



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/437 (2024.08); A61P 35/00 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023132935, 13.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
13.12.2023

Дата регистрации:  
07.10.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.12.2023

(45) Опубликовано: 07.10.2024 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УрФУ,  
Центр интеллектуальной собственности,  
Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Криночкин Алексей Петрович (RU),  
Копчук Дмитрий Сергеевич (RU),  
Ковалев Игорь Сергеевич (RU),  
Тания Ольга Сергеевна (RU),  
Платонов Вадим Александрович (RU),  
Зырянов Григорий Васильевич (RU),  
Старновская Екатерина Сергеевна (RU),  
Валиева Мария Игоревна (RU),  
Чухахин Олег Николаевич (RU),  
Хасанов Альберт Фаридович (RU),  
Мелехин Всеволод Викторович (RU),  
Тохтуева Мария Дмитриевна (RU),  
Зонов Андрей Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Уральский федеральный  
университет имени первого Президента  
России Б.Н. Ельцина" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012007007 A1, 19.01.2012.  
PECNARD S. et al. Anticancer properties of  
indole derivatives as IsoCombretastatin A-4  
Analogues, European Journal of Medicinal  
Chemistry, 2021, vol. 223, 113656. RU 2142460  
C1, 10.12.1999. КОРЧУК D.S. et al. Studies on  
the interactions of 5-R-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazines  
with arynes: inverse demand aza-Diels-Alder  
(см. прод.)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ 10-(4-ФЕНИЛ-5-ЦИАНО-1Н-1,2,3-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ)ПИРИДО[1,2-а]ИНДОЛА В  
КАЧЕСТВЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

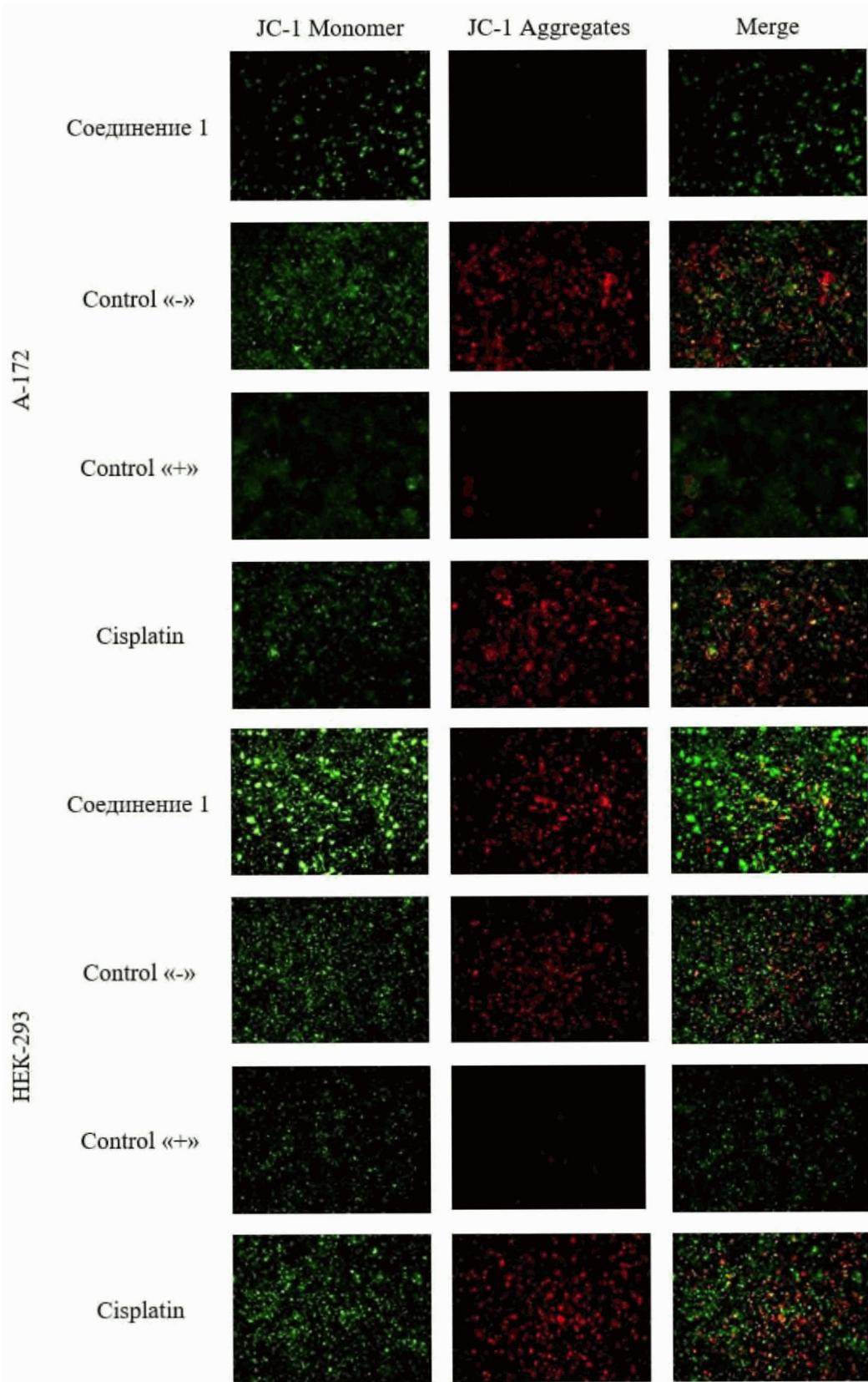
(57) Реферат:

