



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117497** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

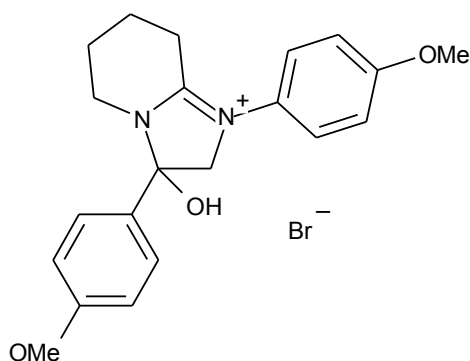
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00868	(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Сухоусєв Олександр Володимирович (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.01.2017	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ежена Потьє, 14, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.06.2017	(74) Представник: Шаповаленко Світлана Лазарівна
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.06.2017, Бюл.№ 12	

(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:

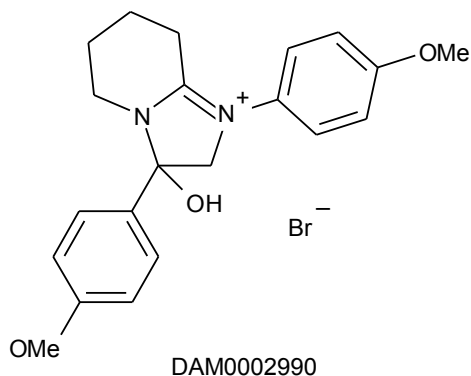
Бромід 3-гідрокси-1,3-біс-(4¹-метоксифеніл)-2,3,5,6,7,8-гексагідроімідазо[1,2-а]піридинію



що має протипухлинні властивості.

UA 117497 U

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

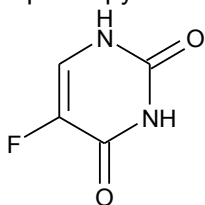


Зазначена сполука проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні раку товстого кишечника (щодо клітин COLO 205) та меланоми (щодо клітин SK-MEL-5).

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.

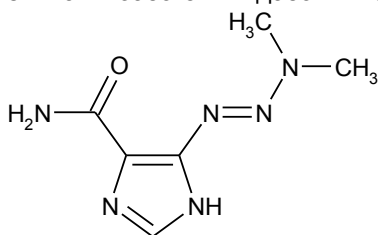
Усі протипухлинні препарати поділяють на ряд груп залежно від їх джерел отримання, хімічної структури та механізму дії. Так, протибластомні синтетичні засоби включають алкілюючі засоби та антиметаболіти. До алкілюючих належать похідні хлоретиламіну (наприклад, допан, сарколізин, циклофосфан); похідні 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].

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



Він пригнічує процес ділення ракових клітин, блокуючи синтез ДНК. Цей препарат пригнічує ріст і розвиток пухлин, а також гемопоєз. Його використовують при лікуванні меланоми, 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].

Відомим аналогом є похідне імідазолу протипухлинний засіб детіцен (дакарбазин) або 5-диметиламіноазо-3H-імідазол-4-карбоксамід:



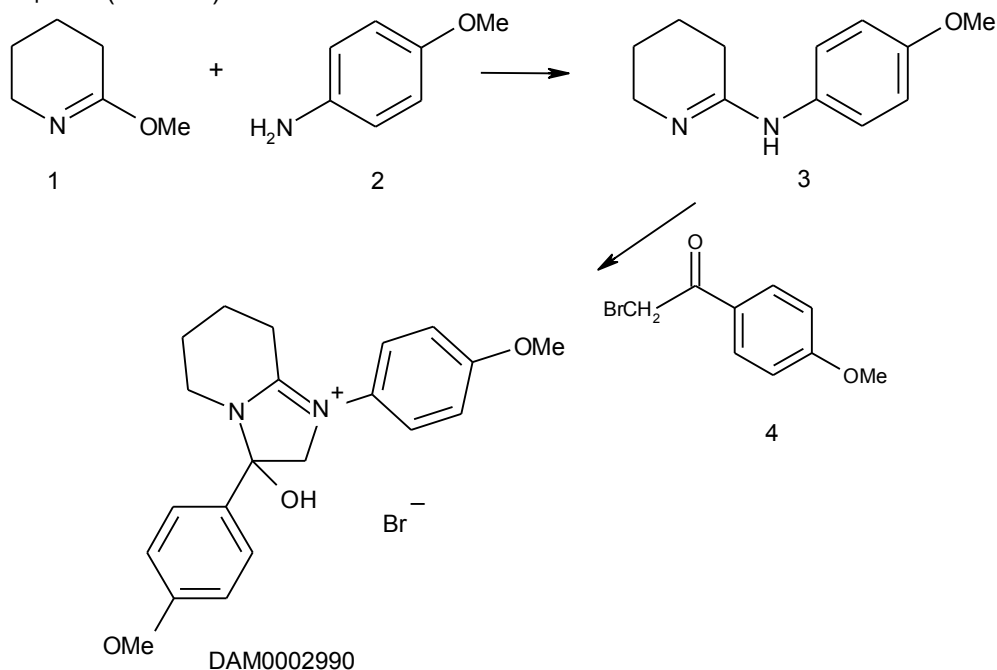
Він виявляє активність проти метастатичної меланоми, лімфогранулематозу, саркоми матки, раку легень та щитовидної залози [4].

