



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121779** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 487/00
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

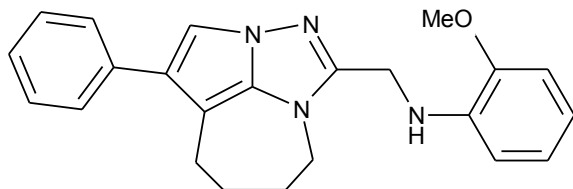
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 07644	(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA), Бухтіарова Тетяна Анатоліївна (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.07.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.12.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.12.2017, Бюл.№ 23	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ежена Потьє, 14, м. Київ, 03680 (UA)

(54) **1-(2¹-МЕТОКСИФЕНІЛ)АМІНОМЕТИЛ-4-ФЕНІЛ-5,6,7,8-ТЕТРАГІДРО-2,2а,8а-ТРИАЗАЦИКЛОПЕНТА[cd]АЗУЛЕН, ЩО МАЄ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ**

(57) Реферат:

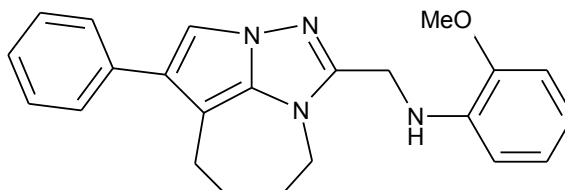
1-(2¹-Метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[cd]азулен:



має протипухлинну активність.

UA 121779 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активного 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену, який проявляє виражену протипухлинну активність.

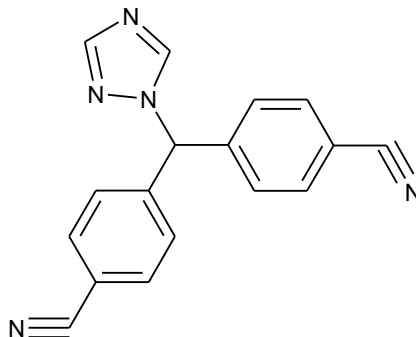


На сьогодні для лікування пухлинної хвороби та досягнення паліативного ефекту, що призводить до зменшення пухлини і відповідно до клінічної ремісії, застосовують понад 50 протипухлинних препаратів, активних при різних формах злоякісних утворень. Відомі протипухлинні препарати з різними механізмами дії застосовують в схемах лікування. При цьому виражений клінічний ефект складає від 20 % до 80 %, в окремих випадках ремісія до 2 років, понад 10 % хворих мають ремісію понад 3 роки. Широке застосування набули циклофосфан, метатрек-сат, вінкрестин, адриабластин [1]. Метотрексат у зв'язку з антифоліатним ефектом пригнічує клітинний мітоз, гальмує ріст злоякісних новоутворень та є більше активним по відношенню до клітин, що швидко ростуть. Адриаміцин на сьогодні є єдиним цитостатиком, що проявляє деяку активність по відношенню до печінково-клітинної карциноми (лікувальний ефект складає 3-70 %, найчастіше 36,5 %). Застосуванню цитостатичних препаратів перешкоджає механізм лікарської мультирезистентності.

Вказані лікарські засоби мають необхідні лікувальні властивості, але проявляють значні побічні ефекти з боку системи кровотворення (лейкопенія, анемія, тромбоцитопенія), ЦНС (почуття втоми, головокружіння, головна біль, афазія, сонливість, судоми), репродуктивної системи (порушення оогенезу та сперматогенезу, олігоспермія, порушення менструального циклу, зниження лібідо, імпотенція), сечовидільної системи (гематурія, цистит, виражені порушення функції нирок), алергічні та дерматологічні реакції, тощо.

Протипухлинну дію проявляють також деякі похідні триазолу.

Відомий лікарський засіб Летрозол (Фемара) 4,4'-(1H-1,2,4-Триазол-1-ил-метилен)добензонитрил, загальної формули [2]:



який використовується як протипухлинний гормональний засіб та антагоніст гормонів, при злоякісних новоутвореннях молочної залози.