Изобретение относится к применению 10-(4-фенил-5-циано-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-а]индола в качестве противоопухолевого агента в концентрации 16 мкМ, являющейся токсической для неопластических клеток и безопасной для

нормальных клеток человека in vitro. Изобретение позволяет применять соединения класса пиридо[1,2-а]индола в качестве противоракового агента и может использоваться в практике исследовательских и медицинских лабораторий

для подавления жизнедеятельности опухолевых клеток, в частности клеток глиобластомы, in vitro.

6 ил., 3 табл.



Фиг. 6

(56) (продолжение):

reaction versus aryne-mediated domino process, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, v. 16, p.5119-5135.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/437* (2006.01)  
*A61K 31/4192* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61K 31/437 (2024.08); A61P 35/00 (2024.08)*

(21)(22) Application: **2023132935, 13.12.2023**

(24) Effective date for property rights:  
**13.12.2023**

Registration date:  
**07.10.2024**

Priority:

(22) Date of filing: **13.12.2023**

(45) Date of publication: **07.10.2024** Bull. № 28

Mail address:

**620002, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, UrFU, Tsentr  
intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.**

(72) Inventor(s):

**Krinochkin Aleksei Petrovich (RU),  
Kopchuk Dmitrii Sergeevich (RU),  
Kovalev Igor Sergeevich (RU),  
Taniia Olga Sergeevna (RU),  
Platonov Vadim Aleksandrovich (RU),  
Zyrianov Grigorii Vasilevich (RU),  
Starnovskaia Ekaterina Sergeevna (RU),  
Valieva Mariia Igorevna (RU),  
Chupakhin Oleg Nikolaevich (RU),  
Khasanov Albert Faridovich (RU),  
Melekhin Vsevolod Viktorovich (RU),  
Tokhtueva Mariia Dmitrievna (RU),  
Zonov Andrei Alekseevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal State Autonomous Educational  
Institution of Higher Education Ural Federal  
University named after the first President of  
Russia B.N.Yeltsin (RU)**

**(54) USE OF 10-(4-PHENYL-5-CYANO-1H-1,2,3-TRIAZOL-1-YL)PYRIDO[1,2-a]INDOLE AS SELECTIVE  
INHIBITOR OF MALIGNANT CELL ACTIVITY**