Застосування дітицену 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, грипоподібний синдром, суперінфекцію, алергічні реакції; почервоніння і хворобливість у місці введення тощо [5].

В основу корисної моделі 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 тим, що синтез нової хімічної речовини броміду 3-гідроксі-1,3-біс-(4'-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-гідроксі-1,3-біс-(4'-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 до суха, 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 (DMCO-d₆, TMC): 1.79 (м, 4H, CH₂CH₂), 2.63 та 2.71 (м+м, 2H, 8-CH₂), 2.88 та 3.32 (м+м, 2H, 5-CH₂), 3.81 (с, 3H, OCH₃), 3.82 (с, 3H, OCH₃), 4.28 (д-д, 2H, 2-CH₂, J=12.6 Гц), 7.04 та 7.64 (д-д, 4H, C₆H₄), 7.11 та 7.67 (д-д, 4H, C₆H₄) 7.92 (с, 1H, OH).

Приклад 2. Протипухлинна активність броміду 3-гідроксі-1,3-біс-(4'-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.

5 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.

10 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. 1).

Таблиця 1

Протипухлинна активність броміду 3-гідроксі-1,3-біс-(4¹-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, %	Ig GI ₅₀	Ig TGI	Ig LC 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	>-4.00
	SR	61.13	-5.38	-4.00	>-4.00
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	>-4.00
	NCI-H322M	97.79	-4.53	-4.00	>-4.00
	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	>-4.00
	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	LOX IMVI	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	>-4.00
	SK-MEL-2	64.50	-4.92	-4.22	>-4.00
	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

Продовження таблиці 1

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	-4.96	>-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
	RXF 393	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
	U 0-31	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 01 μ M) на перелічених лініях ракових клітин людини. У результаті експерименту розраховано три дозозалежні параметри, а саме: GI_{50} - концентрація сполуки, яка викликає пригнічення росту 50 % клітин лінії; TGI - концентрація, що створює повне пригнічення росту клітин; LC_{50} - концентрація, яка викликає загибель 50 % пухлинних клітин. GI_{50} інтерпретовано як ефективний рівень інгібування, TGI - як цитостатичний ефект, а LC_{50} - летальна концентрація, що характеризує цитотоксичну дію. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів ($lgGI_{50}$, $lgTGI$ та $lgLC_{50}$) 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 $lgGI_{50}$ складає -5.35, $lgTGI$ дорівнює -4.70, а $lgLC_{50}$ = -4.19) та меланоми SK-MEL-5 ($lgGI_{50}$ = -5.57, $lgTGI$ = -4.81 та $lgLC_{50}$ = -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:

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.

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.

6. Calas, Michele; Ouattara, Mahama; Piquet, Gilles; Ziora, Zyta; Bordat; Ancelin, Marie L.; Escalé, 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.

8. Teicher B.A. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical / B.A. Teicher, P. A. Andrews. - Medical.-2004. - V. 1.-450 p.

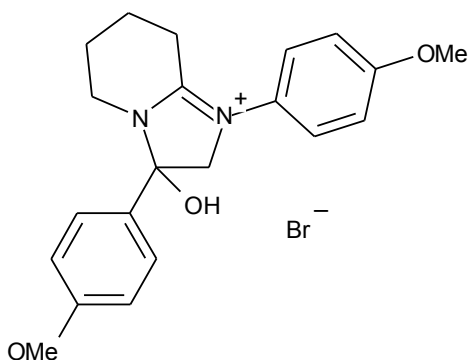
9. Alley M.C. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture Tetrazolium assay / M.C. Alley, D.A. Scudiero, P.A. Monks et al. // Cancer Res.-1988. - Vol. 48. - P. 589-601.

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.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

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 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