



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124687** (13) **U**

(51) МПК (2018.01)

C07D 243/36 (2006.01)**C40B 80/00****A61K 38/18** (2006.01)**A61K 47/65** (2017.01)**A61P 31/00**

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

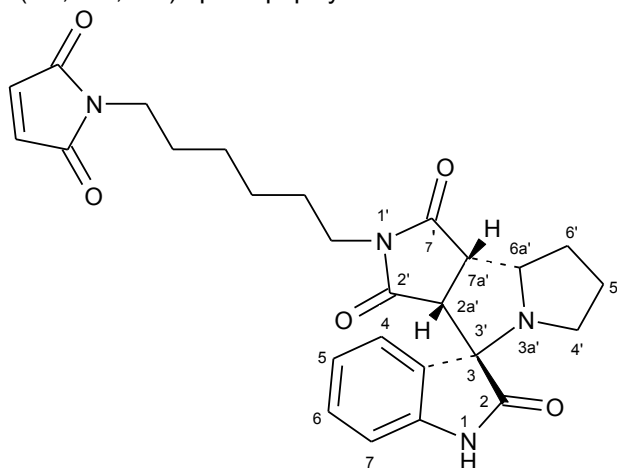
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 07279	(72) Винахідник(и): Редькін Руслан Григорович (UA), Сюмка Євгенія Ігорівна (UA), Шемчук Леонід Антонович (UA), Черних Валентин Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 10.07.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2018	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2018, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) **1'-(ГЕКСАМЕТИЛЕН-N-МАЛЕЇНІМІДО)-2a',7a'-ДИГІДРО-1'H-СПІРО[ІНДОЛ-3,3'-ПІРОЛО[3,4-с]ПІРОЛІЗІДИН]-2,2',7'-(1H,3'H,5'H)-ТРИОН, ЯКИЙ МІСТИТЬ МАЛЕЇНІМІДНИЙ ЛІНКЕР, ПРОЯВЛЯЄ ІНГІБУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ СТОСОВНО РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ І ЧИНИТЬ ПРОТИМІКРОБНУ ДІЮ**

(57) Реферат:

1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'-(1H, 3'H, 5'H)-тріон формули:



містить малеїнімідний лінкер та проявляє інгібуючі властивості стосовно рецептора фактора росту фібробластів типу 1 і чинить протимікробну дію.

UA 124687 U

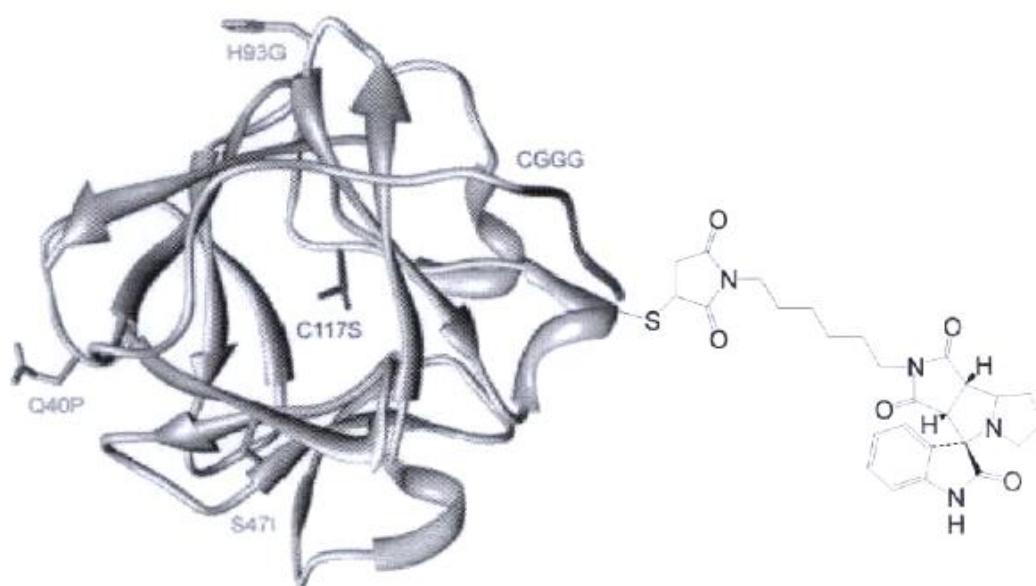


Fig. 1

Корисна модель належить до фармації та медицини, зокрема до синтезу нових активних фармацевтичних інгредієнтів, а саме індивідуальних хімічних сполук ряду спіроциклічних похідних 2-оксиндолу, здатних інгібувати рецептор фактора росту фібробластів типу 1 (FGFR1), крім того, заявлена сполука має протимікробні властивості та містить малеїнімідний лінкер для

додаткового зв'язування на поверхні клітинних мембран чи специфічних антитіл, білків, ліпосом тощо, з метою адресної доставки даного агента безпосередньо до біомішені.

Рецептор фактора росту фібробластів типу 1 (FGFR1) - це трансмембранний протеїн, що належить до родини рецепторних протеїнкіназ. Його взаємодія з лігандом супроводжується димеризацією та активацією кіназного домену із наступним аутофосфорилуванням тирозинових залишків. Із фосфорильованими тирозинами зв'язуються адапторні протеїни. Це в свою чергу призводить до активації декількох сигнальних шляхів: RAS-RAF-MEK-ERK1/2, PI3K-PKB та PLC-γ/PKC. FGFR1 залучений до регуляції проліферації, диференціювання, міграції, виживання клітин та ангіогенезу. Інгібітори FGFR1 можуть бути застосовані для лікування раку, що супроводжується зміненою активністю цього рецептора.