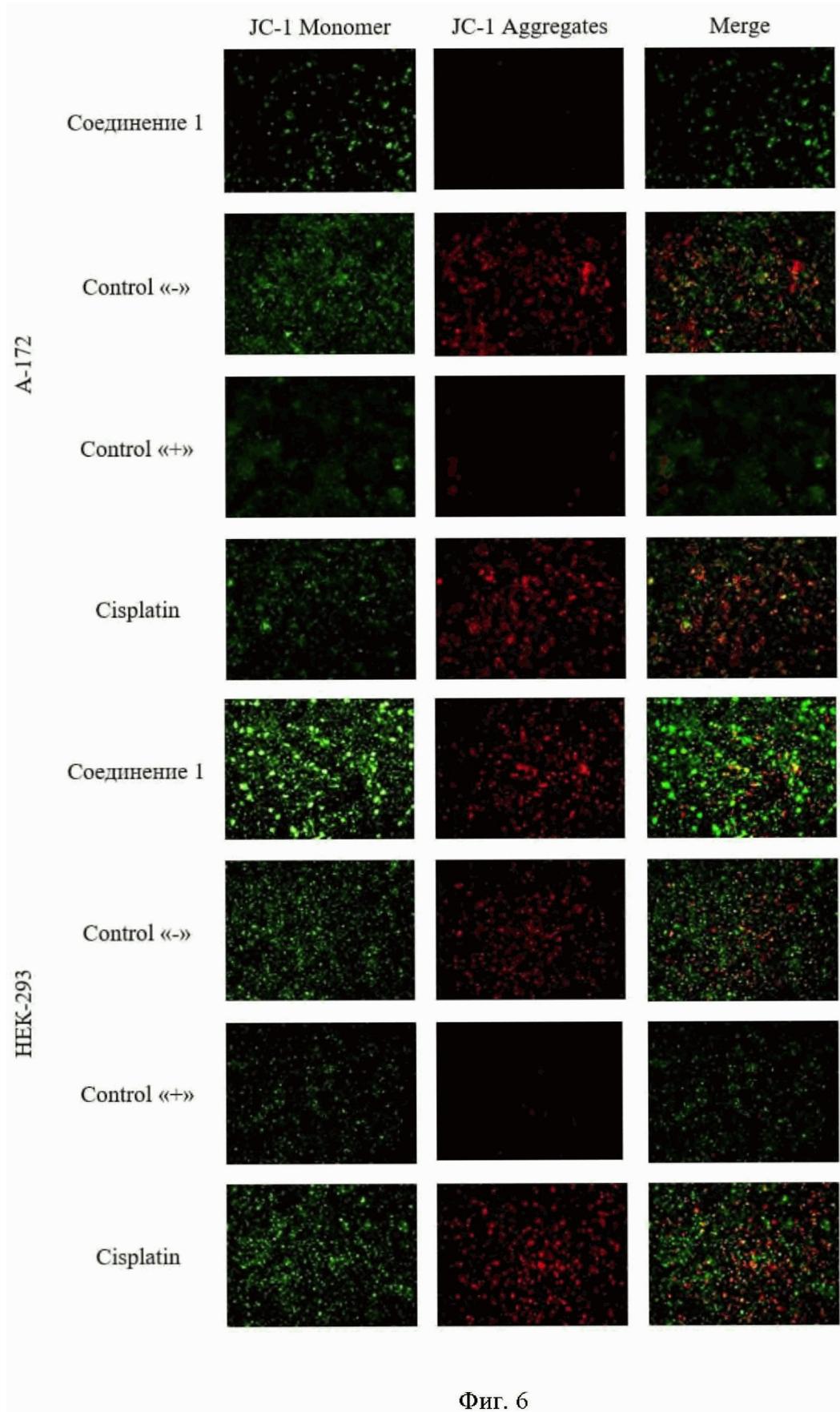
(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to use of 10-(4-phenyl-5-cyano-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyrido[1,2-a]indole as an anticancer agent in concentration of 16 mcM, which is toxic for neoplastic cells and safe for normal human cells in vitro.

EFFECT: invention enables to use compounds of the pyrido[1,2-a]indole class as an anticancer agent and can be used in research and medical laboratories to inhibit tumor cells, particularly glioblastoma cells, in vitro.

1 cl, 6 dwg, 3 tbl



Фиг. 6

## 1. Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение представляет собой применение соединения класса пиридо[1,2-а]индола 1 (Фиг. 1) в качестве противоракового агента и может использоваться в практике исследовательских и медицинских лабораторий для подавления жизнедеятельности опухолевых клеток, в частности клеток глиобластомы, *in vitro*.

## 2. Уровень техники

Превращение нормальной клетки в опухолевую сопровождается различными мутациями изменениями нуклеотидной последовательности генов. Все злокачественные новообразования содержат результаты генетических событий, приводящих к активации онкогенов и инактивации генов-супрессоров опухолевого роста. Известно, что нарушение запрограммированной гибели клеток приводит к неконтролируемому росту. Одним из перспективных способов влияния на развитие онкопатологии является воздействия на злокачественно перерожденные клетки азолопиридоиндолами, сопровождающееся прекращением неконтролируемого роста опухолевых клеток [Gour J. et al. Facile synthesis of 1, 2, 3-triazole-fused indolo-and pyrrolo [1,4] diazepines, DNA-binding and evaluation of their anticancer activity //Bioorganic chemistry. - 2019. - Т. 93. - С. 103306. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103306].

Термин мультиформная глиобластома был введен Кушингом во второй половине девятнадцатого века [Urbanska K. et al. Glioblastoma multiforme an overview // Contemporary Oncology/Wspolczesna Onkologia. - 2014. - Т. 18. - №. 5. - С. 307-312. doi: 10.5114/wo.2014.40559]. Сегодня глиомы составляют более 50% всех опухолей головного мозга и являются наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга у взрослых [Lefranc F., Brotchi J., Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis // Journal of clinical oncology. - 2005. - Т. 23. - №. 10. - С. 2411-2422. doi: 10.1200/JCO.2005.03.089]. Стандартная схема лечения глиобластом чаще всего включает темозоломид. Механизм действия препарата основан на присоединении соединения с алкильной группой к ДНК и, как следствие, нарушении структуры ДНК и невозможности деления злокачественной клетки [Friedman H.S., Kerby T., Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma // Clinical cancer research. 2000. - Т. 6. - №. 7. - С. 2585-2597; Zhang J., FG Stevens M., D Bradshaw T. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance // Current molecular pharmacology. - 2012. - Т. 5. - №. 1. С. 102-114. doi: 10.2174/1874467211205010102]. Однако, по меньшей мере, 50% пациентов, получающих темозоломид, не демонстрируют достаточной эффективности лечебных мероприятий. Это происходит, в первую очередь, из-за избыточной экспрессии Об-метилгуанин-метилтрансферазы и/или отсутствия пути репарации ДНК в клетках глиобластомы [Lee S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme // Genes & diseases. - 2016. - Т. 3. - №. 3. - С. 198 210. doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007]. Более того, темозоломид обладает рядом выраженных побочных эффектов, таких как тошнота, рвота, тромбоцитопения, нейтропения, миелодиспластический синдром и апластическая анемия [Dixit S. et al. Temozolomide-related idiosyncratic and other uncommon toxicities: a systematic review // Anti-cancer drugs. - 2012. - Т. 23. -№. 10. - С. 1099-1106.]. Необходим поиск противоопухолевых средств, позволяющих избегать интоксикации и вызывать иной путь запрограммированной гибели опухолевой клетки, обходя возникновение резистентности. Возможным вариантом подавления активности опухолевых клеток является применение соединений класса азолопиридоиндолов.

