



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123601** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C07D 487/16 (2006.01)
A61P 35/00
A61K 31/55 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2019 01413	(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Швидко Олена Володимирівна (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.02.2019	(73) Володілець (володільці): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.04.2021	(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.08.2020, Бюл.№ 16	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Савченкова Л. В. Поиск потенциальных антиоксидантов в ряду производных 5, 6, 7, 8- тетрагидро-2, 2а, 8а-триазациклопента. / Савченкова, Л. В., Оглоблина, М. В., Колесников, А. В., Глущенко, А. В., Демченко, А. М., Акимова, М. С., & Рокотянская, В. В. // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т.5. - № 2. – С. 63-69 PubChem, код сполуки CID 34320304, дата введення 29.05.2009; (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/34320304) N-([4-(4-chlorophenyl)-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8a- triazacyclopenta[cd]azulen-1-yl]methyl)-4-methylaniline UA 117081 C2; 11.06.2018 UA 115750 C2; 11.12.2017 Демченко А.М. Производные 1,4-диарил-5,6,7,8- тетрагидро- 2,2а,8а-триазациклопента[с,д]азулена, Химия гетероциклических соединений. – 2000.- №8.- С.1123-1127 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 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.; Zanata, Nilo. Regioselective sy nthesis 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 Граник В.Г., Жидкова А.М., Курятов Н.С. и др. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом //ХГС. - 1973. - № 11. - С. 1532- 1535
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.04.2021, Бюл.№ 17	

(54) ЗАСТОСУВАННЯ [4-(4'-ХЛОРОФЕНІЛ)-5,6,7,8-ТЕТРАГІДРО-2,2а,8а-ТРИАЗАЦИКЛОПЕНТА[с,д]АЗУЛЕН-1-ІЛМЕТИЛ]-ПАРА-ТОЛІЛАМІНУ ЯК ДІЮЧОЇ РЕЧОВИНИ, ЩО

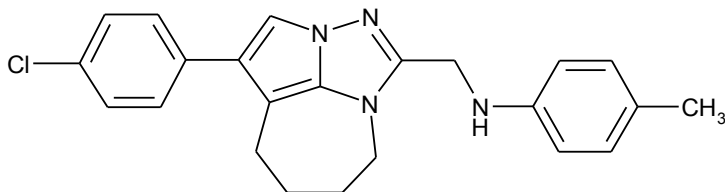
UA 123601 C2

ВИЯВЛЯЄ СЕЛЕКТИВНУ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО РАКОВИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ CCRF-CEM

(57) Реферат:

Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини. Заявляється застосування 4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[с,d]азулен-1-ілметил]-пара-толіламіну для створення протипухлинного препарату щодо ракових клітинних ліній лейкемії. Відносно клітин CCRF-CEM заявлена сполука не тільки зупиняє ріст і поділ ракових клітин, а й знищує їх на 20,34 %.

Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активного [4-(4'-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазациклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламіну:



5 який проявляє виражену протипухлинну активність щодо ракових клітинних ліній лейкемії.

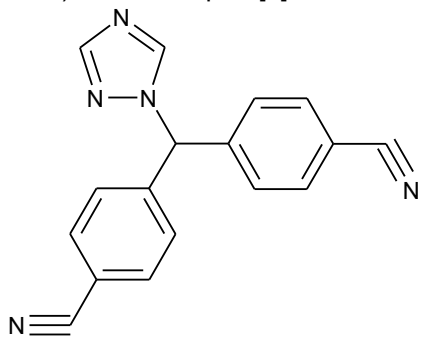
Лейкемія [1], як складова гемобластозів [2], є злоякісним захворюванням системи крові, що характеризується ураженням кісткового мозку лейкозними стовбуровими клітинами [3], які виникають у результаті порушення процесів самооновлення та диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників [4]. У свою чергу, за походженням гемобластози поділяють на дві групи: кістково-мозкового (гострі лейкемії, хронічні лейкемії, парaprотейнемічні гемобластози) та позакістково-мозкового походження (лімфогранулематоз, чи лімфома Годжкіна, та негоджкінські злоякісні лімфоми).