FGFR1 відіграє важливу роль у формуванні мезодерми, органогенезі нервової системи та формуванні легень під час ембріогенезу. У дорослих організмів, FGFR регулює гомеостаз та відновлення тканин, ангіогенез, запалення та диференціацію адипоцитів. Точкові мутації, ампліфікація чи надекспресія гена FGFR1 спостерігається при декількох онкологічних захворюваннях, таких як лімфома, меланома, множинна мієлома, гліома, рак легень, грудей, простати та ін. [1]. Також повідомлялося, що всі рецептори фактора росту фібробластів (чотири) FGFRs надмірно експресуються в численних людських пухлинах, таких як рак молочної залози, легень, шлунка і щитоподібної залози [2]. Тобто, блокування означеної біомішені може бути вірогідним шляхом для лікування зазначених патологій.

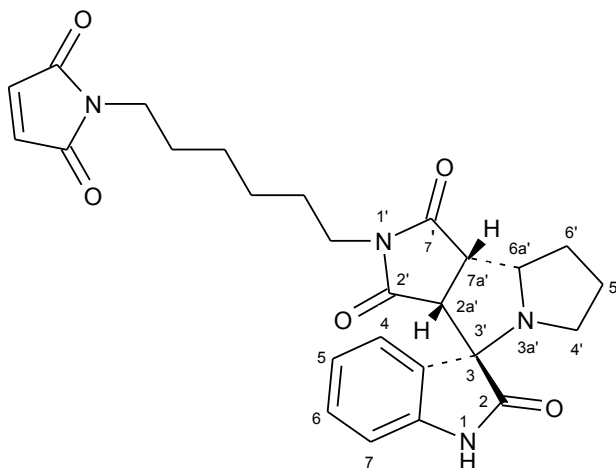
Крім того, мутації гена FGFR типу 1 пов'язані із таким тяжкими рідкісними генетичними захворюваннями як синдром Пфайфера, синдром Джексона-Вейсса, синдром Ентлі-Бікслер, тригоноцефалією, і аутосомно-домінантним синдромом Калман [3]. Ці рецептори дуже важливі для правильного розвитку кісток [4]. Отже, інгібітори FGFR1 можуть бути застосовані для лікування різного роду пухлин, що супроводжується зміненою активністю цього рецептора [5]. Інгібітори FGFR1 показали значну ефективність в експериментах *in vitro* та *in vivo* на різних типах пухлин з підвищеною активністю цієї кінази. На сьогодні знайдено декілька класів інгібіторів FGFR1, деякі з них знаходяться на стадії клінічних випробувань [6, 7]. Крім цього, пропонуються й нові гетероциклічні сполуки з ядрами піримідину та піразолу, як інгібітори протеїнкінази родини FGFR [8].

Найбільш близьким класом до заявленої сполуки є 2-оксиндоли - один із перших знайдених класів інгібіторів FGFR1. Так, наприклад сполука SU5402 має IC_{50} 0,03 мкМ за концентрації АТФ 10 мкМ [9]. Для цієї сполуки встановлено просторову структуру комплексу з кіназою [10]. У результаті подальших досліджень серед цього класу речовин знайдено інгібітор SU6668, який нарівні з FGFR1 інгібує VEGFR і PDGFR із IC_{50} 1,2, 2,1 та 0,008 мкМ відповідно. Проте дані сполуки, на відміну від заявленої в цій корисній моделі 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімід)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріону, не містять малеїнімідної лінкерної групи та не можуть додатково зв'язуватися із поверхнею клітинних мембран чи специфічних антитіл, білків, ліпосом тощо, з метою адресної доставки даного агента безпосередньо до біомішені.

Окрім того, заявлена сполука на відміну від згаданих вище 2-оксиндолічних інгібіторів кіназ, виявляє протимікробні властивості, що ілюструється в експерименті *in vitro*, зокрема пригнічує ріст стандартних тест-штамів - *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.coli*, *C. albicans*, тощо. Ця протимікробна активність є перевагою, яка може бути використана в комплексному лікуванні пацієнтів, котрі отримують блоки хіміотерапії та страждають від супутніх опортуністичних інфекційних ускладнень (ранні та відстрочені токсичні ускладнення цитостатичної поліхіміотерапії, септичні ризики нейтропенії, інτερкурентні інфекції у імуноскомпроментованих пацієнтів, характеристики гематологічних рецидивів та вторинних пухлин).

В основу корисної моделі поставлена задача створення нової хімічної сполуки, що проявляє високу інгібуючу активність стосовно FGFR1 і містить специфічну зв'язуючу групу (лінкер) для додаткової фіксації молекули інгібітору на поверхні клітинних мембран або антитіл до FGFR1, така молекула може бути використана як діюча речовина у складі фармацевтичних препаратів (композицій) різних лікарських форм.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу індивідуальної хімічної сполуки 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімід)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріон формули:



який містить малеїнімідний лінкер та проявляє інгібуючі властивості стосовно рецептора фактора росту фібробластів і чинить протимікробну дію.

Заявлена сполука проявляє здатність блокувати активність FGFR1 шляхом зв'язування із шарнірним регіоном кіназного домену.

У той час як основна перевага антитіл полягає у їх високій специфічності в розпізнаванні маркерів клітинної поверхні, інші молекули, такі як природні ліганди рецепторів демонструють аналогічну функцію і можуть розглядатися як альтернативний засіб для направлення протипухлинних препаратів до уражених клітин, приміром ліганд кінази FGFR1 - фактор росту фібробластів (FGF1_v) [11] може використовуватись для вибіркової доставки цитостатиків - наночастинок золота [12] та монометил ауристатину Е [13]. Зокрема, на відміну від відомого 2-оксиндолінового інгібітора FGFR1-кінази SU5402, заявлене спіро-2-оксиндольне похідне здатне зв'язуватися із специфічними лігандами FGFR1 за рахунок малеїнімідного лінкера, наприклад із фактором росту фібробластів (FGF1_v) або моноклональними антитілами до FGFR1, завдяки реакції малеїнімідного лінкера заявленої молекули із вільними залишками цистеїну поліпептидного ланцюга або ліпосомами.