Значительная часть соединений, обладающих целевой структурой пиридо[1,2-а]индолов, обладает противоопухолевой активностью [Journal of Pharmaceutical Sciences;

vol. 27; nb. 2; (2019); p. 613; European Journal of Medicinal Chemistry; vol. 223; (2021); Art. No: 113656]. Между тем механизмы ингибирования опухолевого роста остаются неясными. Показана возможность влияния соединений близкой структуры на клеточный цикл в виде его остановки в фазах G2 и S с последующей индукцией апоптотических процессов [Iqbal J. et al. Exploration of quinolone and quinoline derivatives as potential anticancer agents //DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. - 2019. - Т. 27. - №. 2. - С. 613-626]. В работе [Zhidkov M. E., Sidorova M.A., Lyakhova I.A. One-step transformation of the marine alkaloid faspaplysins into homofaspaplysins B and B-1. The first syntheses of 3-bromohomofaspaplysins B and 3 bromohomofaspaplysins B-1 //Tetrahedron Letters. 2018. Т. 59. - №. 14. - С. 1417-1420] отмечается возможность влияния на метаболические внутриклеточные пути через пируватдегидрогеназу, управляющую митохондриальным образованием ацетил-КоА из пирувата одной из важнейших катаболических реакций клетки. Кроме того, описано действие соединений данного класса на активность белков, осуществляющих эпигенетическую регуляцию экспрессии генов [патент WO 2012/7007; (2012); (A1)]. Предполагается, что данные регуляторные системы могут иметь существенную роль в онтогенезе, эмбриогенезе, а также в механизмах канцерогенеза.

Поскольку в обозримой научной литературе не было обнаружено близкого подобия заявляемого изобретения, нами предлагается применение 10-(1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-а]индола 1 (Фиг. 1) в качестве избирательного ингибитора жизнедеятельности клеток злокачественных новообразований.

### 3. Сущность изобретения

Сущность изобретения заключается в применении соединения 1 для ингибирования клеток злокачественных новообразований в концентрации токсической для неопластических клеток человека и неэффективной для нормальных *in vitro*. Концентрация полу-максимального ингибирования составляет  $7,78 \pm 1,34 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$ ) для клеток глиобластомы (A-172), в то время как эффекта на нормальных клетках почки эмбриона человека (HEK-293) не наблюдается и  $\text{IC}_{50} > 128 \mu\text{M}$ , что подтверждено в плане эффективности и избирательности в дополнительных анализах с флуоресцентными красителями, такими как акридиновый оранжевый и этидия бромид, Annexin V-FITC/PI и JC-1.

### 4. Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Синтез соединения 1 был осуществлен по описанной ранее методике [Kopchuk D.S. et al. Studies on the interactions of 5-R-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazines with arynes: inverse demand aza-Diels Alder reaction versus aryne-mediated domino process // Organic and Biomolecular Chemistry. - 2018. -Т. 16. - С. 5119-5135. doi: 10.1039/c8ob00847g] посредством домино-трансформации исходного 3-(2-пиридил)-6-фенил-5-циано-1,2,4-триазина 2 в реакции с генерируемым *in situ* из антраниловой кислоты 1,2-дегидробензолом (Фиг. 1).

Последующая оценка биологической активности проводится посредством МТТ-теста, позволяющего определить токсическую дозу для опухолевых клеток при сохранении жизнедеятельности нормальных клеток на максимальном уровне; полученная концентрация используется для ингибирования клеток злокачественных новообразований *in vitro*.

