



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115749** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 00869	(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Суховєєв Олександр Володимирович (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.01.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.12.2017	
(41) Публікація відомостей про заявку: 28.08.2017, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ежена Потьє, 14, м. Київ, 03680 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.12.2017, Бюл.№ 23	(74) Представник: Шаповаленко Світлана Лазарівна
	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 73591 U; 25.09.2012 UA 106682 C2; 25.09.2014 SYNTHESIS, STRUCTURE, AND PROPERTIES OF 1-(p-R-PHENACYL)-2-(p-METHOXYBENZYLAMINO)PYRIDINIUM BROMIDES/ Demchenko, A. M.; Chumakov, V. A.; Nazarenko, K. G.; Krasovskii, A. N.; Pirozhenko, V. V.; Lozinskii, M. O.// Khimiya Geterotsiklicheskih Soedinenii, 1995, № 5, p. 644 – 649

(54) БРОМІД 3-ГІДРОКСИ-1,3-БІС-(41-МЕТОКСИФЕНІЛ)-2,3,5,6,7,8-ГЕКСАГІДРОІМІДАЗО[1,2-а]ПІРИДИНІЮ, ЩО МАЄ ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ

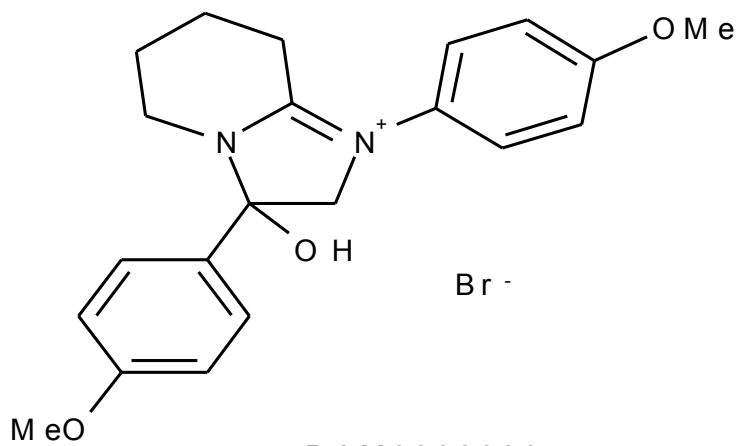
(57) Реферат:

Бромід 3-гідрокси-1,3-біс-(4'-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімід-азо[1,2-а]піридинію, що має протипухлинні властивості.

Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини. Заявлена сполука може бути використана при лікуванні раку товстого кишківника та меланому. Визначення протипухлинної активності броміду 3-гідрокси-1,3-біс-(4'-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію проведено in vitro на 60 лініях ракових клітин при дії речовини в концентраціях 10^{-4} - 10^{-8} моль/л за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності, виконаних у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program.

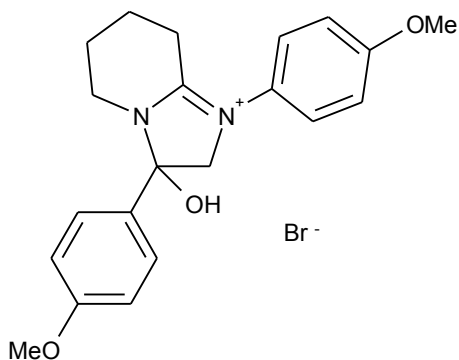
UA 115749 C2

UA 115749 C2



DAM0002990

Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активного броміду 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990), що має формулу:



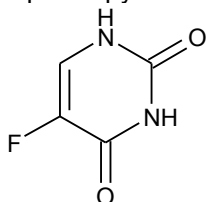
DAM0002990

5 Зазначена сполука проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні раку товстого кишечника (щодо клітин COLO 205) та меланому (щодо клітин SK-MEL-5).

