



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07D 209/38 (2023.05); A61K 31/404 (2023.05); A61P 35/00 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022132458, 12.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.12.2022

Дата регистрации:
22.08.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 12.12.2022

(45) Опубликовано: 22.08.2023 Бюл. № 24

Адрес для переписки:
420088, Рес. Татарстан, г. Казань, ул. Арбузова,
8, Калачев Алексей Алексеевич

(72) Автор(ы):
Богданов Андрей Владимирович (RU),
Бурцева Екатерина Александровна (RU),
Волошина Александра Дмитриевна (RU),
Любина Анна Павловна (RU),
Амерханова Сюмбеля Камилевна (RU),
Алабугин Игорь Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
"ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
"КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК"
(RU)

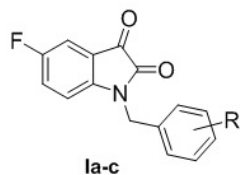
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: База данных PUBCHEM [онлайн]:
PUBCHEM CID: 28492795, create date
28.05.2009. База данных CHEMCATS [онлайн]:
RN1293108-44-7, 11.05.2011. Найдено в STN.
WO 1999065875 A1, 23.12.1999. WO 2017099695
A1, 15.06.2017. WO 2008074078 A1, 26.06.2008.
Lenar I. et al., Isatin derivatives in reactions with
phosphorus (III-V) compounds. Chemistry of
(см. прод.)

(54) Фторсодержащие бензилированные изатины, обладающие противоопухолевой активностью

(57) Реферат:

Изобретение относится к области органической химии, а именно к применению фторсодержащего бензилированного изатина общей формулы Ia-c. Технический результат: применение фторсодержащего бензилированного изатина общей формулы Ia-c в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью в отношении линий раковых клеток

аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (HuTu 80). 5 ил., 1 табл., 3 пр.



где R = 2-Cl (a), 2-F (b), 2-Cl-6-F (c).

(56) (продолжение):

Heterocyclic Compounds, 2015, v.51, No.5, pp.421-439. Bridges T.M. et al., Discovery of the First Highly M5-Preferring Muscarinic Acetylcholine Receptor Ligand, an M5 Positive Allosteric Modulator Derived from a Series of 5-

Trifluoromethoxy N-Benzyl Isatins. Journal of Medicinal Chemistry, 2009, v.52, No.11, pp.3445-3448. Богданов А.В. и др., Производные изатина, содержащие пространственно-затрудненный фенольный фрагмент, и водорастворимые ацилгидразоны на их основе: синтез и исследование антимикробной активности. Журнал общей химии, 2018, т.88, вып.1, с.61-71.

R U 2 8 0 2 0 1 6 C 1

R U 2 8 0 2 0 1 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 209/38 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07D 209/38 (2023.05); A61K 31/404 (2023.05); A61P 35/00 (2023.05)(21)(22) Application: **2022132458, 12.12.2022**(24) Effective date for property rights:
12.12.2022Registration date:
22.08.2023

Priority:

(22) Date of filing: **12.12.2022**(45) Date of publication: **22.08.2023** Bull. № 24

Mail address:

**420088, Res. Tatarstan, g. Kazan, ul. Arbuzova, 8,
Kalachev Aleksej Alekseevich**

(72) Inventor(s):

**Bogdanov Andrei Vladimirovich (RU),
Burtseva Ekaterina Aleksandrovna (RU),
Voloshina Aleksandra Dmitrievna (RU),
Liubina Anna Pavlovna (RU),
Amerkhanova Siumbelia Kamilevna (RU),
Alabugin Igor Vladimirovich (RU)**

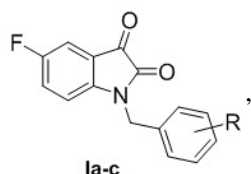
(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe uchrezhdenie nauki
"Federalnyi issledovatel'skii tsentr "Kazanskii
nauchnyi tsentr Rossiiskoi akademii nauk" (RU)**(54) **FLUORINE-CONTAINING BENZYLATED ISATINS WITH ANTITUMOR ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the use of fluorine-containing benzyl isatin of the general formula Ia-c.



where R = 2-Cl (a), 2-F (b), 2-Cl-6-F (c).

EFFECT: use of fluorine-containing benzyl isatin of the general formula Ia-c as an antitumor agent against human duodenal adenocarcinoma cancer cell lines (HuTu 80).

1 cl, 5 dwg, 1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области органической химии и фармацевтике, в частности, к новым фторсодержащим соединениям на основе изатина, которые могут найти применение в качестве противоопухолевых средств в фармацевтике, медицине и ветеринарии.

5 Несмотря на недавние достижения в диагностике и лечении, онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности людей во всем мире [Hanna, T.P.; King, W.D.; Thibodeau, S.; Jalink, M.; Paulin, G; Harvey-Jones, E.; O'Sullivan, D.E.; Booth, Ch.M.; Sullivan, R.; Aggarwal, A. Mortality due to cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2020, 371, m4087; Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, 10 A. *CA Cancer J. Clin.*, 2022, 72, 7-33]. Препараты, проходящие клинические испытания, или заявленные в качестве соединений, претендующих на высокую эффективность в лечении различных раковых заболеваний, зачастую терпят фиаско ввиду обнаружения у них токсических эффектов [Basak, D.; Arrighi, S.; Darwiche, Y.; Deb, S., Comparison of anticancer drug toxicities: paradigm shift in adverse effect profile. *Life*, 2022, 12, 48; Remesh, 15 A. Toxicities of anticancer drugs and its management. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.*, 2012, 1, 2-12]. С учетом имеющихся данных поиск новых противоопухолевых агентов с минимальным уровнем токсичности в отношении клеток организма человека при наличии селективности действия остается актуальной задачей.