На фіг. 1 показано схему утворення можливого кон'юганту між заявленою сполукою та фактором росту фібробластів FGF1_v-генно-інженерного походження.

Такі кон'юганти можуть вибірково транспортуватися до цільової біомішені - клітин, що експресують на поверхні своїх мембран протеїнкіназу FGFR1.

Сполука, що заявляється, синтезована однореакторним методом, оснований на трикомпонентній конденсації ізатину з Z-проліном і 1,6-біс-малеїнімідогексаном у еквімолярному співвідношенні.

1'-(Гексаметилен-N-малеїнімід)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріон це сірувато-біла дрібнокристалічна речовина, розчинна у диметилформаміді (ДМФА), оцтовій кислоті, диметилсульфоксиді (ДМСО), ацетонітрилі, погано розчинна у етанолі, гексані та практично нерозчинна у воді.

Будова сполуки підтверджена за допомогою елементного аналізу, ЯМР¹H-, мас-спектрометрії та ІЧ-спектроскопії.

Корисна модель пояснюється прикладами:

Приклад 1. Одержання 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімід)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріону шляхом однореакторної процедури.

Суміш 1,47 г (0,01 моль) ізатину, 1,15 г (0,01 моль) L-проліну та 2,76 г (0,01 моль) 1,6-б/с-малеїнімідогексану в суміші етанол-вода (3:1, 40 мл) нагрівали зі зворотним холодильником протягом 3 годин, хід реакції контролюють за ТШХ, і по зміні кольору реакційної суміші з червоно-брунатного до жовтого. Розчин охолоджують, після охолодження реакційну суміш упарюють у вакуумі. Вихід сирого продукту 3,8 г (78 %).

Отриманий продукт очищували або колонковою флеш-хроматографією або зворотно-фазовою рідинною хроматографією, застосовуючи Waters FractionLynx LC-MS систему з фракціонуванням по масі. Column: Waters XBridge C18 5 мкм, 19×100 мм; рухома фаза А: розчин 0,15 % NH₄OH у воді і рухома фаза В: розчин 0,15 % NH₄OH в ацетонітрилі; швидкість потоку була 30 мл/хв., розділяючий градієнт підбирали, застосовуючи Compound Specific 15 Method Optimization protocol, як описано в літературі [14]. Потім виділений продукт звичайно піддавали аналітичній LC/MS для перевірки чистоти при наступних умовах: Instrument; Agilent 1100 series, LC/MSD, колонка: Waters Sunfire™ C-18 5 мкм, 20 2,1×,0 мм, буфери: рухома фаза А: 0,025 %

розчин трифтороцтової кислоти у воді і рухома фаза В: 0,025 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі; градієнт 2 %-80 % буфера В протягом 3 хвилин при швидкості потоку 1,5 мл/хв).

На фіг. 2 показано аналітичну LC/MS заявленої сполуки.

Вихід після очистки 1,94 г (40 %). $T_{пл}$ 140-142 °C.

5 Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч. (400 МГц, DMSO- d_6 , TMS): 1,24-1,40 м (4H, CH_2CH_2), 1,56-1,94 м (8H, $N-CH_2-CH_2-(CH_2)_2-CH_2-CH_2-$, $-6'CH_2-5'CH_2-$), 2,97 т (2H, $4'-CH_2$), 3,56 (1H, $7a'-CH$), 3,73-3,82 м (2H, $2a'-CH$, $6a'-CH$), 6,91 д (2H, $CO-CH=CH-CO$, $J=8,0$, Гц), 7,28 д ($1H_{аром.}$, $J=8,4$ Гц), 7,45 д ($2H_{аром.}$, $J=10,2$ Гц), 7,81 д ($1H_{аром.}$, $J=8,0$, Гц), 10,55 с (1H, NH, D_2O мінливий).

10 Масс-спектр, m/z ($I_{відносно.}$, %): 477,2 (1,4) $[M+1]^+$, 476,1 (100) $[M]^+$, 339,1 (98) $[M-137]^+$, 157,2 (25) $[M-319]^+$.

Елементний аналіз: знайдено, %: C, 65, 12; H, 5,98; N, 11,34. $C_{26}H_{28}N_4O_5$, М.М.= 476,54. Вирахувано, %: C, 65,53; H, 5,92; N, 11,76; O, 16,79.

15 Фіг. 3 - у ІЧ-спектра сполуки у KBr, cm^{-1} присутні характеристичні смуги поглинання: 3482-3348, 3271-3252, (ν_{ArNHCO}), 3094-3074 (цис- $CH=CH$), 3319, 3347, 3264 (ν_{NH}), 1636, 1772, 1697 (ν_{CO}), 1593, 1570 (δ_{NH}), 1425, 1405, 1243-1117, 758-536 (ν_{CH_2}).

Приклад 2. Аналіз зв'язування 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-c]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріону із кіназою FGFR1 (докінгові дослідження).

20 Для проведення аналізу зв'язування сполуки було використано рецептор-орієнтований віртуальний скринінг. Докінг проводився в АТФ зв'язувальні сайти протеїнкінази FGFR1 (код бази даних RCSB 3GQI-2.50A), за допомогою програми Autodock4 (15), препроцесинг та обробка результатів велась за допомогою програми MGL Tools (16). Дана програма є одним із найпопулярніших інструментів для віртуального скринінгу в академічному середовищі і характеризується високими оцінками в спеціалізованій літературі. Взята для докінгу структура є кіназним доменом в активному стані. Сполуки, що зв'язуються з ними, є АТФ-конкурентними інгібіторами протеїнкіназ другого типу, до яких належить більшість відомих на сьогоднішній день інгібіторів кіназ.