10 Серед перелічених гемобластоз гострі лейкемії посідають провідне місце в структурі зазначених захворювань і становлять майже третину від їхньої загальної кількості (від 3,5 до 5 випадків на 100 тис. населення на рік). Гострі лімфобластні лейкемії спостерігаються, як правило, в дитячому віці (до 80-90 % випадків), тоді як у осіб після 40 років діагностується до 80 % гострих нелімфобластних лейкемії [1].

15 На сьогодні в Україні різні види лейкемії лікуються різними лікарськими препаратами. Так, для лікування гострого лімфобластного лейкозу застосовують L-аспарагіназу, Вінкристин, Дазатиніб, Даунорубіцин, Іматиніб, Метотрексат, Преднізон та Циклофосфамід [5].

20 При хіміотерапевтичному лікуванні хронічної лейкемії може бути задіяний або один лікарський препарат, або комплекс лікарських засобів, наприклад: Іматиніб блокує ріст ракових клітин (хронічна мієлоїдна лейкемія) [6], а Інтерферон альфа застосовується для лікування хронічної мієлоїдної лейкемії. Він допомагає імунній системі боротися з хворобою і перешкоджає росту ракових клітин [7]. У комбінації лікарських засобів використовують: Вінкристин, Преднізон і Циклофосфамід; Алемтузумаб, Бусульфан, Гідроксіурея, Ритуксимаб, Флюдарабін, Хлорамбуцил та Цитарабін [5].

25 Протипухлинну дію проявляють і деякі похідні триазолу. Відомим протипухлинним лікарським засобом є Летрозол (Фемара), діючою речовиною якого є 4,4'-(1H-1,2,4-триазол-1-іл-метилен)добензонітрил [8]:



30 Він використовується як протипухлинний гормональний засіб та антагоніст гормонів при злоякісних новоутвореннях молочної залози. Протибластомну дію щодо ракових клітин лейкемії Летрозол не виявляє.

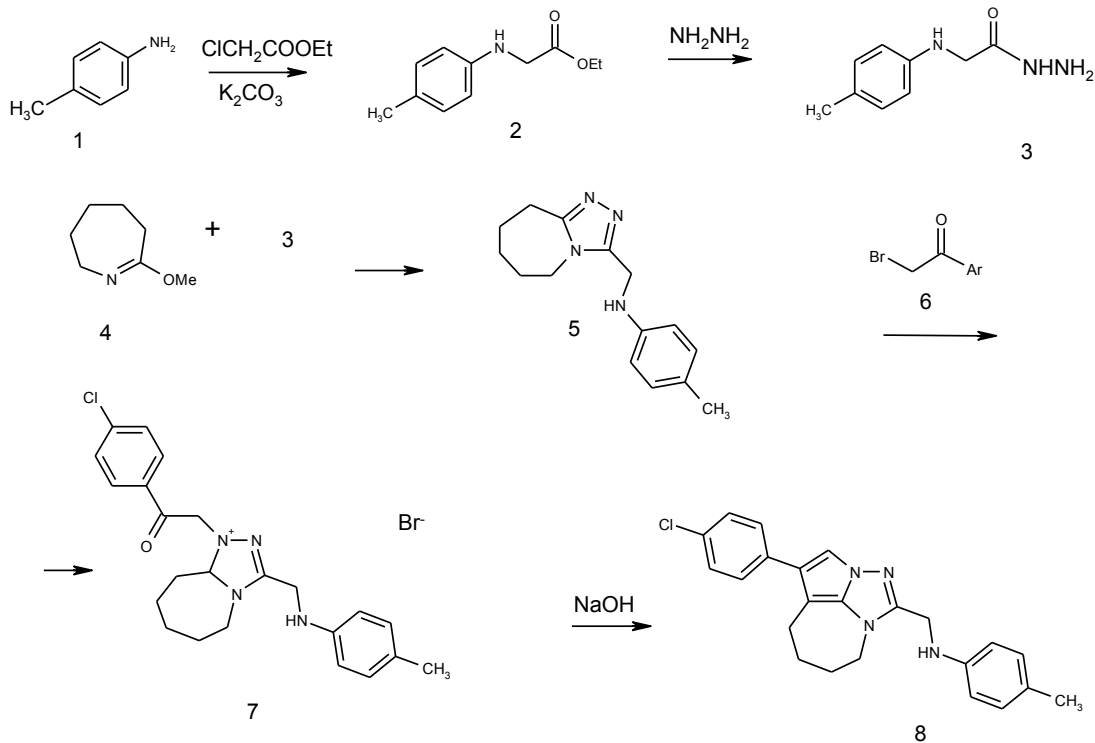
35 До побічних ефектів при застосуванні цього препарату належать: біль у м'язах, суглобах, головний біль, висипання на шкірі, припливи крові, нудота, блювання, периферичні набряки, висипи, диспепсія, випадання волосся, збільшення маси тіла або анорексія. Інколи спостерігаються: кров'янисті виділення і кровотечі з піхви, запор, запаморочення, підвищене потовиділення, задишка, тромбофлебіт тощо.

