



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/47 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08); C07D 215/18 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020123736, 17.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.07.2020

Дата регистрации:  
25.01.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.07.2020

(45) Опубликовано: 25.01.2021 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачка, 194/2,  
НИИФОХ, Румянцевой М.И., Румянцева  
Марина Ивановна

(72) Автор(ы):

Минкин Владимир Исаакович (RU),  
Кит Олег Иванович (RU),  
Гончарова Анна Сергеевна (RU),  
Лукбанова Екатерина Алексеевна (RU),  
Саяпин Юрий Анатольевич (RU),  
Гусаков Евгений Александрович (RU),  
Туркин Игорь Николаевич (RU),  
Ситковская Анастасия Олеговна (RU),  
Филлипова Светлана Юрьевна (RU),  
Лейман Игорь Александрович (RU),  
Лазутин Юрий Николаевич (RU),  
Чубарян Анна Васильевна (RU),  
Пашенко Денис Георгиевич (RU),  
Тищенко Ирина Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

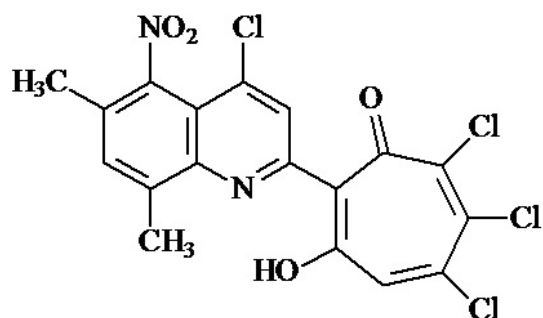
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Южный федеральный  
университет» (RU),  
федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Национальный медицинский  
исследовательский центр онкологии»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, «ФГБУ «НМИЦ онкологии»  
Минздрава России» (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: SAYAPIN Y.A. et al. Synthesis,  
structure, and photoisomerization of derivatives  
of 2-(2-quinolyl)-1,3-tropolones prepared by the  
condensation of 2-methylquinolines with 3,4,5,6-  
tetrachloro-1,2-benzoquinone, Tetrahedron, 2010,  
vol. 66(45), p. 8763-8771. RU 2702648 C1,  
09.10.2019. RU 2314295 C2, 10.01.2008. ЗЫОНГ  
Н.Б. и др. Синтез и цитотоксическая (см.  
прод.)

(54) Средство, обладающее цитотоксической активностью в отношении культуры клеток немелкоклеточного  
рака легких А 549

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к применению 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона формулы 1



в качестве средства, обладающего цитотоксической активностью в отношении культуры клеток немелкоклеточного рака легких А 549. Технический результат: органическое соединение формулы 1 позволяет ингибировать рост опухолевых клеток легкого в меньшей концентрации по сравнению с концентрациями известных в данном ряду соединений, обладающих цитотоксической активностью. 1 з.п. ф-лы, 1 пр.

(56) (продолжение):

активность производных [бензо][b][1,4]оксазепино[7,6,5-de]хинолин-2-ил]-1,3-трополонов, Химия гетероциклических соединений, 2015, т.51(3), с.291-294.

RU 2741311 C1

RU 2741311 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07D 215/18* (2006.01)  
*A61K 31/47* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 31/47 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08); C07D 215/18 (2020.08)*(21)(22) Application: **2020123736, 17.07.2020**(24) Effective date for property rights:  
**17.07.2020**Registration date:  
**25.01.2021**

Priority:

(22) Date of filing: **17.07.2020**(45) Date of publication: **25.01.2021** Bull. № 3

Mail address:

344090, g. Rostov-na-Donu, pr. Stachka, 194/2,  
NIIFOKH, Rumyantsevoj M.I., Rumyantseva  
Marina Ivanovna

(72) Inventor(s):

**Minkin Vladimir Isaakovich (RU),  
Kit Oleg Ivanovich (RU),  
Goncharova Anna Sergeevna (RU),  
Lukbanova Ekaterina Alekseevna (RU),  
Saiapin Iurii Anatolevich (RU),  
Gusakov Evgenii Aleksandrovich (RU),  
Turkin Igor Nikolaevich (RU),  
Sitkovskaia Anastasiia Olegovna (RU),  
Fillipova Svetlana Iurevna (RU),  
Leiman Igor Aleksandrovich (RU),  
Lazutin Iurii Nikolaevich (RU),  
Chubarian Anna Vasilevna (RU),  
Pashchenko Denis Georgievich (RU),  
Tishchenko Irina Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