30 Ранжування ліганду проводили за енергією зв'язування з кіназним доменом. Для цього використовується скорингова функція програми Autodock4. Скорингова функція Autodock4 оцінює вільну енергію зв'язування ліганду з рецептором в ккал/моль, менші значення відповідають більш сильним інгібіторам. Також отримано інформацію про наявність водневих зв'язків між лігандом та кіназою, котрі характерні для відомих інгібіторів досліджених протеїнкіназ, зокрема SU5402. Для абсолютної більшості інгібіторів кіназ характерна наявність водневих зв'язків з шарнірним регіоном кіназного домену, який поєднує N та C кінцеві домени кінази і бере участь у зв'язуванні природного субстрату кіназ - АТФ. Також оцінювались водневі зв'язки з консервативними залишками лізину, аспарагіну та глутаміну, які беруть участь в каталітичному перенесенні фосфатної групи, що теж характерно для багатьох інгібіторів протеїнкіназ. Проведено візуальну оцінку ліганду в сайті зв'язування АТФ. Найбільш активними є сполуки, які 40 зв'язуються із амінокислотними залишками високочутливого регіону кінази від 563 до 568, та високо консервативним амінокислотним залишком Asn⁶²⁸ [10]. Так, референс-сполука SU5402 отримала енергію докінгу - 9,22 ккал/моль, а заявлена сполука дуже близьке значення - 9,44 ккал/моль, що говорить про високу здатність заявленої сполуки інгібувати протеїнкіназу FGFR1.

Дані дослідження наведенні у таблиці 1.

45 Для заявленої сполуки також показана наявність водневих зв'язків з шарнірним регіоном кіназного домену, амінокислот - Ala⁵⁶⁴, Asn^{628A} та іншими. Положення сполуки на сайті зв'язування АТФ, знайдене методом молекулярного моделювання, має ознаки, що характерні для АТФ-конкурентних інгібіторів кіназ другого типу.

50 На фіг. 4 показано 3D-модель зв'язування заявленого інгібітора із АТФ- зв'язувальним сайтом протеїнкінази FGFR1 за даними молекулярного моделювання.

Таблиця 1

Характеристика зв'язування 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-c]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріону за результатами докінгу відносно кінази FGFR1

Шифр сполуки	Структура сполуки	Знайдена енергія докінгу E _{Doc} , ккал/моль	Водневі зв'язки з шарнірними регіонами кіназного домену
Заявлена сполука {813EC}		-9,44	Asn ^{628A} Ala ⁵⁶⁴ Lys ⁵¹⁴ Gly ^{487A} Leu ^{630A}
Референс-сполука {SU5402}		-9,22	Asn ⁵⁶⁸ Gly ⁵⁶⁷ Phe ⁴⁸⁹ Asp ⁶⁴¹

Приклад 3. Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази FGFR1 під дією 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-c]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріону.

Інгібування кіназної активності FGFR1 досліджуваною сполукою визначали за біохімічним тестом *in vitro*. Для цього використовували активований кіназний домен людської кінази FGFR1 (#14582, Millipore, США). Активність FGFR1 визначали за включенням радіоактивного фосфору в пептидний субстрат кінази при його фосфорилуванні кіназою у присутності $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [16].

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і складався з буфера, субстрату, рекомбінантного білка протеїнкінази FGFR1 та дистильованої води: 6 мкл 5хреакційного буфера для FGFR1 (50 мМ МОПС; pH 7,1, 1 мМ EDTA, 1 мг/мл БСА, 0,1 % β -меркаптоетанол, 0,01 % Брідж 35, 0,5 мМ Na_3VO_4), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату IGRIRtide (4 мг/мл (#12527, Millipore, США)), 0,01 мкл розчину протеїнкінази FGFR1 (0,2 мкг/мл (#14582, Millipore, США)), 11,5 мкл води. Час інкубації становив 25 хв при 30 °C.

Далі аліквоти реакційної суміші (19 мкл/пробу) вносили в епіндорфи об'ємом 1,5 мл і додавали по 1 мкл розчину інгібітора (розчиненого в ДМСО) потрібної концентрації. Для ініціації реакції до кожного зразка додавали попередньо приготовану суміш, яка складалася з 10 мкл 150 мкМ АТФ і $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, з радіоактивністю 0,1-0,2 мСі на 30 мл суміші. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 мкМ. Після інкубації при 30 °C реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5 % розчину ортофосфорної кислоти.

Отриману реакційну суміш наносили на диск фосфоцелюлозного паперу P31 (Whatman) із діаметром 20 мм. Диски відмивали тричі з використанням 1 % розчину ортофосфорної кислоти та просували в термостаті при 45 °C. Рівень радіоактивного сигналу визначали в сцинтиляційній рідині у флаконах, використовуючи сцинтиляційний лічильник "Tricarb 2800 TR" (Perkin Elmer, США). Як негативний контроль замість розчину інгібітору додавали 1 мкл ДМСО (3,3 %).

Залишкову активність кінази виражали у відсотках від активності кінази в негативному контролі (100 %) за формулою:

$$\text{Залишкова активність, \%} = (\text{PR}_k - \text{PR}_i / \text{PR}_k) \times 100,$$

Де PR_k - питома радіоактивність $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ у негативному контролі, мСі/нмоль;

IPR_i - питома радіоактивність $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ у присутності інгібітору, мСі/нмоль.