40 Актуальною проблемою фармацевтичної хімії є розширення арсеналу протипухлинних препаратів. Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язане зі створенням нових протипухлинних препаратів селективної дії.

В основу винаходу поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протибластомну активність і здатні пригнічувати ріст ракових клітинних ліній лейкемії.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазациклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламіну, який проявляє протипухлинну активність щодо ракових клітинних ліній лейкемії.

Заявлений [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазацикло-пента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламін одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій за схемою:



Приклади конкретного виконання.

Етиловий естер 4¹-метилфенілоцтової кислоти 2 був одержаний за методикою [9] взаємодією пара-толіламіну з хлороцтовим естером. Подальшою обробкою його гідразин-гідратом у спиртовому розчині був одержаний гідрозид 4¹-метилфенілоцтової кислоти 3 за методикою [10]. 2-Метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепін 4 одержано алкілуванням капролактаму диметилсульфатом за методикою [11].

Приклад 1. Синтез 3-(4¹-метилфеніл)амінометил-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепіну 5

Суміш 1,40 г (0,011 моль) 2-метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепіну 4 та 1,79 г (0,01 моль) гідрозиду (4¹-метилфеніл)амінооцтової кислоти 3 кип'яють в 40 мл пропанолу-2 протягом двох годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, осад відфільтровують та сушать. Вихід 1,97 г (77 %). $T_{\text{пл}}=184-186^\circ\text{C}$ (з пропанолу-2). Знайдено, %: N-22,0 C₁₅H₂₀N₄. Розраховано, %: N-21,9. Спектр ПМР (ДМСО-d₆): 1,53-1,83 (м, 6Н, (CH₂)₃), 2,18 (с, 3Н, CH₃), 2,84 (м, 2Н, 9-CH₂), 4,02 (м, 2Н, 5-CH₂), 4,28 (д, 2Н, NHCH₂), 5,62 (м, 1Н, NHCH₂), 6,54 та 6,83 (д-д, 4Н, C₆H₄).

Приклад 2. Синтез [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-три-азациклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламіну 8

До розчину 2,56 г (0,01 моль) 3-(4¹-метилфеніл)амінометил-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепіну 5 в 60 мл етилацетату при перемішуванні додавали 2,33 г (0,01 моль) α -бром-4-хлорацетофенону. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником одну годину, впарювали до сухого залишку, приливали 40 мл 5 % розчину NaOH і кип'ятили реакційну суміш три години. Після охолодження осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою, сушили. Кристалізували з бензену. Вихід 2,15 г (55 %). $T_{\text{пл}}=191-193^\circ\text{C}$. Знайдено, %: N-14,1, Cl-9,23. C₂₃H₂₃ClN₄. Розраховано, %: N-14,3, Cl-9,08. ЯМР ¹H (δ, м. ч., DMSO-d₆): ЯМР ¹H (δ, м. ч., DMSO-d₆): 1,93 (м, 2Н, CH₂), 2,01 (м, 2Н, CH₂), 2,14 (с, 3Н, CH₃), 2,74 (м, 2Н, CH₂), 4,02 (м, 2Н, CH₂), 4,36 (д, 2Н, CH₂), 6,05 (т, 1Н, NH), 6,64 та 6,90 (д-д, 4Н, C₆H₄, J=8,4 Гц), 7,24 (с, 1Н, 3-CH), 7,37 та 7,46 (д-д, 4Н, C₆H₄, J=8,7 Гц).