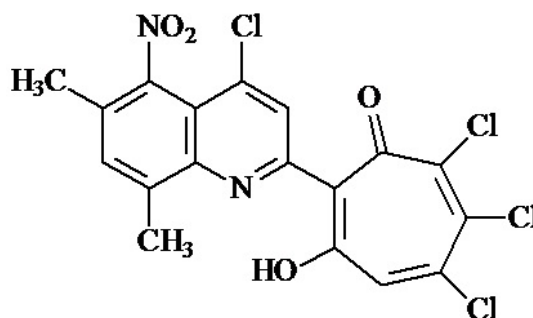
**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia «Iuzhnyi federalnyi universitet»  
(RU),  
federalnoe gosudarstvennoe biudzhethoe  
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii  
issledovatel'skii tsentr onkologii» Ministerstva  
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii, «FGBU  
«NMITs onkologii» Minzdrava Rossii» (RU)**

(54) **AGENT HAVING CYTOTOXIC ACTIVITY ON NON-SMALL-CELL LUNG CANCER CELL CULTURE**  
**A 549**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: present invention relates to use of  
2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinolin-2-yl)-5,6,7-  
trichloro-1,3-tropolone of formula 1



as agent possessing cytotoxic activity on non-small-

cell lung cancer A 549 culture.

EFFECT: organic compound of formula 1 enables to inhibit the growth of lung tumor cells in a lower

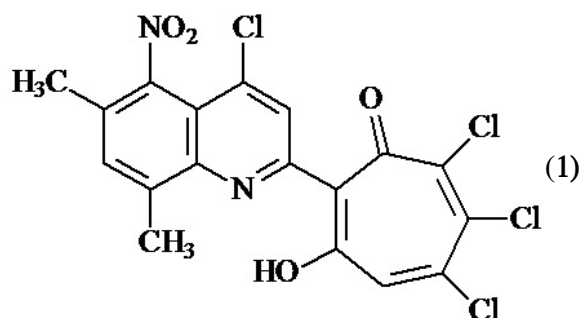
concentration compared to concentrations of compounds known in this series, having cytotoxic activity.

1 cl, 1 ex

R U 2 7 4 1 3 1 1 C 1

R U 2 7 4 1 3 1 1 C 1

Изобретение относится к фармакологии, а именно к биологически активным веществам, обладающим цитотоксической активностью по отношению к культуре клеток рака легкого А 549, и может быть использовано при производстве противоопухолевых лекарственных средств



15 обладающих цитотоксической активностью по отношению к культуре клеток рака легкого А 549, и может быть использовано при производстве противоопухолевых лекарственных средств.

В настоящее время в мире онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности. По оценкам Международного агентства по исследованию рака, в 2018 году было зарегистрировано 18,1 миллиона новых случаев заболевания и 9,6 миллиона случаев смерти от злокачественных новообразований [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от рака умирает каждый шестой человек. В России ежегодно выявляется почти 600 тыс., а умирает около 300 тыс. онкобольных [2]. Рак является одной из самых значимых медицинских и общественных проблем, как в России, так и в большинстве стран мира. Первое место по распространенности среди мужчин и лидирующее место по смертности среди всех онкологических заболеваний занимает рак легкого [3].

Основными подходами к терапии злокачественных новообразований является хирургическое лечение и цитотоксическая химиотерапия, которая включает введение противоопухолевых препаратов по стандартизированной схеме лечения [4]. На сегодняшний день общепринятым стандартом первой линии терапии многих видов рака является применение препаратов на основе платины, обладающих цитотоксическим эффектом широкого спектра действия [5, 6, 7]. К ним относятся цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин с различной эффективностью и токсичностью [8]. Их противоопухолевая активность связана со способностью повреждать ДНК, что впоследствии приводит к апоптозу опухолевых клеток [9]. В комбинации с другими противоопухолевыми препаратами (этопозид, паклитаксел, блеомицин, гемцитабин, циклофосфамид) платиновые агенты используются для лечения рака легкого, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, меланомы и лимфом [10, 11, 12]. Несмотря на широкое применение, все цитостатики вызывают многочисленные нежелательные токсические эффекты: нейротоксичность, тошнота, рвота, потеря мышечной массы [7, 8]. В связи со значительным ростом онкологических заболеваний актуальным является разработка и внедрение новых противоопухолевых средств, которые обладали бы высокой эффективностью на фоне низкого риска развития нежелательных реакций.