Известно, что фторсодержащие соединения обладают противоопухолевой 20 активностью, воздействуя на процесс апоптоза по митохондриальному пути [Zhao, W.; Yang, Y.; Zhang, Y.-X.; Zhou, C.; Li, H.-M.; Tang, Y.-L.; Liang, X.-H.; Chen, T.; Tang, Y.-J. Fluoride-containing podophyllum derivatives exhibit antitumor activities through enhancing mitochondrial apoptosis pathway by increasing the expression of caspase-9 in HeLa cells. *Scientific Reports*, 2015, 5, 17175; Park, W.; Lim, W.; Park, S.; Whang, K.-Y.; Song, G. Exposure to 25 etoxazole induces mitochondria-mediated apoptosis in porcine trophectoderm and uterine luminal epithelial cells. *Environ. Pollution*, 2020, 257, 113480; Barbier, O.; Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L.M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* 2010, 188, 319-333].

Среди вновь выводимых на рынок препаратов примерно 25-30% содержат, по крайней 30 мере, один атом фтора [Nenajdenko V.G., Muzalevskiy V.M., Shastin, A.V. Polyfluorinated Ethanes as Versatile Fluorinated C2-Building Blocks for Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, 2015, 115, 973-1050; Zhou, Y.; Wang, J.; Gu, Zh.; Wang, Sh.; Zhu, W.; Acena, J.L.; Soloshonok, V.A.; Izawa, K.; Liu, H., Next generation of fluorine-containing pharmaceuticals, compounds currently in phase II-III clinical trials of major pharmaceutical companies: new structural trends and 35 therapeutic areas. *Chem. Rev.*, 2016, 116, 422-518]. При этом следует отметить, что введение атома фтора в целевую молекулу очень часто приводит к значительному усилению того или иного вида биологической активности и(или) расширению спектра действия [Smart, B., Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.*, 2001, 109, 3-11; Gillis, E.; Eastman, K.J.; Hill, M.D.; Donnelly, D.J.; Meanwell, N.A., Applications of fluorine in 40 medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*, 2015, 58, 8315-8359].

Пятичленные азотсодержащие гетероциклы ряда индола занимают особое место в этом ряду [Nosova, E.V.; Lipunova, G.N.; Charushin, V.N.; Chupakhin, O.N., Fluorine-containing indoles: synthesis and biological activity. *J. Fluor. Chem.*, 2018, 212, 51-106]. Ароматические и гетероароматические соединения, содержащие изотоп ^{18}F , используются как 45 радиометки в позитрон-эмиссионной томографии [Preshlock, S.; Tredwell, M.; Gouverneur, V., ^{18}F Labeling of arenes and heteroarenes for applications in positron emission tomography. *Chem. Rev.*, 2016, 116, 719-766].

Производные изатина представляют собой класс известных гетероциклов, способных

влиять на процессы жизнедеятельности раковых клеток за счет ингибирования или полного связывания ключевых ферментов. Известны соединения на основе изатина, эффективно ингибирующие действие многих ферментов (каспаза-3, каспаза-7, тирозинкиназы, альдегиддегидрогеназы, тубулин и др.), обуславливающих развитие раковых заболеваний [Guo, H.; Diao, Q.-P. The anti-breast cancer potential of bis-isatin scaffolds. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2020, 20, 1499-1503; Eldeeb, M.; Sanad, E.; Ragab, A.; Ammar, Y.A.; Mahmoud, Kh.; Ali, M.M.; Hamdy, N.M. Anticancer effects with molecular docking confirmation of newly synthesized isatin sulfonamide molecular hybrid derivatives against hepatic cancer cell lines. *Biomedicines*, 2022, 10, 722].

Бромид 2-[4-(5-фтор-2,3-диоксо-2,3-дигидроиндол-1-илметил)бензил]-изотиоурония обладает выраженной ингибирующей активностью в отношении ряда альдегиддегидрогеназ (ALDH). Эти ферменты представляют собой семейство белков-детоксификантов, которые избыточно экспрессируются при различных видах рака, что связывается с плохим прогнозом лечения и наличием резистентности. Из-за критической роли ALDH в развитии раковых стволовых клеток разрабатывается ряд водорастворимых солей тиурония на основе фторизатина [Dinavahi, S.S.; Gowda, R.; Bazewicz Ch.G.; Battu, M.B.; Lin, J.M.; Chitren, R.J.; Pandey, M.K.; Amin, Sh.; Robertson, G.P.; Gowda, K. Design, synthesis characterization and biological evaluation of novel multi-isoform ALDH inhibitors as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2020, 187, 111962].