Фармакотерапія пухлинної патології є найважливішою складовою у боротьбі з онкологічними захворюваннями. За останні роки вона збагатилась численними новими препаратами, що збільшують її ефективність та безпечність [1]. За даними ВООЗ, щороку з'являється понад 10 млн. нових онкохворих. Ризик розвитку онкологічних захворювань становить 27,7 % для чоловіків і 18,5 % для жінок. Злоякісні новоутворення вражають в Україні кожного четвертого чоловіка і кожну шосту жінку. [2]. Тому розробка нових протибластомних засобів є нагальною проблемою сучасної фармацевтичної хімії.

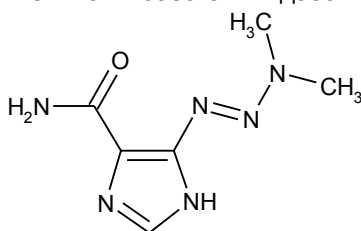
15 Усі протипухлинні препарати поділяють на ряд груп залежно від їх джерел отримання, хімічної структури та механізму дії. Так, протибластомні синтетичні засоби включають алкілюючі засоби та антиметаболіти. До алкілюючих належать похідні хлоретиламіну (наприклад, допан, сарколізин, циклофосфан); похідні етиленіміну (бензотеф, тіофосфамід, фторбензотеф); похідні метансульфонової кислоти (мієлосан, мієлобромол); похідні нітрозосечовини (нітрозометилсечовина) та сполуки платини (цисплатин). До антиметаболітів - антагоністи фолієвої кислоти (метотрексат); антагоністи пурину (меркаптопурин) та антагоністи піримідину (фторурацил, фторафур) [1].

20 Еталоном для порівняння протипухлинної активності заявленої сполуки використано препарат з групи антагоністів - 5-фторурацил:



25 Він пригнічує процес ділення ракових клітин, блокуючи синтез ДНК. Цей препарат пригнічує ріст і розвиток пухлин, а також гемопоєз. Його використовують при лікуванні меланому, раку товстого кишечника, прямої кишки, раку молочної залози, шлунку, печінки, карциноми ендометрії, раку яєчників та сечового міхура. Побічною дією цього препарату є: пригнічення кровотворення, центральної нервової системи, порушення серцево-судинної, травної та репродуктивної систем, дерматологічні та алергічні реакції [3].

30 Аналогом за структурою є похідне імідазолу протипухлинний засіб детіцен (дакарбазин) або 5-диметиламіноазо-3Н-імідазол-4-карбоксамід:

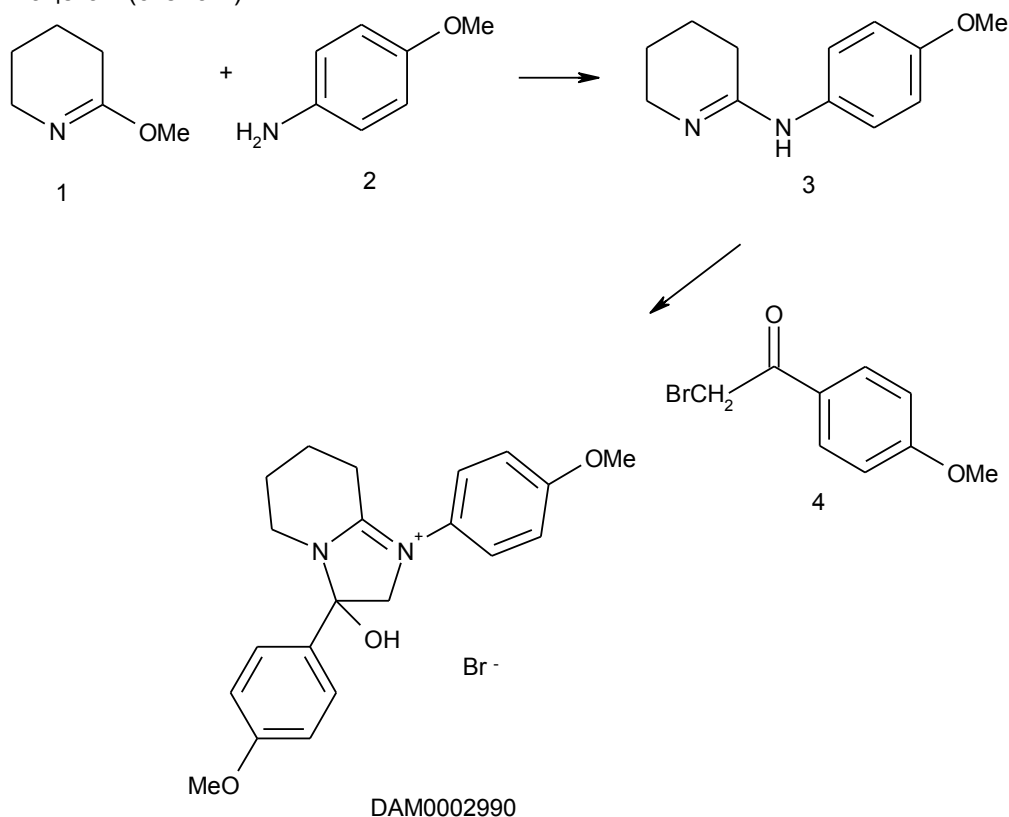


Він виявляє активність проти метастатичної меланоми, лімфогранулематозу, саркоми матки, раку легенів та щитовидної залози [4]. Застосування дієтичної добавки може спричиняти диспептичні явища (нудота, блювота, діарея, болі в животі), анорексію, стоматит, ураження печінки, включаючи гепатоцелюлярний некроз і тромбоз печінкових вен; оніміння та гіперемію обличчя, алопецію, гіпоплазію кісткового мозку, гриппоподібний синдром, суперінфекцію, алергічні реакції; почервоніння і хворобливість у місці введення тощо [5].

В основу винаходу поставлена задача пошуку нової речовини, що проявляє високу протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин раку товстого кишечника COLO 205 та меланоми SK-MEL-5.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу нової хімічної речовини бромиду 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990).

Заявлену сполуку одержують з високими виходами шляхом конденсації 6-метокси-2,3,4,5-тетрагідропіридину 1 [6] з пара-анізином 2 та подальшої циклізації проміжного (4-метоксифеніл)-(3,4,5,6-тетрагідропіридин-2-іл)аміну 3 з α -бром-4-метоксифенілацетофеноном 4 в етилацетаті (схема 1):



Приклади конкретного виконання.

Приклад 1

Бромід 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990): Суміш 5.65 г (0,05 моль) 6-метокси-2,3,4,5-тетрагідропіридину 1 та 6.15 г (0,05 моль) пара-анідину 2 кип'ятили зі зворотним холодильником в 100 мл сухого толуєну дві години. Після цього реакційну суміш упарили досуха, кристалізували з пропанолу-2. Вихід - 7.04 г (69 %). $T_{пл.} = 105-107^{\circ}C$ [7]. До розчину 2.04 г (0.01 моль) одержаного (4-метоксифеніл)-(3,4,5,6-тетрагідропіридин-2-іл)аміну 3 в 50 мл етилацетату додавали 2.29 г (0.01 моль) α -бром-4-метокси-фенілацетофенону 4 і кип'ятили зі зворотним холодильником протягом однієї години. Після чого осад, що утворився, відфільтрували та кристалізували із пропанолу-2. Вихід - 3.42 г (79 %). $T_{пл.} = 233-4^{\circ}C$. Знайдено, %: N=6.37 Br=18.3 $C_{21}H_{25}BrN_2O_3$. Вирахувано, %: N=6.46 Br=18.5. Спектр ПМР (ДМСО-d₆, ТМС): 1.79 (м, 4Н, CH₂CH₂), 2.63 та 2.71 (м+м, 2Н, 8-CH₂), 2.88 та 3.32 (м+м, 2Н, 5-CH₂), 3.81 (с, 3Н, OCH₃), 3.82 (с, 3Н, OCH₃), 4.28 (д-д, 2Н, 2-CH₂, J=12.6 Гц), 7.04 та 7.64 (д-д, 4Н, C₆H₄), 7.11 та 7.67 (д-д, 4Н, C₆H₄) 7.92 (с, 1Н, OH).