Первым этапом в поиске новых противоопухолевых соединений в экспериментальной клеточной биологии является тест на жизнеспособность, который позволяет проводить начальный отбор перспективных лекарственных средств среди вновь синтезированных соединений [6].

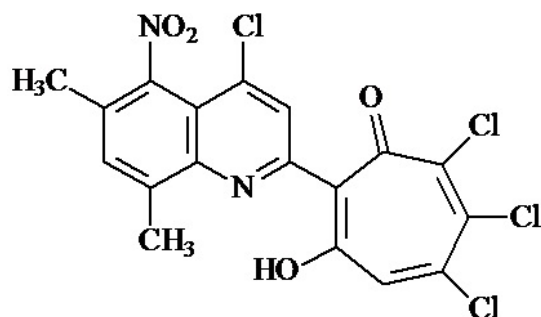
В ряду 2-хинолин-2-ил-производных 1,3-трополона известен 2-(4*h*-1,3-бензоксазин-4-он-2-ил)-4,5,6-трихлор-1,3-трополон, обладающий антибактериальной активностью против госпитальных штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий [9].

Известны в этом ряду 2-гетарилзамещенные 1,3-трополона, обладающие антимикробным действием [10].

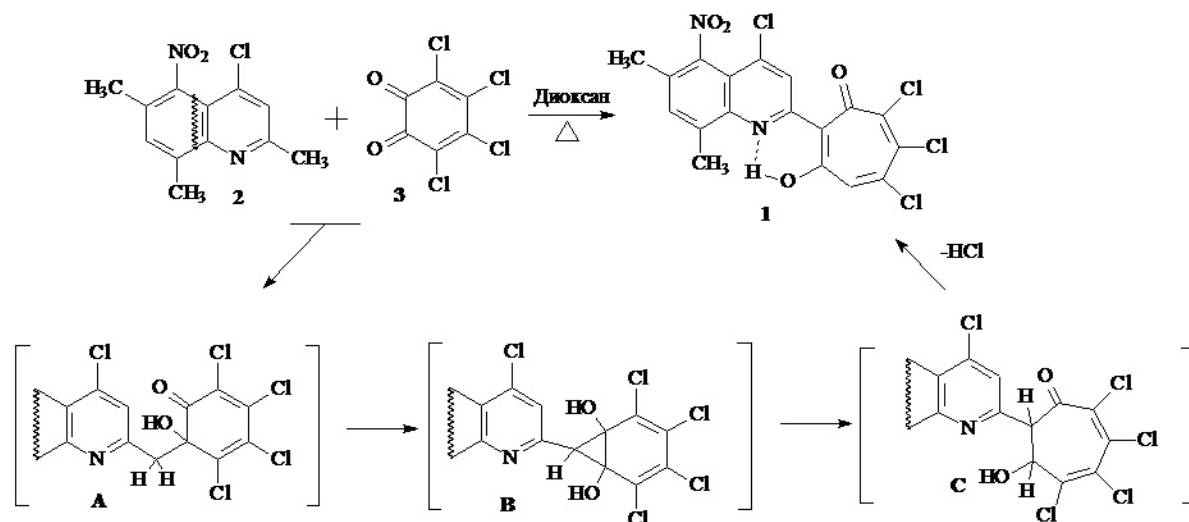
Известен в этом ряду также 2-[7-ацетил-9,11-ди(трет-бутил)-4-метил-5-хлорбензо[*b*] [1,4]оксазепино[7,6,5-*de*]-хинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, проявляющий цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток молочной железы MCF-7 (Human breast carcinoma) в концентрации  $IC_{50}$  12.96  $\mu$ г/мл, а также опухолевых эпителиальных клеток KB, опухолевых клеток легких Lu и печени Нер-G2 в концентрациях  $IC_{50} > 128$   $\mu$ г/мл [11].

Наиболее близким по выполнению является 5,7-ди(трет-бутил)-4-нитро-2-(4,7-дихлор-5-нитро-8-метилхинолин-2-ил)-1,3-трополон, проявляющий цитотоксическую активность на клеточные линии OVCAR-8, OVCAR-3, H441, НСТ-116, Panc1, A549 ( $IC_{50}$  мкМ  $= 3.89 \pm 0.6927$ ) [12].