Производное изатина, содержащее фрагмент артемизинина и атом фтора в положении 5, показало антипролиферативную активность в отношении клеточных линий рака легкого, устойчивых к действию цисплатина (A549/DDP) и доксорубина (A549/DOX) при отсутствии токсичности (IC_{50} : $>100 \mu M$, клетки эмбриональных фибробластов мыши) [Hou, H.; Qu, Bin.; Su, Chen.; Hou, G.; Gao, F. Design, synthesis and anti-lung cancer evaluation of 1,2,3-triazole tethered dihydroartemisinin-isatin hybrids. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 801580]. Сравнение влияния наличия заместителя в ароматическом фрагменте оксиндола показало, что замещение атома водорода на фтор в положение 5 значительно усиливает исследуемый вид активности.

Сунитиниб является самым известным представителем фторированных производных изатина, применяется в виде малата под торговым названием Сутент (SutentTM). Обладает ингибирующей активностью в отношении различных тирозинкиназ, участвующих в процессах роста опухолей, патологического ангиогенеза и образования метастазов [Moran, M.; Nickens, D.; Adcock, K.; Bennetts, M.; Desscan, A.; Charnley N.; Fife, K. Sunitinib for metastatic renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of real-world and clinical trials data. *Targeted Oncology* 2019, 14, 405-416]. Комбинация малата сунитиниба с темизиролимом (ToriselTM, иммунодепрессант ряда рапамицинов) предложена как противоопухолевое средство, в частности для лечения карциномы почки человека [US20070105887, 10.05.2007].

Установлено, что производные изатина с атомом фтора и заместителем на периферии обладают противоопухолевой активностью. Например, изатин-5-сульфонамид, содержащий 4-фторбутильную группу, обладает ингибирующей активностью против каспазы-3 (IC_{50} 3.9 нМ). При этом его радиоизотопный аналог ^{18}F в последнее время рассматривается как мишень-ориентированная метка на определение каспаз, участвующих в процессе апоптоза [Limpachayaporn, P.; Schäfers, M.; Haufe, G. Isatin sulfonamides: potent caspases-3 and -7 inhibitors, and promising PET and SPECT radiotracers for apoptosis imaging. *Future Med. Chem.* 2015, 7, 1173-1196].

Производные изатина, содержащие атом фтора как в ароматическом кольце, так и

в структуре заместителя, обладают широким спектром противоопухолевой активности. Так, имеются сведения о 3-гидрокси-3-фенацил-5-фториндолин-2-онах, являющихся ингибиторами фермента β -катенина, ответственного за развитие канцерогенеза толстой кишки [US9616047, 11.04.2017]. Активность против меланомы, лимфомы, рака простаты, 5
поджелудочной железы, яичников [US9828342, 28.11.2017] проявляют 5-(фторпиридил)-1-циннамиллизатины.

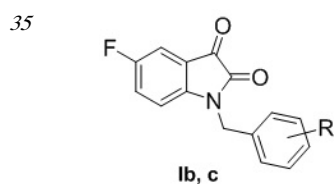
Таким образом, анализ современной литературы указывает на перспективность поиска противоопухолевых соединений на основе фторсодержащих производных изатина.

10 Из уровня техники известно соединение 1-(2-хлорбензил)-5-фториндолин-2,3-дион, который является наиболее близким по структуре к заявляемым соединениям, описан в статье [Bridges, Th.M.; Marlo, J.E.; Niswender, C.M.; Jones, C.K.; Jadhav, S.B.; Gentry, P.R.; Plumley, H.C.; Weaver, C.D.; Conn, P.J.; Lindsley, C.W. Discovery of the first highly M5-
15 preferring muscarinic acetylcholine receptor ligand, an M5 positive allosteric modulator derived from a series of 5-trifluoromethoxy N-benzyl isatins. J. Med. Chem., 2009, 52, 3445-3448] как модулятор антихолинэстеразной активности. В патенте [CN105541808, 2016-05-04] описывают синтез гибридного соединения метронидазола с изатином для получения антибактериальных лекарственных средств. В статье [Wang, J.; Wang, G.; Xie, Z.; Peng, Y.; Li, L.; Deng, B.; Chen, M.; Chen, Sh.; Li, W. Synthesis, biological activity and docking study
20 of isatin hydrazone derivatives as potential α -glucosidase inhibitors. Lat. Am. J. Pharm., 2017, 36, 1533-1538] описано получение производных изатингидазона и дана оценка их ингибиторной активности в отношении α -глюкозидазы для лечения сахарного диабета II типа. Однако из уровня техники противоопухолевые свойства 1-(2-хлорбензил)-5-фториндолин-2,3-диона не известны.

25 Техническая проблема, на решение которой направлено заявляемое изобретение, состоит в расширении ассортимента противоопухолевых средств, инициирующих и реализующих апоптоз по митохондриальному пути.

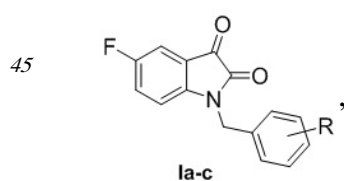
Техническим результатом являются новые противоопухолевые средства, расширяющие арсенал средств указанного назначения, способные эффективно
30 приводить к апоптозу по внутреннему митохондриальному пути, тем самым подавляя рост раковых клеток.

Указанная техническая проблема решается, и технический результат достигается новыми соединениями - заявляемыми фторсодержащими бензилированными производными изатина общей формулы I



40 где R = 2-F (b), 2-Cl-6-F (c).