Актуальною проблемою є розширення арсеналу протипухлинних препаратів широкого спектру дії.

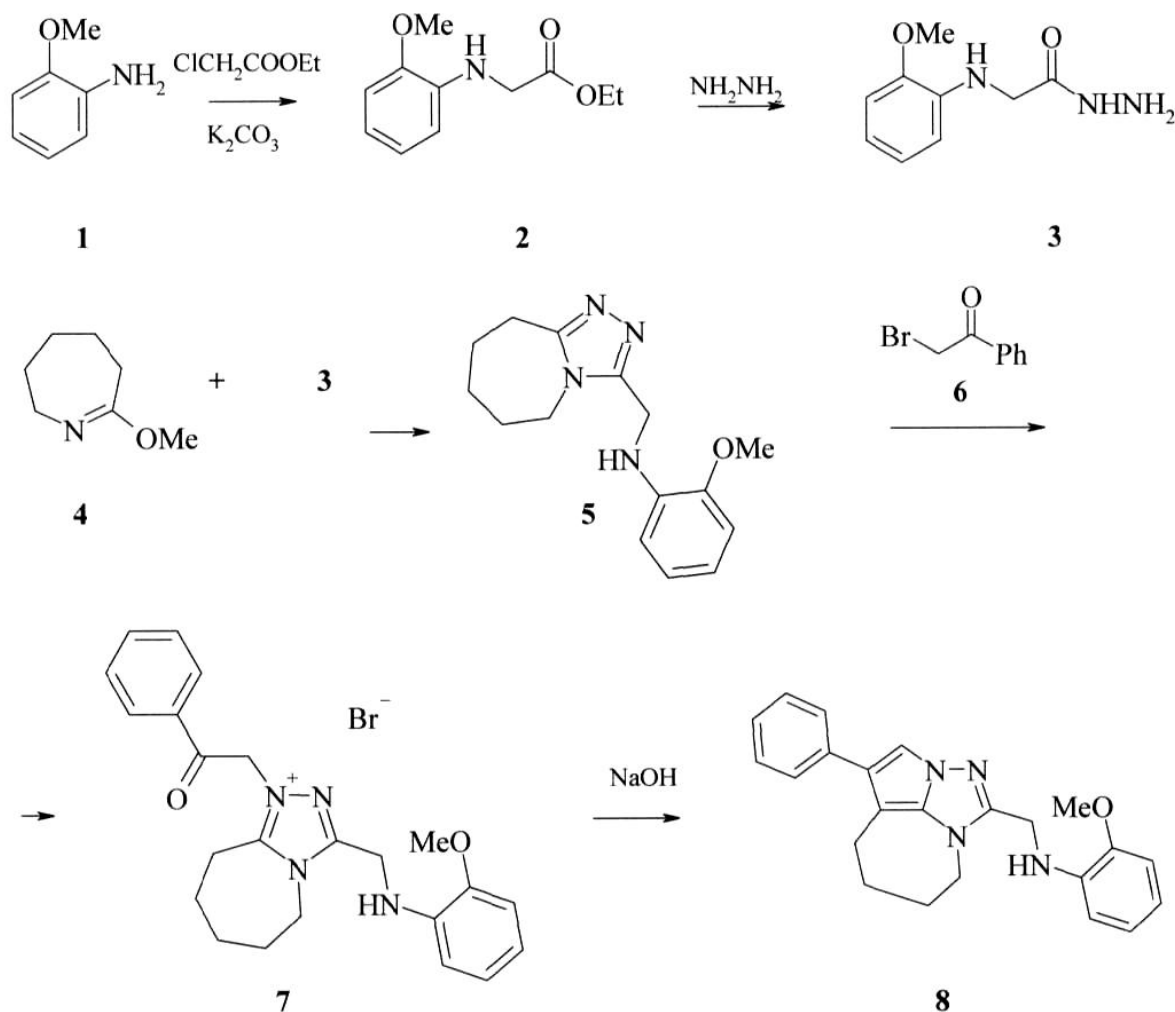
Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано із створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність та здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють широкий спектр онкологічних захворювань людини.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу 1-(2¹-метоксифеніл)аміно-метил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену, що проявляють протипухлинну активність.