Технический результат достигается 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополоном формулы 1



Синтез соединения 1 заключается в реакции расширения *o*-хинонового цикла, протекающей между 5-нитро-2,6,8-триметил-4-хлорхинолином 2 и 3,4,5,6-тетрахлор-1,2-бензохиноном 3 при кипячении в диоксане:



Механизм образования трополоновой системы 1 включает стадию альдольной конденсации с образованием интермедиата А, циклизацию А в норкарадиеновое производное В и перегруппировку В в дигидротрополон С. Окончательное формирование 1,3-трополонового фрагмента сопровождается дегидрохлорированием

С, что ведет к основному продукту 1.

Строение соединения 1 установлено данными ЯМР  $^1\text{H}$  и ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии.

Ниже приведен пример синтеза 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона 1.

Пример. 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона (1). Раствор 20,6 г (0,083 моль) 3,4,5,6-тетрахлор-1,2-бензохинона (3), 21 г (0,083 моль) 5-нитро-2,6,8-триметил-4-хлорхинолина (2) кипятили в 60 мл диоксана 2 часа. Охлаждали раствор и отфильтровывали выпавший осадок. Получали 17 г соединения (1). Маточный раствор пропускали через хроматографическую колонку с силикагелем (элюент -  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Собирали ярко-желтую фракцию с  $R_f$  0.5. Отгоняли растворитель и получали 2,8 г соединения (1). Выход 19,8 г (52 %), ярко-желтые кристаллы (бензол), т.пл. 205-207°C.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ , (600 МГц),  $\delta$ , м.д. ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.44 (3H, с,  $\text{CH}_3$ ), 2.74 (3H, с,  $\text{CH}_3$ ), 7.16 (1H, s, 4- $\text{CH}_{\text{троп.}}$ ), 7.57 (1H, с,  $\text{CH}_{\text{аром.}}$ ), 8.40 (1H, с,  $\text{CH}_{\text{аром.}}$ ), 19.00 (1H, с, OH). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ , (151 МГц),  $\delta$ , м.д. ( $\text{CDCl}_3$ ): 17.66, 18.58, 112.15, 115.85, 123.85, 130.12, 131.39, 132.78, 134.09, 135.00, 136.29, 138.46, 138.55, 141.58, 144.01, 153.73, 173.61, 181.87. ИК-спектр,  $\nu/\text{см}^{-1}$ : 3122, 3051, 1621, 1585, 1538, 1496, 1462, 1434, 1385, 1362, 1320, 1289, 1260, 1199, 1127, 1110, 1069, 1027, 1006, 945, 880, 840, 782, 756, 741, 712, 699. Масс-спектр (ЭУ, 70 эВ),  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$  (%)): 432 ( $\text{M}^+ - \text{CO}$ , 85), 395 (16), 386 (37), 365 (17), 350 (18), 337 (16), 314 (13), 286 (25), 250 (25), 214 (31), 188 (23), 166 (30), 147 (62), 139 (50), 119 (58), 99 (37), 84 (87), 77 (57), 62 (100), 50 (57), 38 (77).  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M} = 460.10$ ). Вычислено: С 46.99; Н 2.19; N 6.09. Найдено: С 46.90; Н 2.12; N 6.02.

Исследование фармакологической активности

Материалы и методы

Эксперимент проведен на устойчивой клеточной линии немелкоклеточного рака легкого A549.

МТТ-колориметрический тест для оценки жизнеспособности клеток основан на восстановлении при помощи НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида в нерастворимый в воде, но растворимый в ДМСО формазан, который имеет пурпурно-синее окрашивание. Оценку жизнеспособности проводят по уменьшению оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными [13].

Клетки рассаживали в 96-луночный планшет и культивировали в стандартных стерильных условиях: питательная среда DMEM, 10% ЭТС, 5%  $\text{CO}_2$ , температура плюс 37°C. Вещество добавляли в концентрации от 0,004 до 2,226 мкМ. Клетки далее инкубировали в тех же стандартных стерильных условиях в течение 72 ч, после чего к ним добавляли по 20 мкл рабочего раствора МТТ. Инкубировали еще 2 часа в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность (длины волн: возбуждение/эмиссия 540 нм / 590 нм).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием теста Вилкоксона, критерия Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Обсчет реализован в программе GraphPad Prism 5.0.

Результаты исследований

Об уровне цитотоксической активности судили по изменению степени флуоресценции

в лунках, обработанных веществом по сравнению с контрольными лунками (без воздействия).