4.1. Определение цитотоксичности и оценка избирательности действия 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-а]индола в отношении подавления жизнедеятельности клеток злокачественных новообразований

Исследования по заявляемому изобретению были выполнены на культивируемых клетках глиобластомы человека (A172, ATCC CRL 1620), карциномы легкого человека (A549, ATCC CCL 185), карциномы печени человека (HepG2, ATCC HB 8065) и почки

эмбриона человека (НЕК-293, ATCC CRL 1573), полученных из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Россия, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали с использованием среды DMEM/F-12 (Gibco,™ Thermo Fisher Scientific, USA) с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco,™ Thermo Fisher Scientific, USA) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности. Субкультивирование с применением раствора трипсина 0.25% (Biolut Ltd., St. Petersburg, Russia) проводили при достижении культурой ≥90% конfluenceности.

Влияние соединения 1 и его избирательность в отношении опухолевых клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета в посевной концентрации  $4 \times 10^3$  клеток на лунку за день до внесения вещества. Через 24 часа в лунки планшета вносили соединение в заданном диапазоне концентраций. Затем клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего в культуры вносили раствор МТТ (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) по 20 µL (5 mg/mL) на лунку. Через 2 часа из лунок удаляли среду и добавляли по 200 µL смеси ДМСО и изопропанола, 1:1. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре при длине волны 570 нм.

Статистическая обработка данных была проведена в программе RStudio (Version 2022.07.01 © 2009-2022 RStudio, PBC) с использованием пакета R (version 4.2.1.). Индекс цитотоксичности (IC<sub>50</sub>) рассчитан с построением кривых доза-эффект с помощью пакета «drc» [Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D. (2015) Dose-Response Analysis Using R PLOS ONE, 10(12), e0146021]. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка (SE).

Результаты МТТ-теста, представленные в табл. 1, показали выраженную избирательность соединения 1 в отношении ингибирования жизнедеятельности клеток злокачественных новообразований, в особенности против клеток глиобластомы A172 (Фиг. 2).

**Таблица 1.** Индекс цитотоксичности (IC<sub>50</sub>±SE) соединения 1 на клетках глиобластомы (A172), карциномы печени (HepG2), карциномы легкого (A549) и почки эмбриона человека (НЕК-293).

Клеточная линия	IC <sub>50</sub> ± SE, µM
A172	7,78 ± 1,34
A549	21,93 ± 2,27
HepG2	12,79 ± 1,97
НЕК-293	>128

Построение кривых ингибирования клеточного роста (Фиг. 3) позволила подтвердить избирательность соединения 1 в отношении клеток опухолевого генеза и установить концентрацию/дозу подавления жизнеспособности клеток глиобластомы A172 при которой большая часть неопластических клеток погибает, а нормальные клетки сохраняют свою жизнеспособность. Цитотоксическая доза составила 16 µM.

4.2. Подтверждение избирательности действия 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-*a*]индола посредством флуоресцентного окрашивания клеточных культур

Для оценки клеточной гибели при воздействии выбранной концентрации использовали метод окрашивания смесью флуоресцентных красителей витального акридинового оранжевого (АО) и этидия бромид (ЭБ) в концентрациях 5 мкг/мл и 15 мкг/мл

соответственно. Культуры клеток рассаживали в чашки Петри за день до внесения исследуемого вещества и инкубировали. Затем вносили суспензию соединения 1 в культуральной среде в концентрации 16  $\mu\text{M}$ . Клетки инкубировали в течение 24 часов. Далее клетки снимали и осаждали для каждого образца в центрифуге при 200g 5 мин. Осадок ресуспендировали в 25 мкл фосфатного буфера, имеющего температуру от +25°C и к полученной суспензии, добавляли 25 мкл свежеприготовленной смеси ЭБ и АО. Сразу же после этого по 10 мкл окрашенной суспензии клеток помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и незамедлительно анализировали под флуоресцентным микроскопом XDS-3FL4 (ОПТИКА, Италия).

Проведение окрашивания линии A172 и линии НЕК-293 смесью флуоресцентных красителей акридинового оранжевого (АО) и этидия бромида (ЭБ) после суточного воздействия на них соединения 1 в концентрации 16  $\mu\text{M}$  подтвердило избирательность воздействия соединения на опухолевые клетки глиобластомы (Фиг. 4).

Результаты подсчета клеток представлены в Табл. 2. Суточная инкубация линии A172 с соединением 1 приводила к гибели 21% клеток, в то время как в контрольной пробе 97% клеток сохраняли свою жизнеспособность. На линии нормальных клеток НЕК-293 не наблюдалось выраженных различий между контрольной пробой и пробой, обработанной 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-а]индолом (99% и 94% живых клеток соответственно).