Заявлений 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій, за наступною схемою:

Схема 1. Синтез 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулену



Приклади конкретного виконання.

Етиловий естер 2¹-метоксифенілоцтової кислоти 2 був одержаний за методом [3] взаємодією орто-анізидину з хлороцтовим естером. Подальшою обробкою його гідразин-гідратом в спиртовому розчині був одержаний гідразид 2¹-метоксі-фенілоцтової кислоти 3 за методом [4]. 2-Метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепін 4 одержано алкілуванням капролактаму диметилсульфатом за методом [5].

Приклад 1. Синтез 3-(2¹-метоксифеніл)амінометил -6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепіну 5. Суміш 1.40 г (0.011 моля) 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіну 4 та 1.95 г (0.01 моль) гідразиду (2¹-метоксифеніл)амінооцтової кислоти 3 кип'ятять в 40 мл пропанолу-2 протягом 2 годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, осад відфільтровують та сушать. Вихід 1.85 г (68%). Т.пл. 151-152 °С (із пропанолу-2). Найдено, %: N 20.3 C₁₅H₂₀N₄O. Вирахувано, %: N 20.6. Спектр ПМР (ДМСО-d₆): 1.53-1.78 (м, 6H, (CH₂)₃), 2.84 (м, 2H, 9-CH₂), 3.77 (с, 3H, OCH₃), 4.08 (м, 2H, 5-CH₂), 4.37 (д, 2H, NHCH₂), 5.55 (т, 1H, NHCH₂), 6.59 - 6.84 (м, 4H, C₆H₄).

Приклад 2. Синтез 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетра-гідро-2,2а,8а-триазациклопента[с,д]азулену 8. До розчину 2.72 г (0.01 моля) 3-(2¹-метоксифеніл)амінометил -6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепіну 5 в 60 мл етилацетату при перемішуванні додавали 1.99 г (0.01 моля) а-бром-ацетофенону. Реакційну суміш кип'ятили із зворотним холодильником 1 годину, впарювали до сухого залишку, приливали 40 мл 5 % розчину NaOH і кип'ятили реакційну суміш 3 години. Після охолодження осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою, сушили. Кристалізували з бензену. Вихід 1.90 г (51 %). Т_{пл}= 182-183 °С. Знайдено, %: N 15.3. C₂₃H₂₄N₄O. Розраховано, %: N 15.0. ЯМР ¹H (δ, м.ч., DMSO-d₆): 1.93 (м, 2H, CH₂), 2.03 (м, 2H, CH₂), 2.75 (м, 2H, CH₂), 3.81 (с, 3H, OCH₃), 4.04 (м, 2H, CH₂), 4.44 (д, 2H, CH₂), 5.62 (т, 1H, NH), 6.59 - 7.49 (м, 9H, C₆H₄+ C₆H₅), 7.19 (с, 1H, 3-CH).

Приклад 3. Протипухлинна активність 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[сd]азулену 8 вивчалась у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program.

Перший етап фармакологічного скринінгу (прескринінг) 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 [6] 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 1 значення показують на скільки досліджувані сполуки є більш ефективними у пригніченні росту ракових клітин у порівнянні з контролем.