Приклад 2

Протипухлинна активність бромиду 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990) вивчалась у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program.

Перший етап фармакологічного скринінгу (пре-скринінг) полягав у дослідженні протипухлинної активності сполук *in vitro* на лініях ракових клітин (лейкемії, меланоми, раку легень, товстого кишечника, ЦНС, яєчників, нирок, простати, молочної залози) при дії речовини в концентрації 10^{-5} моль/л за стандартною процедурою [8] оцінки мітотичної активності нових потенційних біологічно активних сполук методом флуоресцентного зафарбування (барвник - сульфородамін Б). Результат проведених досліджень виражали у відсотках росту клітин раку у порівнянні з контролем - 5-флуорурацилом. Наведені у таблиці значення показують на скільки досліджувані сполуки є більш ефективними у пригніченні росту ракових клітин у порівнянні з контролем.

Визначення проводили високочутливим флюорометричним методом, кількісно оцінюючи інтенсивність кольору флуоресцентного випромінювання (барвник - сульфородамін Б) через 48 год. опромінення клітини зі сполукою, що тестується. Використана система відбору та вивчення сполук з потенційною протипухлинною активністю *in vitro* базується на визначенні відсотку росту клітин пухлини (PG) під впливом сполуки, що тестується.

В умовах експерименту заявлена сполука (DAM0002990) у концентрації 10^{-5} моль/л виявила здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплює практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл.).

Таблиця

Протипухлинна активність броміду 3-гідрокси-1,3-біс-(4'-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990) *in vitro* на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л та поглибленого *in vitro* скринінгу у градієнті концентрацій 10^{-4} - 10^{-8} М

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності DAM0002990			
		Мітотична активність, %	IgGI ₅₀	IgTGI	IgLC ₅₀
Лейкемія	CCRF-CEM	63.76	-5.02	>-4.00	>-4.00
	HL-60(TB)	16.71	-5.77	-4.68	>-4.00
	K-562	40.17	-5.58	-4.00	>-4.00
	MOLT-4	58.43	-4.92	-4.00	>-4.00
	RPMI-8226	22.27	-6.00	-4.22	>-400
	SR	61.13	-5.38	-4.00	>-400
Дрібноклітинний рак легенів	A549/ATCC	55.40	-5.22	-4.00	>-4.00
	HOP-62	91.75	-4.32	-4.00	>-4.00
	HOP-92	74.28	-6.07	-4.74	>-4.00
	NCI-H226	80.12	-4.63	-4.00	>-4.00
	NCI-H23	39.72	-5.48	-4.00	>-400
	NCI-H322M	97.79	-4.53	-4.00	>-400
	NCI-H460	82.24	-4.92	-4.00	>-4.00
	NCI-H522	53.46	-5.09	-4.02	>-4.00
Рак товстого кишечника	COLO 205	49.78	-5.35	-4.70	-4.19
	HCC2998	69.09	-5.55	>-4.00	>-400
	HCT-116	57.59	-5.32	>-4.00	>-4.00
	HCT-15	102.64	>-4.00	>-4.00	>-4.00
	HT-29	70.38	-4.87	>-4.00	>-4.00
	KM12	51.76	-5.53	>-4.00	>-4.00
	SW-620	100.11	-4.73	>-4.00	>-4.00
Рак головного мозку	SF-268	81.05	-4.76	>-4.00	>-4.00
	SF-295	-	-4.81	-4.21	>-4.00
	SF-539	89.65	-4.96	>-4.00	>-4.00
	SNB-19	-	-5.04	>-4.00	>-4.00
	SNB-75	64.15	-5.24	>-4.00	>-4.00
	U251	54.82	-5.38	>-4.00	>-4.00
Меланома	LOXIMVI	71.52	-4.95	>-4.00	>-4.00
	MALME-3M	-	-5.11	-4.08	>-4.00
	M14	84.05	-4.74	>-4.00	>-4.00
	MDA-MB-435	65.49	-5.42	-4.26	>-400
	SK-MEL-2	64.50	-4.92	-4.22	>-4.00