**Таблица 2.** Окрашивание клеток линии глиобластомы (A172) и почки эмбриона человека (НЕК-293) смесью флуоресцентных красителей (АО и ЭБ) после 24 часов инкубации с соединением 1 в концентрации 16  $\mu\text{M}$

Клеточная линия	АО+ клетки	ЭБ+ клетки	Апоптотические тельца	Общее количество клеток	% погибших клеток
A172*	331	63	26	420	21
A172**	307	7	4	318	3
НЕК-293**	335	4	0	339	1
НЕК-293*	326	16	4	346	6

\*обработанные пробы; \*\*контрольные пробы без обработки

4.3. Определение запуска программируемой клеточной гибели (апоптоза) в злокачественно перерожденных клетках под действием 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-а]индола

Для оценки апоптоза в клеточных культурах был использован метод окрашивания клеток а Annexin V-FITC и пропидием йодидом (PI), который был проведен в соответствии с протоколом производителя (G1511, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай): осадок клеток ресуспендировали в 25 мкл 1x связывающего буфера, имеющего температуру от +8°C и к полученной суспензии добавляли по 2,5 мкл каждого из флуоресцентных красителей (Annexin V-FITC и PI). После 10 минут выдержки в темноте, 10 мкл окрашенной суспензии клеток помещали в одноразовый слайд и вели подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток C100 (RWD Life Science, Китай).

Оценка апоптоза в клеточных культурах позволила выявить значительное количество клеток глиобластомы в раннем апоптозе после их инкубации с соединением 1 (24 ч.) в

концентрации 16  $\mu\text{M}$ , что подтверждает свойства соединения ингибировать рост клеток злокачественного генеза, в то время как в контрольных пробах без обработки клетки сохраняли свою жизнеспособность на максимальных уровнях (Фиг. 5). Результаты подсчета клеток с помощью автоматического счетчика представлены в Табл. 3.

**Таблица 3.** Окрашивание клеток линии глиобластомы (A172) и почки эмбриона человека (HEK-293) смесью флуоресцентных красителей (Annexin V-FITC и PI) после 24 часов инкубации с соединением **1** в концентрации 16  $\mu\text{M}$

Клеточная линия	Annexin V+ клетки	PI+ клетки	(Annexin V/PI)- клетки	Общее количество клеток
A172*	392 (56%)	86 (12 %)	221 (32%)	699
A172**	32 (5%)	22 (3%)	592 (92%)	646

\*обработанные пробы; \*\*контрольные пробы без обработки

4.4. Определение влияния 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо [1,2-*a*]индола на трансмембранный потенциал митохондрий в неопластических клетках

Определение трансмембранного потенциала ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) митохондрий проводили с использованием красителя JC-1 (5,5',6,6' тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол-карбоцианин йодид) согласно протоколу производителя (G1515-100T, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай).

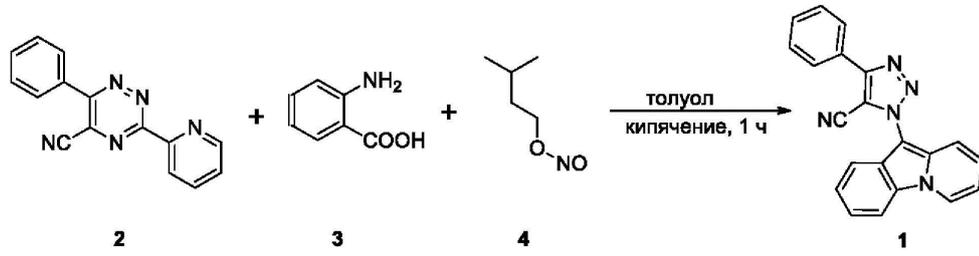
Исследование митохондриального потенциала клеток под действием соединения **1** с применением красителя JC-1 показало, что клетки опухолевой линии теряют свой митохондриальный потенциал под действием вещества по уровню практически сопоставимому с положительным контролем. И в то же время соединение **1** практически не действует на митохондриальный потенциал клеток нормальной линии человека (Фиг. 6).

Представленные исследования свидетельствуют о применимости соединения **1** в качестве агента для избирательного ингибирования жизнедеятельности клеток злокачественных новообразований. Использованное решение обладает преимуществом перед существующими аналогами в связи с уникальностью структуры соединения **1** и его выраженной активностью в отношении неопластических клеток в сравнении с нормальными.