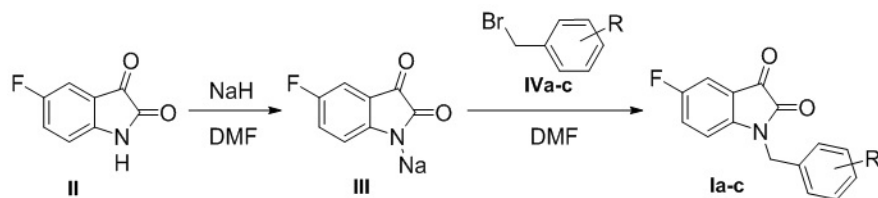
Техническая проблема также решается, и технический результат достигается применением заявляемых фторсодержащих бензилированных производных изатина общей формулы I



где R = 2-Cl (a), 2-F (b), 2-Cl-6-F (c),

в качестве соединений, обладающих противоопухолевой активностью.

Заявляемые соединения общей формулы I получают по методике, аналогичной описанной в статье [Isatin derivatives bearing a fluorine atom. Part 1: Synthesis, hemotoxicity and antimicrobial activity evaluation of fluoro-benzylated water-soluble pyridinium isatin-3-acylhydrazones / Andrei V. Bogdanov, Ilyuzha F. Zaripova, Alexandra D. Voloshina, Anastasia S. Sapunova, Natalia V. Kulik, Irina V. Tsivunina, Alexey B. Dobrynin, Vladimir F. Mironov // Journal of Fluorine Chemistry, 2019, Vol. 227, Art. No. 109345. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2019.109345>] по схеме:



R = 2-Cl (a); R = 2-F (b); R = 2-Cl-6-F (c)

взаимодействием при эквимольном соотношении 5-фторизатина (II) с гидридом натрия (NaH) до образования натриевой соли 5-фторизатина (III) и последующим добавлением эквимольного количества бромметилгалогенбензола (IVa-c). Затем раствор выливают в охлажденную воду. Осадок отфильтровывают, промывают и сушат до постоянной массы. Выход продуктов (Ia-c) 89-97%. Получают соединения Ia и Ib в виде порошков красного цвета и соединение Ic оранжевого цвета.

Характеристики соединений формулы I приведены в соответствующих примерах, иллюстрирующих изобретение.

При получении и выделении заявляемых соединений используют коммерчески доступные реагенты:

- 5-фторизатин (II) (CAS 443-69-6, Sigma-Aldrich),
- бромметилгалогенбензолы (IVa-c) (CAS 611-17-6, 446-48-0, 68220-26-8, Sigma-Aldrich),
- растворитель *N,N*-диметилформамид (хч, фирмы ЭКОС).

При реализации изобретения использованы следующие приборы и оборудование. ИК-спектрометр. ИК-Фурье-спектрометр Tensor 37 Vertex 70 RAM II Bruker Optic GmbH (Германия).

ЯМР-спектрометр. ЯМР-Фурье спектрометр AVANCE 600 BRUKER BioSpin (Германия), высокоэффективный цифровой ЯМР спектрометр AVANCE ПТМ 400МГц BRUKER BioSpin (Германия).

Масс-спектрометр. Масс-спектрометр с ионной ловушкой и ионизацией электрораспылением (ESI) Amazon XBruker Daltonix GmbH (Германия)

Элементный анализатор. Элементный CHNS-О высокотемпературный анализатор EuroEA 3028-НТ-ОМ Eurovector S.p.A. (Италия).

Прибор Stuart SMP10 (Великобритания) для определения температуры плавления.

Заявленные соединения исследованы на цитотоксичность в отношении нормальных клеток линии печени (Chang liver) и в отношении раковых клеточных линий, полученных из Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук». Предлагаемые соединения проявляют активность в отношении раковых линий: эпителиоидной карциномы шейки матки, сублиния HeLa, клон 11 (M-HeLa) и аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80).

Цитотоксическое действие заявляемых соединений в отношении раковых и нормальных клеточных линий оценивают в сравнении с действием известных,

применяемых в настоящее время, фторсодержащих противоопухолевых препаратов - тамоксифен (ТАМ), и 5-фторурацил (5-FU) по значению IC_{50} - концентрации полумаксимального ингибирования исследуемого соединения, которая вызывает гибель 50% клеток в тестируемой популяции [Smolobochkin A.V., Gazizov A.S., Yakhshilikova L.J., Bekrenev D.D., Burilov A.R., Pudovik M.A., Lyubina A.P., Amerhanova S. K. and Voloshina A.D. Synthesis and Biological Evaluation of Taurine-Derived Diarylmethane and Dibenzoxanthene Derivatives as Possible Cytotoxic and Antimicrobial Agents. // Chem. Biodiversity. 2022. Vol. 19. e202100970. 10.1002/cbdv.202100970]. Расчет IC_{50} , концентрации тестируемого соединения, вызывающей подавление роста клеток на 50%, производился с помощью программы: AAT Bioquest, Inc. (2022, March 17). Quest Graph™ IC_{50} Calculator. AAT Bioquest.

Данные по цитотоксической активности (IC_{50}) и селективности (SI) заявляемых средств и препаратов сравнения представлены в таблице.

Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) составили в отношении:

- карциномы шейки матки M-HeLa для Ia - 32,1 мкМ, для Ib - 74,6 мкМ, для Ic - 53,8 мкМ, для тамоксифена (ТАМ) и 5-фторурацила (5-FU) - 28,0 мкМ и 62,0 мкМ соответственно,

- аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu-80 для Ia - 38,3 мкМ, Ib - 25,2 мкМ, Ic - 31,0 мкМ, для препарата сравнения 5-FU - 65,2 мкМ.