Результати дослідження наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Інгібіторна активність 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2а',7а'-дигідро-1'Н-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'-(1Н, 3'Н, 5'Н)-тріону відносно протеїнкінази FGFR1

№ Проби	Залишкова активність* FGFR1, % (N=3)	Концентрація, мкМ	IC ₅₀ , мкМ
1	40±0,707"	100	45
2	53±0,707'	33	
3	64±1,080"	16,5	
4	95±0,408'	8,25	
5	98±0,204**	4,125	

Примітки: * - середнє значення трьох вимірювань, ** - $t_1 < t_2$, зміни ознаки статистично не значимі ($p > 0,05$).

Далі побудовано криву залежності активності ферменту від концентрації інгібітора і за ними визначено IC₅₀. В результаті IC₅₀ заявленої сполуки склала 45 мкМ.

На фіг. 5 зображена крива залежності активності протеїнкінази FGFR1 від концентрації досліджуваного інгібітору для визначення IC₅₀.

Приклад 4. Антимікробну активність 1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2а',7а'-дигідро-1'Н-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-с]піролізидин]-2,2',7'-(1Н, 3'Н, 5'Н)-тріону вивчали в умовах in vitro загально прийнятим в мікробіологічній практиці методом дифузії в агар у модифікації колодязів [18].

Наважку препарату у кількості 1 мг розчиняли у 1 мл розчинника (ДМСО). Розплавлене агарове поживне середовище охолоджували до 45 °С, розливали нижнім шаром в чашки Петрі в об'ємі 10 мл. Після застигання агару на ньому розміщали шість стерильних циліндрів із нержавіючої сталі висотою 10 мм і внутрішнім діаметром 8 мм, навколо яких розливали другим шаром середовище в об'ємі 15 мл, засіяне відповідними культурами мікроорганізмів. Мікробне навантаження складало 500 тис. мікробних клітин на 1 мл щільного поживного середовища. Після застигання верхнього шару агару на чашках Петрі циліндри виймали стерильним пінцетом і в утворені лунки вносили препарат.

Тест-штами мікроорганізмів. Як тест-мікроорганізми використовували еталонні штами із американської типової колекції культур: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans ATCC 885-653. При їх вирощуванні та проведенні досліджень використовували відповідні живильні середовища, зазначені в національній частині ДФУ - середовища №1 і №2. Чистоту кожної культури мікроорганізму було підтверджено за типовими морфологічними, тінкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями.

Вивчення антимікробної активності препарату проводили порівняно із цефалексином (для культур Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Bacillus subtilis ATCC 6633) та флуконазолом (для культури Candida albicans ATCC 885-653).

Підготовка зразків препаратів. Наважку препарату (1 мг) ретельно змішували з розчинником (1 мл) із дотриманням правил асептики у стерильних скляних пробірках. Із отриманої суспензії препарату відбирали по 0,3 мл та вносили в лунки на чашки Петрі з мікробними культурами. Чашки Петрі витримували протягом однієї години при кімнатній температурі, після чого поміщали у термостат і інкубували протягом 24 годин при температурі 37 °С - з м'ясо-пептонним агаром і 25 °С - протягом 48 годин з агаром Сабуро (Candida albicans).

Рівень антимікробної активності заявленої субстанції та препаратів порівняння реєстрували за діаметром зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки з внесеним препаратом, оцінюючи його у порівнянні із контролями.

Результати дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Антимікробна активність заявленої сполуки

Серія тестів	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Заявлена субстанція	25,0±0,3	27,0±0,1	20,0±0,2	+++	25,0±0,2
Контроль (розчинник)	21,0±0,1	+++	15,0±0,1	23,0±0,1	+++
Контроль (культура)	+++	+++	+++	+++	+++
Цефалексін	32,0±0,1	32,0±0,1	35,0±0,1	36,0±0,1	НТ
Флуконазол	НТ	НТ	НТ	НТ	16,0±0,1

Примітки: Представлені дані є середніми значеннями результатів 3-х кратних визначень антимікробної активності препаратів відносно кожної культури мікроорганізму; /+++/- рост культури; НТ - не тестувався

При оцінці отриманих результатів притримувалися наступних критеріїв, які є загальноприйнятими згідно даного методу для нових антибактеріальних речовин, а також при вивченні антибіотикостійких штамів [18]:

відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного в лунку препарату або концентрації антибіотика;

зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість культури до випробовуваної концентрації антибактеріальної речовини;

зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до випробувального лікарського засобу;

зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваних препаратів.

Аналіз наведених у таблиці 3 даних свідчить, що заявлена сполука найбільшу активність проявила стосовно *C. albicans* перевищивши флуконазол більш ніж у 1,5 разу, що говорить про високу чутливість грибів *C. albicans* до заявленої субстанції та перспективність її застосування як протигрибкового засобу. Таким чином, заявлена сполука проявляє виражену антикандидозну активність у порівнянні із флуконазолом.

Також високочутливими до заявленої сполуки виявилися *B.subtilis* та *S.aureus*. Чутливою до заявленої сполуки виявилася і культура *E.coli*, хоча референс-препарат - цефалексін виявив більш ніж у 1,3-1,5 разу вищу активність стосовно всіх тест-штамів, включаючи *P.aeruginosa*.

Таким чином, заявлено нову хімічну сполуку хімічної сполуки, що проявляє високу інгібуючу активність стосовно FGFR1 і містить специфічну зв'язуючу групу (лінкер) для дотаткової фіксації молекули інгібітора на поверхні клітинних мембран або антитіл до FGFR1, а також проявляє виражену антикандидозну та протимікробну активність.