#### (57) Формула изобретения

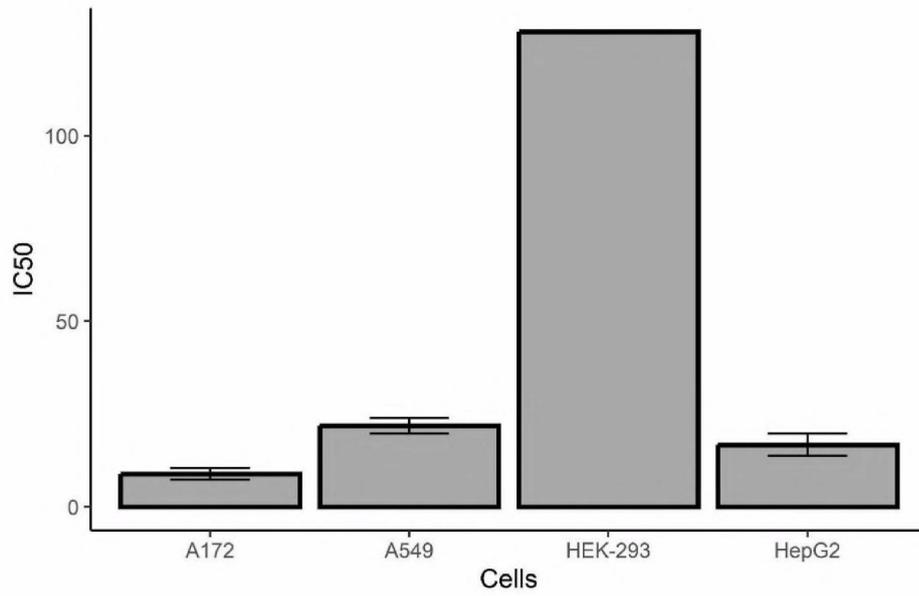
Применение 10-(4-фенил-5-циано-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пиридо[1,2-*a*]индола в качестве противоопухолевого агента в концентрации 16  $\mu\text{M}$ , являющейся токсической для неопластических клеток и безопасной для нормальных клеток человека *in vitro*.