Таблиця 1

Протипухлинна активність 1-(2¹-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[с,сd]азулену 8 *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			
		Мітотична активність, %	IgGI ₅₀	IgTGI	Ig LC ₅₀
Лейкемія	CCRF-CEM	-11.84	-5.78	-5.31	>-4.00
	HL-60(TB)	29.92	-5.58	-4.98	>-4.00
	K-562	22.93	-5.64	-5.12	-4.01
	MOLT-4	11.06	-5.72	-5.34	>^0.00
	RPMI-8226	25.85	-5.58	-5.07	>^0.00
	SR	20.13	-5.51	-4.87	>-4.00
Дрібноклітинний рак легенів	A549/ATCC	71.48	-5.48	> -4.00	>-4.00
	HOP-62	81.20	-5.34	-4.77	-4.29
	HOP-92	70.74	-5.81	-5.23	>-4.00
	NCI-H226	67.82	-5.43	> -4.00	>-4.00
	NCI-H23	76.13	-5.47	> -4.00	>-4.00
	NCI-H322M	96.36	-5.53	-5.04	>-4.00
	NCI-H460	78.73	-5.45	-4.85	-4.05
	NCI-H522	86.21	-5.56	-4.99	-4.34
Рак товстого кишечника	COLO 205	9.98	-5.69	-5.41	-5.14
	HCC2998	56.23	-5.30	-4.37	>-4.00
	HCT-116	31.68	-5.49	-4.69	>-4.00
	HCT-15	97.09	-4.80	> -4.00	>-4.00
	HT-29	74.33	-5.45	>-4.00	>^0.00
	KM12	50.05	-5.40	-4.87	-4.38
	SW-620	76.33	-5.44	-4.65	>-4.00
Рак головного мозку	SF-268	74.59	-5.37	-4.59	>-4.00
	SF-539	88.70	-5.44	-4.82	-4.32
	SNB-19		-5.44	-4.07	>-4.00
	SNB-75	69.86	-5.83	-4.70	>-4.00
	U251	37.82	-5.56	-4.90	>-4.00
Меланома	LOXIMVI	56.72	-5.46	-4.85	-4.30
	MALME-3M		-5.62	-5.23	-4.61
	M14	63.86	-5.40	-4.69	>-4.00
	MDA-MB-435	40.88	-5.60	-5.06	-4.43
	SK-MEL-2	68.85	-5.61	-5.17	-4.21
	SK-MEL-28	55.34	-5.40	-4.77	-4.28
	SK-MEL-5	46.77	-5.73	-5.35	-4.94
	UACC-257	83.78	-5.57	-5.13	-4.19
	UACC-62	50.93	-5.65	-5.17	-4.49

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності			
		Мітотична активність, %	IgGI ₅₀	IgTGI	Ig LC ₅₀
Рак яєчників	IGROV1	68.86	-5.49	-4.91	>-4.00
	OVCAR-3	42.55	-5.62	-5.22	-4.64
	OVCAR-4	70.61	-5.62	-5.01	>-4.00
	OVCAR-5	99.26	-5.33	>-4.00	>^00
	OVCAR-8	71.02	-5.58	> -4.00	>-4.00
	NCI/ADR-RES	106.4	-4.13	>-4.00	>-4.00
	SK-OV-3	87.54	-5.42	-4.62	>-4.00
Рак нирок	786-0	73.03	-5.41	-4.55	>-4.00
	A498	86.90	-5.61	-4.05	>-4.00
	ACHN	76.35	-5.52	>-4.00	>^00
	CAKI-1	98.05	-4.81	> -4.00	>-4.00
	RXF 393	65.44	-5.61	-5.04	-4.38
	SN12C	42.60	-5.51	-4.80	>-4.00
	TK-10	91.79	-5.44	-4.13	>-4.00
	UO-31	84.49	-5.18	-4.47	>-4.00
Рак простати	PC-3	36.52	-5.55	-4.94	>-4.00
	DU-145	67.91	-5.28	-4.13	
Рак молочної залози	MCF7	31.19	-5.47	>^00	> -4.00
	MDA-MB-231/ATCC	78.02	-5.68	-5.24	-4.46
	HS 578T	67.80	-5.34	>-4.00	>-4.00
	BT-549	44.75	-5.40	-4.72	-4.05
	T47D	30.45	-5.44	> -4.00	>-4.00
	MDA-MB-468	-0.74	-5.64	-5.07	>-4.00

В умовах експерименту заявлена сполука в концентрації 10^{-5} моль/л виявили здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл. 1).