Заявлена сполука може знайти застосування в медичній практиці для лікування ряду хвороб, в патогенезі яких лежить підвищення активності FGFR1 та супроводжуються проліферативними ефектами, що призводять до неоваскуляризації пухлинної тканини та є однією з необхідних умов росту солідних пухлин, зокрема при низці таких онкогенних захворювань, як рак легень, грудей, простати, шлунка і щитоподібної залози, лімфома, меланома, множинна мієлома, гліома, а також таких неонкологічних хвороб, як ревматоїдний артрит, діабетична ретинопатія та ін. Перевагою заявленого агента є поєднання його антикіназної (анти-FGFR1) активності із протимікробною дією, зокрема вираженою антикандидозною та помірною антибактеріальною, що може бути використано в комплексному лікуванні пацієнтів, які отримують блоки хіміотерапії та страждають від супутніх опортуністичних інфекційних ускладнень (ранні та відстрочені токсичні ускладнення цитостатичної поліхіміотерапії, септичні ризики нейтропенії, інτερкурентні інфекції у імуноскомпроментованих пацієнтів (кандидозна інфекція), характеристики гематологічних рецидивів та вторинних пухлин).

Для синтезу заявленої сполуки використовуються однореакторний метод та доступні реактиви, дозволені у фармацевтичній практиці, нешкідливі для довкілля. Речовина проста у технологічних дослідженнях, відтворенні у промислових умовах, стійка, що збільшує термін її зберігання, а також має широку фармакологічну активність. Перелічені фактори дозволяють рекомендувати субстанцію для розробки вискоефективних лікарських засобів з метою

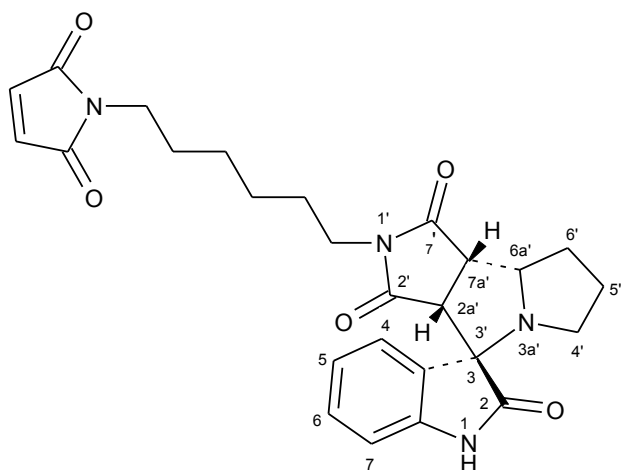
лікування захворювань, які характеризуються зміною рівня експресії або активності протеїнкінази FGFR1.

Джерела інформації:

1. Li Y., Mangasarian K., Mansukhani A., Basilico C. Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene* 1997; 14:1397-406.
2. Ho H.K., Yeo A.H.L., Kang T.S., Chua B.T. Current strategies for inhibiting FGFR activities in clinical applications: Opportunities, challenges and toxicological considerations. *Drug Discov Today*. 2014; 19(1):51-62.
3. Dode C, Fouveaut C, Mortier G., Janssens S., Bertherat J., Mahoudeau J., et al. (Jan 2007). "Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR 1 c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis". *Human Mutation*. 28 (1): 97-8.
4. Chan C.T., Thorogood P. (January 1999). "Pleiotropic features of syndromic craniosynostoses correlate with differential expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 during human craniofacial development". *Pediatr Res*. 45(1): 46-53.
5. Kato M., Nakagama H. (Mar 2014). "FGF receptors: cancer biology and therapeutics". *Medicinal Research Reviews*. 34 (2): 280-300.
6. Gavine P. R., Mooney L., Kilgour E., et al. AZD4547: An orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res*. 2012;72(8):2045-2056.
7. Investigational drugs targeting fibroblast growth factor receptor in the treatment of non-small cell lung cancer. Rijavec E., Genova C, Barletta G., Biello F., Rossi G., Tagliamento M., Dal Bello M.G., Coco S., Vanni I., Boccardo S., et al. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017 May; 26(5):551-561. Epub 2017 Apr 13.
8. Nitrogen-containing aromatic heterocyclic compound [Електронний ресурс] / [M. Kameda, I. Kuriwaki, K. Iikubo та ін.] // United States Patent Application No. 20170152232. - 2017. - Режим доступу до ресурсу: <http://www.freepatentsonline.com/y2017/0152232.html>.
9. Sun et al (1999) Design, synthesis and evaluations of substituted 3-[(3-or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidenyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF and PDGF receptor tyrosine kinases. *J. Med. Chem.* 42 5120.
10. Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C, Hirth P., Yeh B.K., Hubbard S.R., Schlessinger J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors // *Science*. - 1997. - Vol. 276, No. 5314. - P. 955-960.
11. FGFR1 antibodies and treatment of cancer [Електронний ресурс] / [S. Cool, V. Nurcombe та ін.] // United States Patent Application No. 9333257. -2016. -Режим доступу: <http://www.freepatentsonline.com/9333257.html>.
12. FGF 1-gold nanoparticle conjugates targeting FGFR efficiently decrease cell viability upon NIR irradiation. Szlachcic A, Pala K, Zakrzewska M, Jakimowicz P, Wiedlocha A, Otlewski J. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 5915-27.
13. Szlachcic A, Zakrzewska M, Loboeki M, Jakimowicz P, Otlewski J. Design and characteristics of cytotoxic fibroblast growth factor 1 conjugate for fibroblast growth factor receptor-targeted cancer therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:2547-2560. doi:10.2147/DDDT.S105896.
14. "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. *Chem.*, 2004, 6, 874-883.
15. Електронний ресурс -[Режим доступу]: <http://autodock.scripps.edu>.
16. Електронний ресурс -[Режим доступу]: <http://mgltools.scripps.edu>.
17. Hastie C. J., McLauchlan H. J., Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol // *Nature Protocols*. - 2006. - Vol. 1, No. 2. - P. 968-971.
18. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації МОЗ України, Державний фармакологічний центр/ Ю.Л. Волинський, І.С. Гриценко, В.П. Широбоков. - Київ, 2004. - 38 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1'-(Гексаметилен-N-малеїнімідо)-2a',7a'-дигідро-1'H-спіро[індол-3,3'-піроло[3,4-c]піролізидин]-2,2',7'(1H, 3'H, 5'H)-тріон формули:



який містить малеїнімідний лінкер та проявляє інгібуючі властивості стосовно рецептора фактора росту фібробластів типу 1 і чинить протимікробну дію.