1

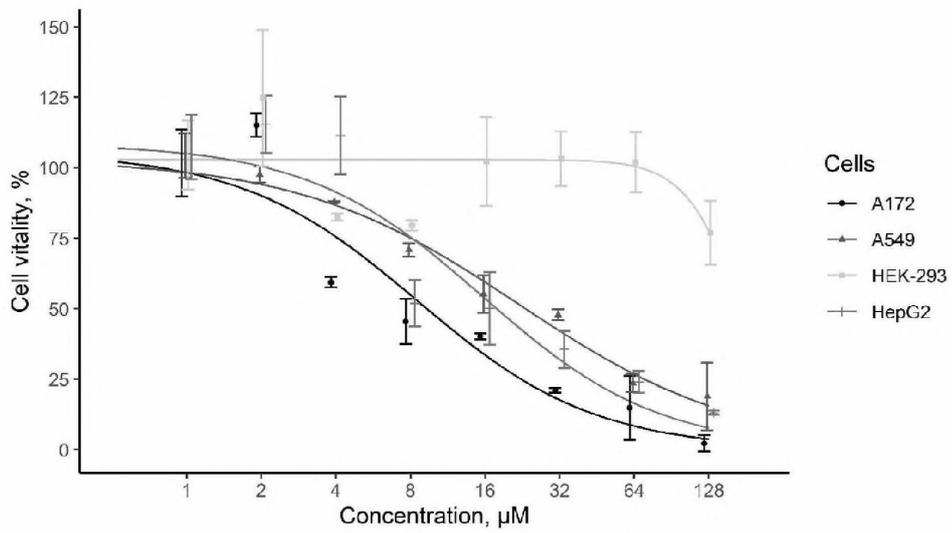


Фиг. 1

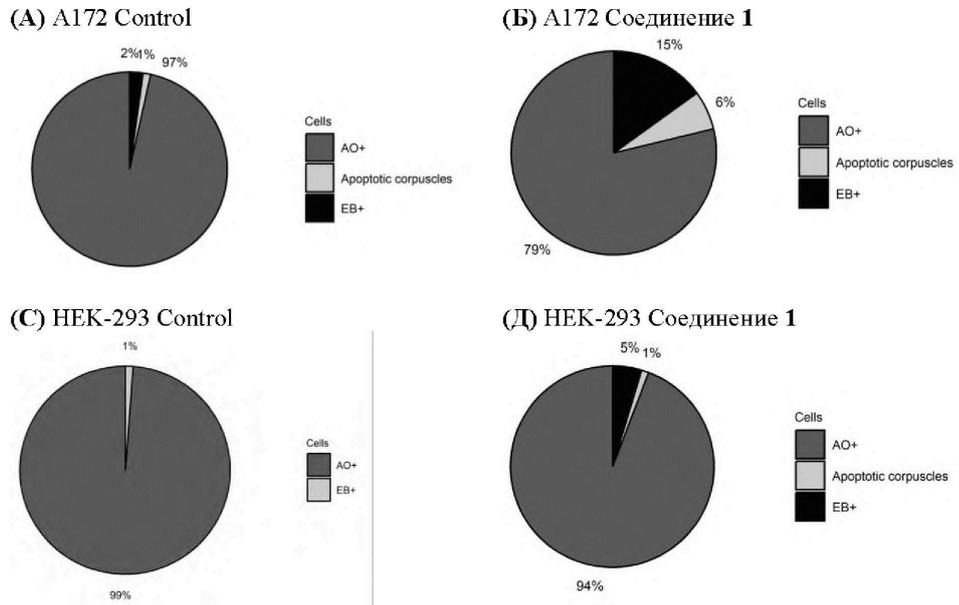
2



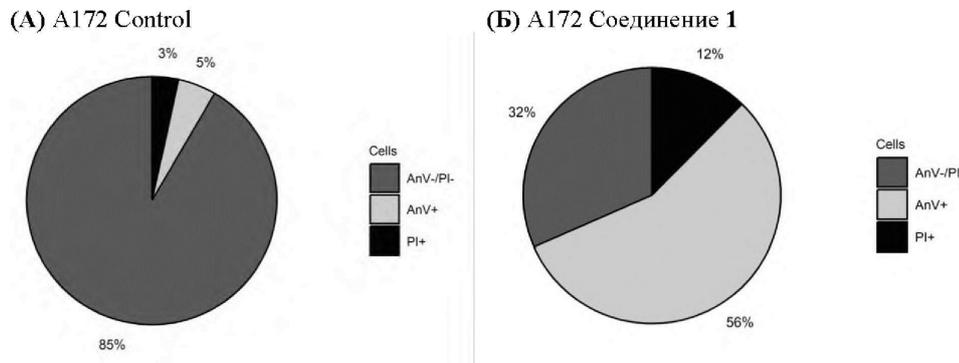
Фиг. 2



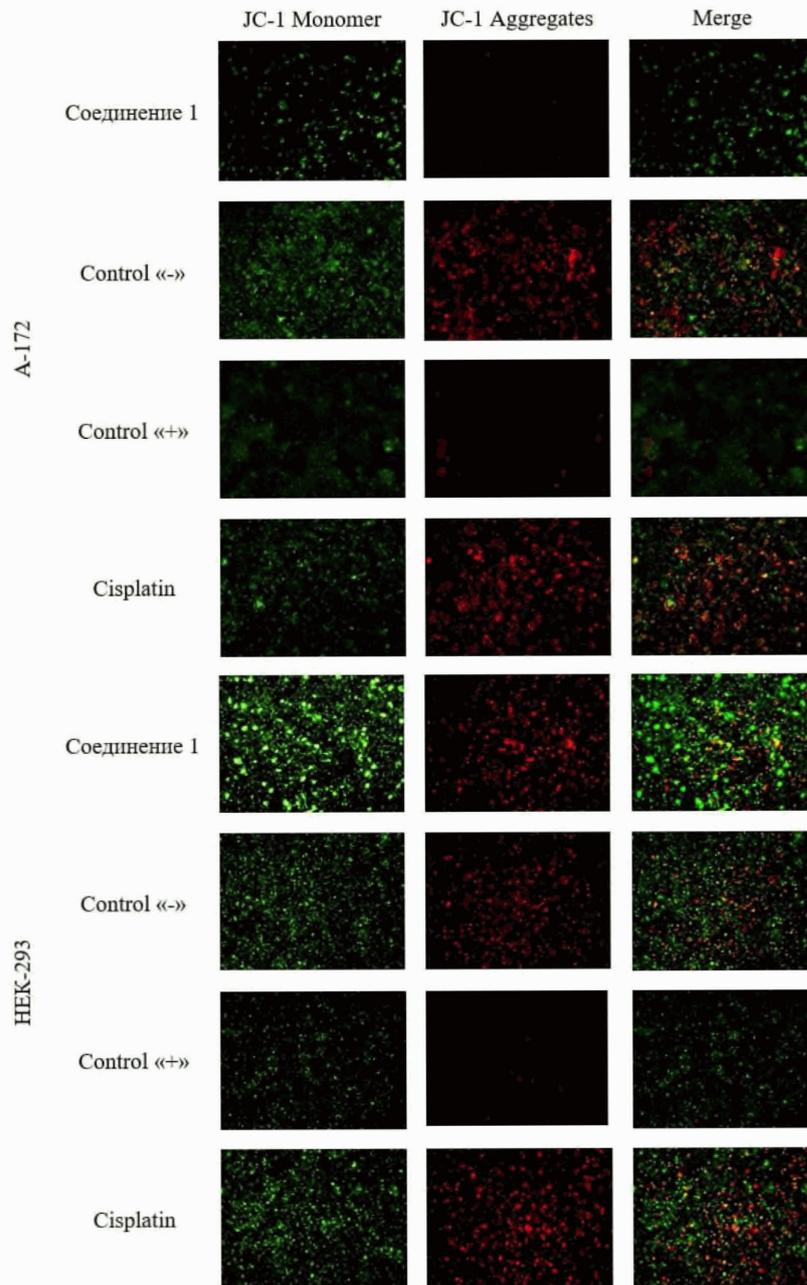
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6