Ингибирующая концентрация  $IC_{50}$  2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона в отношении культуры клеток рака легкого А 549 составила  $0,21 \pm 0,01$  мкМ, что значимо меньше ингибирующей концентрации  $IC_{50}$  широко используемого в терапии рака Цисплатина, равной  $3,84 \pm 0,23$  [8] (отличия статистически достоверны по отношению к группе контроля,  $p \leq 0,05$ , по критерию Краскела-Уолиса).

Таким образом, 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон проявляет цитотоксическую активность в отношении клеточной линии рака легкого А549, при этом концентрация  $IC_{50}$  предлагаемого соединения ниже, чем концентрация  $IC_{50}$  наиболее близкого по структуре соединения ( $IC_{50} = 3.89 \pm 0.6927$  мкМ; [12]), и ниже, чем концентрация широко используемого в терапии опухолей, в том числе и рака легкого, Цисплатина.

#### Литература

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* - 2018. - Vol. 68. - № 6. - P. 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

2. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (Заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. - 250 с.

3. Noone A.M., Howlader N., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015. // National Cancer Institute. Bethesda, MD. - 2018. [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/).

4. Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. // *Nat. Rev. Cancer.* - 2013. - Vol. 13. - P. 714-726. doi: 10.1038/nrc3599.

5. Румянцев А.А., Покатаев И.А., Тюляндин С.А. Современные аспекты антиангиогенной терапии при раке яичников // *Медицинский совет.* - 2018. - № 19. - С. 19-21. doi:10.21518/2079-701X-2018-19-17-21.

6. Bai L., Gao Ch., Liu Q., Yu C., Zhang Zh., Cai L., Yang B., Qian Y., Yang J., Liao X. Research progress in modern structure of platinum complexes. // *Eur. J. Med. Chem.* - 2017. - Vol. 140. - P. 349-382. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.034>.

7. Moreira-Pais A., Ferreira R., R.G. da Costa. Platinum-induced muscle wasting in cancer chemotherapy: Mechanisms and potential targets for therapeutic intervention // *Life Sciences.* - 2018. - Vol. 208. - P. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.010>.

8. Cheff D.M., Hall M.D. A drug of such damned nature. 1 Challenges and opportunities in translational platinum drug research // *J. Med. Chem.* - 2017. - Vol. 60. - P. 4517-4532. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01351.

9. Саяпин Ю.А., Гусаков Е.А., Дороган И.В., Тупаева И.О., Теймуразов М.Г., Фурсова Н.К., Овчинников К.В., Минкин В.И. Новый 2- (4h-1,3-бензоксазин-4-он-2-ил)-1,3-трополон: синтез, структура и антибактериальные свойства // *Биоорганическая химия*, 2016, том 42, № 2, с. 247-2522.

10. Патент на изобретение РФ № 2314295, МПК C07D 215/14, 2008 г.

11. Зыонг Нгиа Банг, Саяпин Ю.А., Хоанг Лам, Нгуен Данг Дык, Комиссаров В.Н.. Синтез и цитотоксическая активность производных [бензо[b][1,4]оксазепино[7,6,5-de]хинолин-2-ил]-1,3-трополонов // *Химия гетероциклических соединений.* - 2015. - 51(3). - С. 291-294.

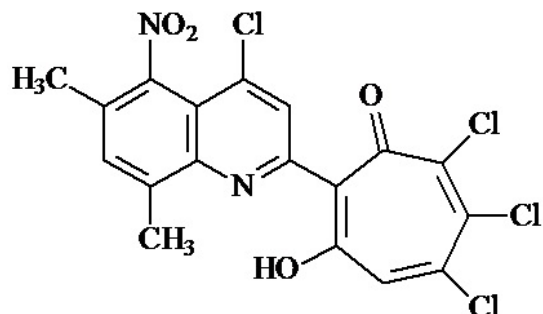


12. Патент на изобретение РФ № 2702648, МПК C07D 215/18, 2019 г.

13. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tool sincell biology: new insights into their cellular reduction // Biotechnology Annual Review. - 2005. - 11. - P. 127-152.

(57) Формула изобретения

1. Применение 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон формулы 1



в качестве средства, обладающего цитотоксической активностью в отношении культуры клеток немелкоклеточного рака легких А 549.

2. Применение 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон по п.1 для изготовления фармацевтической композиции.