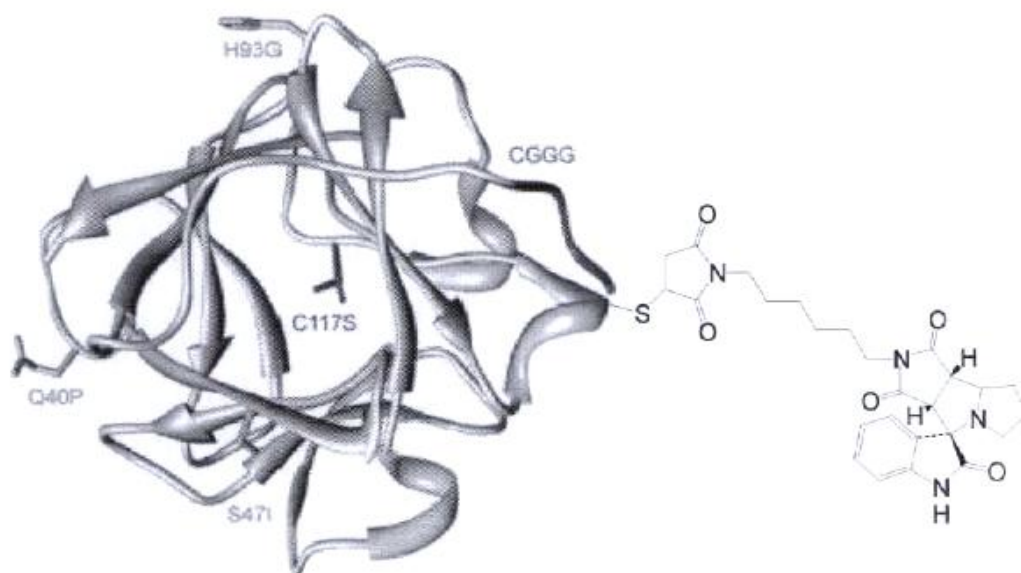


Fig. 1

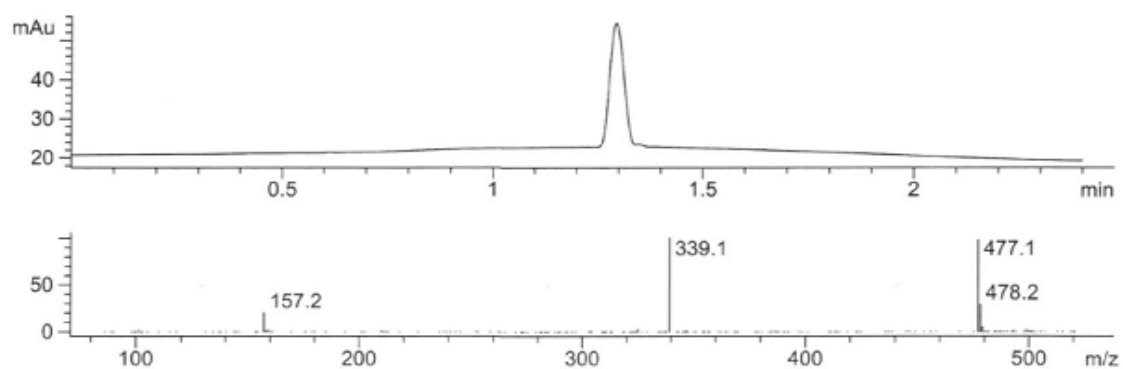


Fig. 2

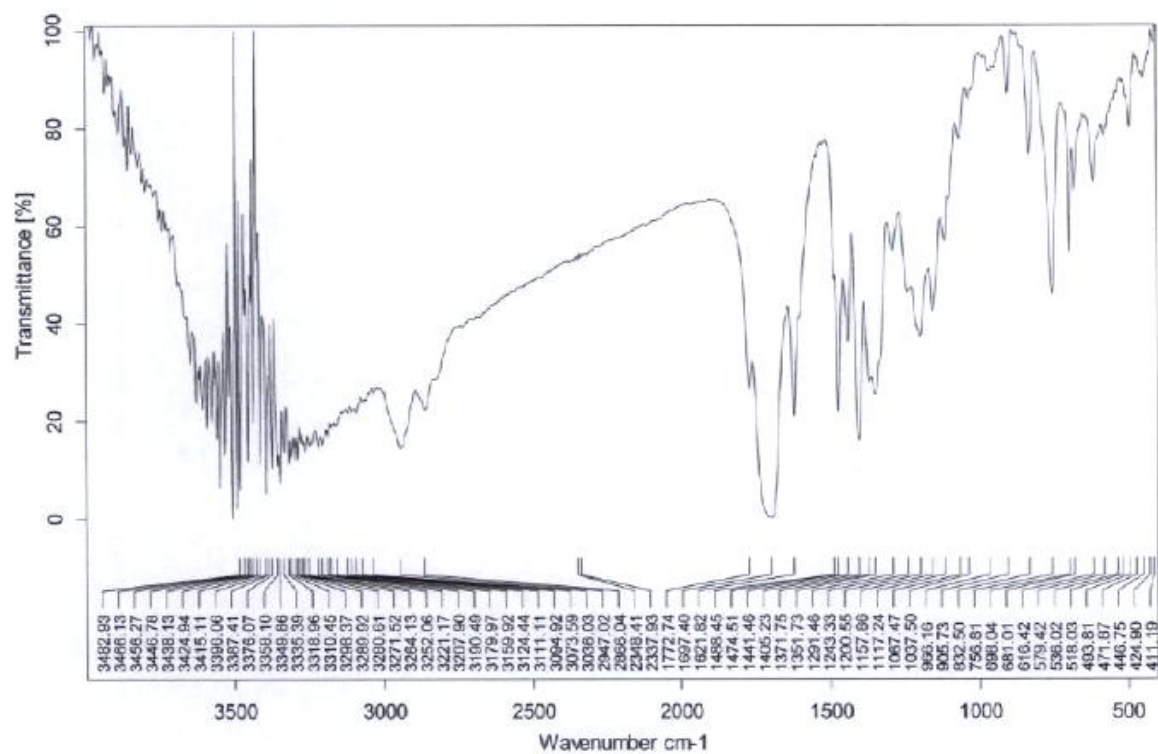


Fig. 3