Заявляемые соединения проявляют умеренную активность в отношении раковых линий, использованных в экспериментах, и демонстрируют умеренную и низкую (для соединения Ic) цитотоксичность в отношении линии нормальных клеток печени человека Chang liver. Наибольшей активностью в отношении раковых линий карциномы шейки матки (M-HeLa) обладает соединение Ia, которое в 2,0 раза превышает по активности препарат сравнения 5-фторурацил. В отношении аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80) наибольшей активностью обладает соединение Ib, которое в 2,6 раза превышает по активности препарат сравнения 5-фторурацил.

Селективность соединений в отношении раковых клеток является важным критерием оценки цитотоксического действия. Для ее оценки рассчитывают индекс селективности (SI) как отношение между значением IC_{50} для нормальных клеток и значением IC_{50} для раковых клеток. Соединения с $SI \geq 3$ можно считать селективными [M. Ayoup, Y. Wahby, H. Abdel-Hamid, E. Ramadan, M. Teleb, M. Abu-Serie, A. Noby, Design, synthesis and biological evaluateсть еption of novel a-acyloxy carboxamides via Passerini reaction as caspase 3/7 activators, Eur. J. Med. Chem. 168 (2019) 340-356. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.051].

Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) нормальных клеток печени Chang liver составили для Ia - 71,5 мкМ, для Ib - 53,0 мкМ, для Ic - 100,0 мкМ, для препаратов сравнения ТАМ и 5-FU - 46,2 мкМ, и 19,0 мкМ соответственно.

Данные показывают, что все заявляемые соединения проявляют активность в отношении культуры клеток печени Chang liver в значительных концентрациях, в отличие от препаратов сравнения ТАМ и 5-FU, проявляющих активность в отношении культуры клеток печени Chang liver в концентрациях в 2-5 раз меньших.

Значения селективности (SI) для заявленных соединений составили в отношении:

- карциномы шейки матки (M-HeLa) для Ia - 2,2, для Ic - 1,9, для ТАМ - 1,7, для остальных - ниже единицы (<1);

- аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu-80) для Ia - 1,8, для Ib - 2,1, для Ic - 3,2, для 5-FU - ниже единицы (<1), для ТАМ - нет данных.

Значения селективности (SI), указанные в таблице, свидетельствуют, что заявляемые соединения проявляют селективность и в этом превосходят препараты сравнения ТАМ и 5-FU. Значения индексов селективности заявляемых соединений составили 1,8-3,2.

При этом токсичность Ia и Ib на линии нормальных клеток печени оказалась значительно ниже (в 3,9 для Ia и в 2,8 для Ib раза), чем у препарата сравнения 5-FU. Соединение Ic показал наилучшую селективность по отношению к клеточным линиям HuTu 80. Значения SI для этой линии составило (3.2). Препараты сравнения ТАМ и 5-FU значительно уступают по селективности заявляемым соединениям.

Гемолитическая активность соединений.

Важной характеристикой при оценке биологической активности новых химических соединений является их цитотоксическое действие по отношению к клеткам млекопитающих. Способность заявляемых соединений вызывать разрушение эритроцитов крови человека иллюстрирует их токсическое действие на внутреннюю среду организма. Анализ гемолиза является простым скрининг-тестом, результаты которого могут помочь при изучении цитотоксичности на более сложных моделях [Tramer, F.; Da Ros, T.; Passamonti, S. Screening of Fullerene Toxicity by Hemolysis Assay. Meth. Molecular Biol. 2012, 926, 203-217]. Данные по гемолитической активности представлены значениями HC_{50} (концентрация заявляемого соединения HC_{50} , которая вызывает 50% гемолиз эритроцитов в опыте), и составляют для соединений Ia-c >100 мкМ, что означает, что соединения Ia-c не обладают гемолитической активностью т.е., не способны разрушать эритроциты крови человека, что свидетельствует об их нетоксичности.

Апоптоз является одним из наиболее важных механизмов, используемых для скрининга новых противораковых агентов. Заявляемые соединения вызывают апоптоз опухолевых клеток, что подтверждено методом проточной цитометрии (Guava easy Cyte, MERCK, США) [Voloshina, A.D.; Sapunova, A.S.; Kulik, N.V.; Belenok, M.G.; Strobykina, I.Yu.; Lyubina, A.P.; Gumerova, S.K.; Kataev, V.E. Antimicrobial and cytotoxic effects of ammonium derivatives of diterpenoids steviol and isosteviol. Bioorg. Med. Chem. 2021, 32, 115974]. На фигуре 1 представлены апоптотические эффекты, индуцируемые соединениями Ia, Ib и Ic в концентрациях $IC_{50}/2$ и IC_{50} на клеточной линии HuTu 80.

На фигуре 1 показано распределение живых, мертвых, а также клеток в раннем и позднем апоптозе после 24-часовой инкубации с соединениями Ia-c (в концентрациях 12,5-40 мкМ (средние и правые гистограммы), из расчета концентраций $IC_{50}/2$ и IC_{50} , с контролем - опухолевые клетки без обработки (левая гистограмма).

Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение (3 повторности), L - живые клетки; D - мертвые клетки; Ea - клетки в раннем апоптозе; La - клетки в позднем апоптозе.