Наприклад, сполука 8 затримувала ріст ракових клітин лейкемії CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR вище стандарту. По відношенню до клітин HL-60(TB) заявлена сполука ефективніше стандарту на 70.08%. Для клітин K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR ці дані становлять 77.07%, 88.94%, 74.15% та 79.87% відповідно. По відношенню до клітин CCRF-CEM дані становлять -11.84% Тобто, заявлена сполука не тільки зупиняють ріст і поділ клітин CCRF-CEM лейкемії, а й знищує їх.

На другому етапі досліджень, або поглибленому in vitro скринінгу, сполука 8 тестувалась у градієнті концентрацій 10^{-4} - 10^{-8} моль/л (табл. 1). В результаті експерименту розраховувались 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. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів (IgGI₅₀, IgTGI та IgLC₅₀) є меншими, ніж -4,00, то сполука вважається активною [7-9].

Згідно результатів таблиці 1 сполука 8 проявила значний рівень протиракової активності щодо дрібноклітинного раку легенів HOP-92 та NCI-H522 (IgGI₅₀= -5.81 та -5.56 , IgTGI = -5.23 та -4.99, та IgLC₅₀ = > -4.00 та -4.34), клітин рак товстого кишечника COLO 205 та KM12 (IgGI₅₀= -5.69 та -5.40, IgTGI = -5.41 та -4.87, та IgLC₅₀ - -5.14 та -4.38), клітин раку молочної залози MDA-MB-231/ATCC та MDA-MB-468 (IgGI₅₀ = -5.68 та -5.64 , IgTGI = -5.24 та -5.07, та IgLC₅₀ = -4.46 та > -4.00) відповідно.

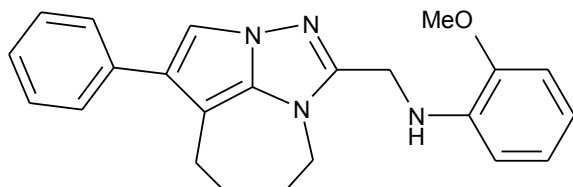
Таким чином, показано, що заявлений 1-(2'-метоксифеніл)амінометил-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[с,е]азулен набагато ефективніше стримують ріст клітин лейкемії, дрібноклітинного раку легенів, меланоми, раку нирок, раку яєчників та клітин раку молочної залози, ніж стандарт - 5-фтороурацил. Одержані данні дозволяють розглядати запропоновану нову біологічно активну сполуку як основу для створення нових ефективних протипухлинних засобів для лікування пухлинної хвороби людини.

Література

1. M. Baum, J. Cuzick, J. Forbes, J. Houghton, A. Howell (The ATAC Trialists Group): Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early stage breast cancer. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003, 98:1802-1810.
2. "World Cancer Report" . International Agency for Research on Cancer . 2008 . Retrieved 2011-02-26 . (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma , which are common but rarely fatal).
3. Rohlmann, Renate; Stopka, Tobias; Richter, Heinrich; Garcia Mancheno, Olga. Iron-catalyzed oxidative tandem reactions with TEMPO oxoammonium salts: Synthesis of dihydroquinazolines and quinolines/ *Journal of Organic Chemistry*, 2013 , vol. 78, # 12 p. 6050-6064.
4. Bonacorso, Helio G.; Pittaluga, Everton P.; Alves, Sydney H.; Schaffer, Larissa F.; Cavinatto, Susiane; Porte, Liliane M. F.; Paim, Gisele R.; Martins, Marcos A. P.; Zana-ta, Nilo. Regioselective synthesis and antimicrobial evaluation of new 1-aryloxyacetyl-, 1-thiophenoxyacetyl- and 1-phenylaminoacetylsubstituted 3-alkyl(aryl/heteroaryl)-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazoles/ *Arkivoc*, 2012 , vol.2012, # 8 p. 62 - 75
5. Граник В.Г., Жидкова А.М., Курятов Н.С. и др. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфа-ТОМ//ХГС- 1973.-№11.- С. 1532-1535.
6. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.
7. 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.
8. 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.
9. 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

- 1-(2¹-Метоксибеніл)амінометил-4-беніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азулен:



що має протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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