Таблиця

Протипухлинна активність броміду 3-гідрокси-1,3-біс-(4'-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідромідазо[1,2-а]піридинію (DAM0002990) *in vitro* на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л та поглибленого *in vitro* скринінгу у градієнті концентрацій 10^{-4} - 10^{-8} М

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності DAM0002990			
		Мітотична активність, %	IgGI ₅₀	IgTGI	IgLC ₅₀
	SK-MEL-28	68.92	-4.69	>-4.00	>-4.00
	SK-MEL-5	28.97	-5.57	-4.81	-4.17
	UACC-257	35.51	-5.67	-4.72	>-4.00
	UACC-62	61.82	-5.31	>-4.00	>-4.00
Рак яєчників	IGROV1	67.55	-4.96	>-4.00	>-4.00
	OVCAR-3	51.07	-5.43	>-4.00	>-4.00
	OVCAR-4	66.30	-5.84	>-4.00	>-4.00
	OVCAR-5	99.10	-4.36	>-4.00	>-4.00
	OVCAR-8	83.71	-1.96	>-4.00	>-4.00
	NCI/ADR-RES	106.01	>-4.00	>-4.00	>-4.00
	SK-OV-3	82.78	-4.48	>-4.00	>-4.00
Рак нирок	786-0	87.41	-4.38	>-4.00	>-4.00
	A498	83.28	-5.20	>-4.00	>-4.00
	ACHN	91.92	-4.15	>-4.00	>-4.00
	CAKI-1	103.09	>-4.00	>-4.00	>-4.00
	RXF393	107.39	-4.71	>-4.00	>-4.00
	SN12C	73.35	-4.89	>-4.00	>-4.00
	TK-10	93.68	-4.37	>-4.00	>-4.00
	UO-31	98.55	>-4.00	>-4.00	>-4.00
Рак простати	PC-3	74.87	-5.09	>-4.00	>-4.00
	DU-145	95.77	-5.54	>-4.00	>-4.00
Рак молочної залози	MCF7	37.78	-5.38	>-4.00	>-4.00
	MDA-MB-231/ATCC	86.26	-4.73	>-4.00	>-4.00
	HS 578T	90.51	-4.58	>-4.00	>-4.00
	BT-549	57.61	-5.36	>-4.00	>-4.00
	T47D	29.28	-5.59	>-4.00	>-4.00
	MDA-MB-468	10.26	-6.44	-5.16	>-4.00

Відповідно до табл. 1, сполука, за заявляється, перевищує еталон на 55 лініях ракових клітин з 60, що досліджувалися. Найбільш ефективною вона виявилася відносно клітин лейкемії HL-60(TB) та RPMI-8226 (перевищує дію 5-фторурацилу на 83,29 % та 77,73 % відповідно), дрібноклітинного раку легенів NCI-H23 (перевищує дію 5-фторурацилу на 60,28 %), раку товстого кишечника COLO 205 (перевищує дію еталону на 50,22 %), меланоми SK-MEL-5 та UACC-257 (перевищує дію 5-фторурацилу на 71,03 % та 64,49 % відповідно) та клітин раку молочної залози MCF7, T47D і MDA-MB-468 перевищує дію 5-фторурацилу на 62,22 %, 70,72 % та 89,74 % відповідно.