Из представленных данных видно, что после 24-часовой инкубации заявляемые соединения начинают индуцировать апоптоз в клетках HuTu80. Так, после взаимодействия Ia с клетками линии HuTu 80 доля мертвых клеток составила (L - 95,45%, D - 4,24% в контроле, L - 70,89%, D - 19,60% для концентрации 20 мкМ и L - 43,95%, D - 20,63% для концентрации 40 мкМ), а также клеток в позднем апоптозе (Ea - 0,00%, La - 0,30% в контроле, Ea - 1,78%, La - 7,72% для концентрации 20 мкМ, Ea - 12,11%, La - 23,32% для концентрации 40 мкМ).

Для соединения Ib доля мертвых клеток составила (L - 71,33%, D - 21,26% для концентрации 12,5 мкМ и L - 48,33%, D - 26,20% для концентрации 25 мкМ), а также клеток в позднем апоптозе (Ea - 1,10%, La - 6,30% для концентрации 12,5 мкМ, Ea -

7,57%, La - 17,90% для концентрации 20 мкМ).

Для соединения Ic доля мертвых клеток составила (L - 60,42%, D - 23,08% для концентрации 15 мкМ и L - 53,09%, D - 18,260% для концентрации 30 мкМ), а также клеток в позднем апоптозе (Ea - 7,77%, La - 8,73% для концентрации 15 мкМ, Ea - 14,89%, La - 13,76% для концентрации 30 мкМ).

Таким образом, апоптотические дозозависимые эффекты более активно проявляются в случае соединений Ia и Ib с преобладанием в стадии позднего апоптоза. Для соединения Ic количество клеток в стадиях раннего и позднего апоптоза примерно одинаково.

Потенциал митохондриальной мембраны.

Изменение мембранного потенциала митохондрий приводит к запуску апоптоза в раковых клетках. Измерения проводят с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентного красителя JC-10 (в наборе Mitochondria Membrane Potential Kit). В нормальных клетках (с высоким мембранным потенциалом) JC-10 накапливается в митохондриальном матриксе, где образует агрегаты с красной флуоресценцией. Однако в апоптотических клетках JC-10 диффундирует из митохондрий, превращается в мономерную форму и испускает зеленую флуоресценцию, которую регистрирует проточный цитометр [Andreeva, O.V.; Sapunova, A.S.; Lyubina, A.P.; Amerhanova, S.K.; Belenok, M.G.; Saifina, L.F.; Semenov, V.E.; Kataev, V.E. Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of triphenylphosphonium (TPP) conjugates of 1,2,3-triazolyl nucleoside analogues. Bioorg. Chem. 2021, 116, 105328].

После обработки соединениями Ia, Ib и Ic наблюдают снижение митохондриального мембранного потенциала клеток HuTu 80, которое становятся более выраженными в концентрациях, соответствующих значениям IC₅₀ соединений Ia, Ib и Ic. На фигуре 2 представлены результаты воздействия соединений Ia, Ib и Ic на мембранный потенциал митохондрий после 24-часовой инкубации с заявляемыми соединениями, где интенсивность зеленой флуоресценции значительно увеличивается по сравнению с контролем (необработанные клетки - левая гистограмма).

Как видно фигуре 2, соединение Ia приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала клеток HuTu 80, которое в контроле составляет 98,36% (левая гистограмма), для клеток HuTu 80, обработанных соединением Ia в концентрации 20 мкМ, - 77,80% (средняя гистограмма), и в концентрации 40 мкМ - 46,73% (правая гистограмма). При этом интенсивность зеленой флуоресценции составляет 21,22% (при 20 мкМ) и 51,75% (при 40 мкМ), что в 13,4 и 32,7 раз соответственно превышает значения контроля 1,58% (клетки HuTu 80).

Соединение Ib приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала клеток HuTu 80 при концентрации 12,5 мкМ - 82,90%, (средняя гистограмма) и при концентрации 25 мкМ - 53,88% (правая гистограмма). При этом интенсивность зеленой флуоресценции составляет 17,10% (при 12,5 мкМ) и 45,00% (при 25 мкМ), что в 10,8 и 28,5 раз соответственно превышает значения контроля 1,58% (клетки HuTu 80).

Соединение Ic также приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала клеток HuTu 80 при концентрации 15 мкМ - 63,75%, (средняя гистограмма) и при концентрации 30 мкМ - 44,50% (правая гистограмма). При этом интенсивность зеленой флуоресценции составляет 33,42% (при 15 мкМ) и 54,66% (при 30 мкМ), что в 31,1 и 34,6 раз соответственно превышает значения контроля 1,58% (клетки HuTu 80).

На фигуре 3 визуализировано в виде столбиков количественное распределение нормальных клеток HuTu 80 (с красной флуоресценцией JC-10) и апоптотических клеток (с зеленой флуоресценцией JC-10) после обработки соединениями Ia-с в вышеуказанных концентрациях по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что механизм действия заявляемых соединений связан с индукцией апоптоза, протекающего по внутреннему митохондриальному пути, приводящему к дисфункции митохондрий (фиг. 2 и 3).

Продукция активных форм кислорода.