Приклад 3. Протипухлинна активність [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазациклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламіну 8 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 [12] 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 табл. значення показують на скільки досліджувані сполуки є більш ефективними у пригніченні росту ракових клітин у порівнянні з контролем.

Таблиця

Протипухлинна активність [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазаціклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламіну 8 *in vitro* на лініях лейкемії при дії речовини в концентрації 10^{-5} моль/л

Параметри протипухлинної активності сполуки 8					
Лінії ракових клітин	Мітотична активність, %	Лінії ракових клітин	Мітотична активність, %	Лінії ракових клітин	Мітотична активність, %
CCRF-CEM	-20,34	K-562	14,12	RPMI-8226	57,90
HL-60(TB)	35,32	MOLT-4	15,05	SR	63,18

В умовах експерименту заявлена сполука в концентрації 10^{-5} моль/л виявила здатність пригнічувати ріст ракових клітин лейкемії ліній CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR вище стандарту (див. табл.). Відносно клітин HL-60(TB) [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазаціклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламін ефективніший за стандарт на 64,68 %. Для клітин K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR ці дані становлять: 85,88; 84,95; 42,10 та 36,82 % відповідно. Відносно клітин CCRF-CEM заявлена сполука не тільки зупиняє ріст і поділ ракових клітин, а й знищує їх на 20,34 %.

Таким чином, показано, що заявлений 4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазаціклопента[с, d]азулен-1-іл-метил]-пара-толіламін не лише набагато ефективніше стримує ріст клітин лейкемії порівняно зі стандартом, а й здатний вбивати ракові клітини лінії CCRF-CEM.

Одержані дані дозволяють розглядати запропоновану нову біологічно активну сполуку як основу для створення нових ефективних протипухлинних засобів щодо ракових клітинних ліній лейкемії.

Джерела інформації:

1. Гострі лейкемії. Режим доступу: <http://www.all-blood.ru/ua/gostri-leikemiyi.html>.
2. Гемобластози. Режим доступу: <http://www.all-blood.ru/ua/gemoblastozi.html>.
3. Buss, E.C. Leukemia stem cells /E.C. Buss, A.D. Ho //Int. J. of Cancer. - 2011. Vol. 129. - P. 2328-2336.
4. Свеженцева І.О. Роль лейкозної стовбурової клітини у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії /І.О. Свеженцева //Annals of Mechnikov Institute, N 3. - 2016. С. 15-21. Режим доступу: www.imiamn.org.ua/journal.htm.
5. Лікарські засоби для лікування лейкемії. Режим доступу: <http://mediclab.com.ua/index.php?newsid=7461>.
6. Іматиніб. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%86%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BD%D1%96%D0%B1>.
7. Інтерферони. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%86%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B8>.
8. Летрозол (Letrozolum). Режим доступу: <https://compendium.com.ua/akt/76/55/letrozolum/>.
9. 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.

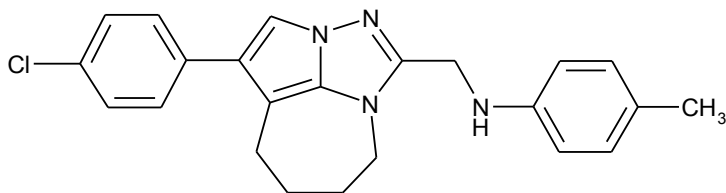
10. Bonacorso, Helio G.; Pittaluga, Everton P.; Alves, Sydney H.; Schaffer, Larissa F.; Cavinatto, Susiane; Porte, Liliane M.F.; Paim, Gisele R.; Martins, Marcos A.P.; Zanata, Nilo. Regioselective synthesis and antimicrobial evaluation of new 1-aryloxyacetyl-, 1-thiophenoxyacetyl- and 1-phenylaminoacetylsubstituted 3-alkyl(aryl/heteroaryl)-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazoles/ Arkivoc, 2012, vol. 2012, # 8. - P. 62-75.

11. Граник В.Г., Жидкова А.М., Курятов Н.С. и др. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом //ХГС. - 1973. - № 11. - С. 1532-1535.

12. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування [4-(4¹-хлорофеніл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазаціклопента[с,д]азулен-1-ілметил]-пара-толіламіну



як діючої речовини, що виявляє селективну протипухлинну активність щодо ракових клітинних ліній лейкемії CCRF-CEM.

20