На другому етапі досліджень, або поглибленому *in vitro* скринінгу, сполука (DAM0002990) тестувалась у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M та 0,01 μ M) на перелічених лініях ракових клітин людини. У результаті експерименту розраховано три дозозалежні параметри, а саме: GI₅₀ - концентрація сполуки, яка викликає пригнічення росту 50 % клітин лінії; TGI - концентрація, що створює повне пригнічення росту клітин; LC₅₀ - концентрація, яка викликає загибель 50 % пухлинних клітин. GI₅₀ інтерпретовано як ефективний рівень інгібування, TGI - як цитостатичний ефект, а LC₅₀ - летальна концентрація, що характеризує цитотоксичну дію. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів (IgGI₅₀, IgTGI та IgLC₅₀) є меншими ніж -4,00, то сполука вважається активною [9-11].

Згідно результатів скринінгу тестована сполука проявила значний рівень протиракової активності щодо клітин раку товстого кишечника COLO 205 (значення IgGI₅₀ складає -5.35, IgTGI дорівнює -4.70, а IgLC₅₀ = -4.19) та меланоми SK-MEL-5 (IgGI₅₀ = -5.57, IgTGI = -4.81 та IgLC₅₀ = -4.17).

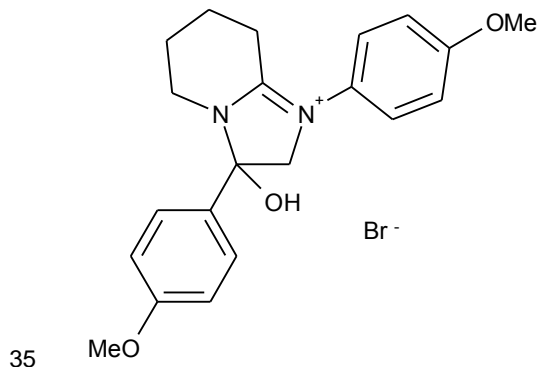
Таким чином, запропонована нова біологічно активна сполука, яка може бути потенційним протипухлинним засобом для лікування клітин раку товстого кишечника COLO 205 та меланоми SK-MEL-5.

Джерела інформації:

- 5 1. Протипухлинні (протибластомні) лікарські засоби. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: http://pidruchniki.com/68392/meditsina/protipuhlinni_protiblastomni_likarski_zasobi - Назва з екрану.
2. Статистика онкологічних захворювань в Україні. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://diapharma.ua/articles/statistika-onkologichnih-zahvoryuvan-v-ukrayini> - Назва з екрану.
3. 5-Фторурацил. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/5%D0%A4%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%83%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BB> - Назва з екрану.
- 10 4. Dacarbazine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dacarbazine> - Назва з екрану.
5. Детицен. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://medinstrukciya.ru/content/detitsen> - Назва з екрану.
- 15 6. Calas, Michele; Ouattara, Mahama; Piquet, Gilles; Ziora, Zyta; Bordat; Ancelin, Marie L.; Escale, Roger; Vial, Henri // Journal of Medicinal Chemistry-2007-vol. 50; nb. 25; p. 6307-6315
7. Javorsky P. Synthesis and pesticidal activity of the substituted 3-(1-aza-1-cycloalken-2-yl)-3-phenyl-1-methylureas/ P. Javorsky, Z. Vesela, S. Tuchlik // Chem. Zvesti. - 1978. - Vol. 32 (2). - P. 223-231.
- 20 8. Teicher B.A. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical / B.A. Teicher, P. A. Andrews. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.
9. Alley M.C. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture Tetrazolium assay / M.C. Alley, D.A. Scudiero, P.A. Monks et al. // Cancer Res. - 1988. - Vol. 48. - P. 589-601.
- 25 10. Carter P H. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF- α / P H. Carter, P.A. Scherle, J.A. Muckelbauer et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2001. - Vol. 98. - P. 11879-11886.
11. Grever M.R. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program / M.R. Grever, S.A. Schepartz, B.A. Chabner // Seminars in Oncol. - 1992. - Vol. 19, № 6. - P. 622-638.
- 30

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Бромід 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію



що має протипухлинні властивості.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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

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