5 Увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) заявляемыми соединениями также характеризует развитие апоптоза по митохондриальному пути. Митохондрии являются потенциальным источником и мишенью АФК. АФК приводит к нарушению функций митохондрий и, как следствие, к необратимому повреждению клеток [Mironov, V.F.; Nemtarev, A.V.; Tsepaeva, O.V.; Dimukhametov, M.N.; Litvinov, I.A.; Voloshina, A.D.;
10 Pashirova, T.N.; Titov, E.A.; Lyubina, A.P.; Amerhanova, S.K.; Gubaidullin, A.T.; Islamov, D.R. Rational design 2-hydroxypropylphosphonium salts as cancer cell mitochondria-targeted vectors: synthesis, structure, and biological properties. *Molecules*. 2021, 26, 6350]. Влияние соединений Ia, Ib и Ic в клетках HuTu 80 на индукцию продукции АФК с использованием анализа проточной цитометрии и набора для проточной цитометрии CellROX® Deep Red
15 представлены на фиг. 4. Данные показывают значительное дозозависимое увеличение интенсивности флуоресценции CellROX® Deep Red для соединений Ia и Ib. Для соединения Ia при концентрации 20 мкМ индукция продукции АФК составляет 150 и 370 (при 40 мкМ), что в 4,3 и 10,6 раз соответственно превышает значение контроля 35 или клеток HuTu 80. Для соединения Ib при 12,5 мкМ индукция продукции АФК составляет 37 и
20 250 (при 25 мкМ), что в 1,1 и 7,1 раз соответственно превышает значения контроля 35. Это свидетельствует об увеличении продукции АФК в присутствии данных соединений. Соединение Ic обладает меньшей интенсивностью продуцировать АФК в клетках HuTu 80 - до 65 (при 15 мкМ) и до 100 (при 30 мкМ), что превышает значение контроля в 1,9 и 2,9 раз соответственно.

25 Влияние на клеточный цикл HuTu 80.

Действие цитотоксических агентов зачастую связано с нарушением прохождения эукариотическими клетками фазу клеточного цикла. При этом происходит синхронизация и замедление пролиферации популяции быстро размножающихся клеток. Анализ клеточного цикла путем количественного определения содержания ДНК в
30 клетке является надежным методом исследования, который позволяет оценить на какой фазе клеточный цикл был остановлен. Метод исследует фазы клеточного цикла [Han, Ju.; Kurita, Yu.; Isoda, H. Genistein-induced G2/M cell cycle arrest of human intestinal colon cancer Caco-2 cells is associated with Cyclin B1 and Chk2 down-regulation. *Cytotechnology*. 2013, 65, 973-978]: оценивает распределение клеток по G1/G0-, S- и G2/M-фазам
35 клеточного цикла посредством определения относительного содержания ДНК в клетках при помощи ДНК-связывающих флуоресцентных красителей, таких как PI (йодистый пропидий), 7-AAD (7-аминоактиномицин), DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)), Hoechst, SybrGreen и др.

Аномалии клеточного цикла, выявляемые на гистограмме частот содержания ДНК,
40 наблюдают после различных типов повреждений клеток, в том числе после воздействия на них химических агентов. Исследования клеточного цикла проводят после воздействия соединениями Ia, Ib и Ic на клеточной линии HuTu 80 в концентрациях IC₅₀/2 и IC₅₀ при помощи флуоресцентного красителя иодида пропидия (PI) (Sigma-Aldrich, MERCK, США). Интенсивность флуоресценции окрашенных клеток коррелирует с количеством
45 содержащейся в них ДНК.

Данные анализа клеточного цикла после обработки заявляемыми соединениями в течение 24 часов в концентрациях IC₅₀/2 и IC₅₀ на клеточной линии HuTu 80 показывают достоверную задержку клеток в фазе G0/G1 по сравнению с контролем (фиг. 5). G1-

фаза особенно важна для клеточного цикла, потому что в этот период клетка определяет, будет ли она делиться или покинет клеточный цикл [Morgan, D. The Cell Cycle: Principals of Control. London: New Science Press LTD, 2007. Print]. Если клетка остаётся неделящейся вместо перехода в S-фазу, она покидает G1-фазу и переходит в состояние покоя, называемое G0-фазой. Остановка клеточного цикла потенциальными 5 противоопухолевыми агентами в G1-фазе может предотвратить разрастание опухоли, не давая опухолевым клеткам вступать в S-фазу, предотвращая деление и распространение клеток.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что механизм действия 10 заявляемых соединений связан с индукцией апоптоза, протекающего по внутреннему митохондриальному пути, приводящему к дисфункции митохондрий и с остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1 (фиг. 5).

Изобретение иллюстрируется примерами получения соединений Ia-c.

Пример 1. Синтез 1-(2-хлорбензил)-5-фториндолин-2,3-диона (Ia).

