и при концентрации 3,0 мкмоль – 140%-ную флуоресценцию даунорубина.

Т а б л и ц а 1

Характеристика	Азеластин	D-18024	D-20602	D-21111	ICS-205930
Противоаритмические свойства сердечных препаратов на примере кролика: инкубационный период с лекарствами 60 минут изменение в процентах к контрольной группе	10 цт	10 цт	10 цт	10 цт	10 цт
Пороговое значение при электрическом раздражении: правая передняя свободная стенка	+29	-1	+100	+37	+51
сосочковая мышца правого желудочка	+22	+19	+102	+35	+34
левая артериальная сердечная мышца	+25	+12	+68	+45	+51
Проводимость правая передняя свободная стенка	-50	+103	+137	+109	+111
левая артериальная сердечная мышца	+40	+91	+118	+111	+57
Эффективный рефракторный период: правая передняя свободная стенка	+9	+7	+26	+25	+21
левая артериальная сердечная мышца	+12	+66	+42	+53	+26
Способность к сокращению: левое предсердие		-39	-35	-24	-33
сосочковая мышца		-48	-32	-25	-29

Т а б л и ц а 2

Анальгетическое действие фталазинов-производных общей формулы I

D-	A	R	Активность в тест-модели	
			IWRAC <sup>a</sup>	IRS <sup>b</sup>
D-17477	4-Cl-фенил		91%	77%
D-18022	4-F-фенил		75%	53%
D-18024	4-F-фенил		ED <sub>50</sub> =2,7	54%
D-18445	4-F-фенил		77%	67%
D-18569	4-F-фенил		67%	52%
D-20602	фенил	3-хинуклидил	ED <sub>50</sub> =3,0	ED <sub>50</sub> =1,5
D-20794	4-F-фенил	3-хинуклидил	ED <sub>50</sub> =4,6	ED <sub>50</sub> =1,5
D-20605	4-Cl-фенил		67%	50%
D-20979	4-Cl-фенил		ED <sub>50</sub> =17	ED <sub>50</sub> =19
D-21559	2-Cl-фенил		ED <sub>50</sub> =4,1	ED <sub>50</sub> =4,7
D-21614	2-фурил		-	40%

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор О.Обручар

Замовлення 541

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101