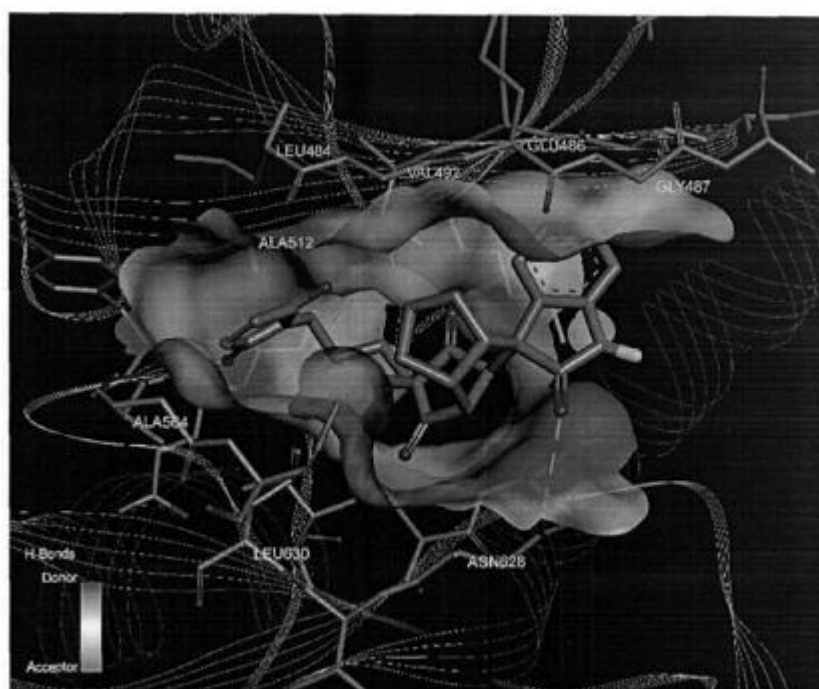
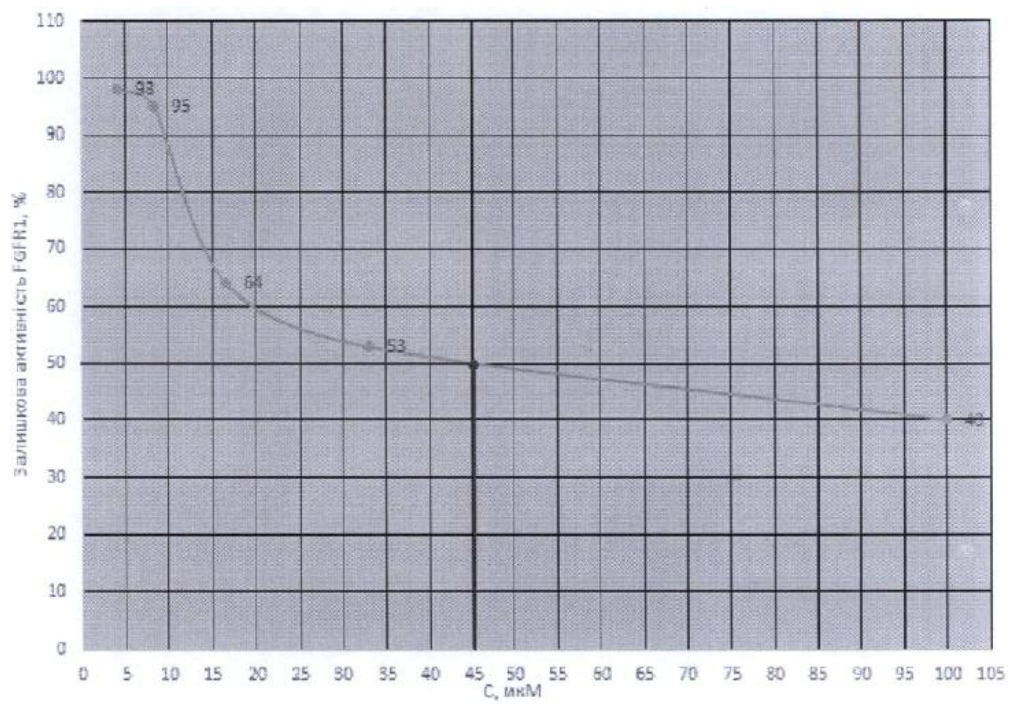


Fig. 4



Фіг. 5

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601