К перемешиваемому с помощью магнитной мешалки (ULAB US-1500D, ULAB) 15 раствору (4,7 ммоль) 5-фторизатина (CAS 443-69-6, Sigma-Aldrich) (II) в сухом ДМФ (хч, фирмы ЭКОС) (10 мл) небольшими порциями при 20°C добавляют NaN (CAS 7646-69-7, 60 % dispersion in mineral oil, Sigma-Aldrich) (4,7 ммоль, 60% суспензия в минеральном масле), перемешивают в течение 30 минут реакционной смеси добавляют 1-бромметил- 20 2-хлорбензол (CAS 611-17-6, Sigma-Aldrich) (IVa) (4,7 ммоль) и перемешивают при 25°C в течение 3 часов. Затем раствор выливают в смесь измельченного 20 г льда с 200 мл водой (дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018). Образовавшийся осадок отфильтровывают, последовательно промывают на фильтре холодной водой (50 мл), петролейным эфиром ($T_{кип}$ 40-70°C) (хч, ЭКОС) (20 мл) и сушат в вакууме водоструйного 25 насоса при температуре 25°C до постоянной массы. Выход продукта (Ia) 89%. Порошок красного цвета, $T_{пл}$ = 127-129°C. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1733 уш. (C=O вал.), 1620 (C=C вал.), 1486 (C-N вал.). ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$): δ 5.06 (с, 2H, CH_2), 6.74 (дд, $J(FH)$ = 8.6 Гц, $J(HH)$ = 3.6 Гц, 1H, CH), 7.19-7.29 (м, 4H, CH_{Bn}), 7.34 (дд, $J(FH)$ = 2.7 Гц, $J(HH)$ = 6.5 30 Гц, 1H, CH), 7.43 (дм, 1H, CH). ЯМР ^{13}C (100 МГц, $DMCO-d_6$) δ 182.1 (д, $J(FC)$ = 1.6 Гц), 158.6 (д, $J(FC)$ = 241.2 Гц), 158.5, 146.4, 132.2, 131.8, 129.5, 129.3, 128.3, 127.4, 123.8 (д, $J(FC)$ = 24.0 Гц), 118.9 (д, $J(FC)$ = 17.0 Гц), 112.2 (д, $J(FC)$ = 7.6 Гц), 111.5 (д, $J(FC)$ = 24.4 Гц), 41.2. Масс-спектр (ESI): m/z 290.06 $[M+H]^+$. Элементный анализ. $C_{15}H_9ClFNO_2$. 35 Вычислено, %: C, 62.19; H, 3.13; Cl, 12.24; F, 6.56; N, 4.84; Найдено, %: C, 61.95; H, 3.2; Cl, 12.00; F, 6.40; N, 4.79.

Пример 2. Синтез 1-(2-фторбензил)-5-фториндолин-2,3-диона (Ib).

Пример 2 осуществляют аналогично примеру 1, из 4,7 ммоль 5-фторизатина (II), NaN 40 (4,7 ммоль, 60% суспензия в минеральном масле) и 4,7 ммоль 1-бромметил-2-фторбензола (CAS 446-48-0, Sigma-Aldrich) (IVb) (4,7 ммоль) получают 93% соединения (Ib). Порошок красного цвета, $T_{пл}$ = 124-126°C. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 1732 уш. (C=O вал.), 1621 уш. (C=C вал.), 1488 (C-N вал.). ЯМР 1H (600 МГц, $CDCl_3$): δ 4.97 (уш. с, 2H, CH_2), 6.88 (дд, $J(FH)$ = 8.6 Гц, $J(HH)$ = 3.6 Гц, 1H, CH), 7.08-7.15 (м, 2H, CH_{Bn}), 7.24 (дт, $J(FH)$ = 2.7 Гц, $J(HH)$ = 8.7 Гц, 1H, CH_{Bn}), 7.28-7.37 (м, 3H, CH_{Bn}). ЯМР ^{13}C (150 МГц, $CDCl_3$) δ 182.4, 160.6 (д, $J(FC)$ = 246.5 Гц), 159.4 (д, $J(FC)$ = 246.1 Гц), 158.1, 146.5, 130.3 (д, $J(FC)$ = 8.1 Гц), 130.0 (д, $J(FC)$ = 1.8 Гц), 124.9 (д, $J(FC)$ = 1.4 Гц), 124.7 (д, $J(FC)$ = 24.2 Гц), 121.4 (д, $J(FC)$ = 14.2 45

Гц), 118.3 (д, $J(\text{FC}) = 6.9$ Гц), 115.8 (д, $J(\text{FC}) = 21.6$ Гц), 112.4 (д, $J(\text{FC}) = 24.2$ Гц), 111.9 (д, $J(\text{FC}) = 3.0$ Гц), 37.4 (д, $J(\text{FC}) = 4.0$ Гц). Масс-спектр (ESI): m/z 274.06 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Элементный анализ. $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_2\text{NO}_2$. Вычислено, %: С, 65.94; Н, 3.32; F, 13.91; N, 5.13; Найдено, %: С, 65.87; Н, 3.23; F, 13.71; N, 5.04.

Пример 3. Синтез 1-(2-хлор-6-фторбензил)-5-фториндолин-2,3-диона (Ic).

Пример 3 осуществляют аналогично примеру 1, из 4.7 ммоль 5-фторизатина (II), NaH (4.7 ммоль, 60% суспензия в минеральном масле) и 4.7 ммоль 1-бромметил-2-фтор-6-хлорбензола (CAS 68220-26-8, Sigma-Aldrich) (IVc) (4.7 ммоль) получают 97% соединения

(Ic). Порошок оранжевого цвета, $T_{\text{пл}} = 160-162^\circ\text{C}$. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 1772 уш. (C=O

вал.), 1745 уш. (C=O вал.), 1624 (C=C вал.), 1608 (C=C вал.), 1487 (C-N вал.). ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3): δ 5.12 (д, $J(\text{FH}) = 0.8$ Гц, 2H, CH_2), 6.80 (дд, $J(\text{FH}) = 8.5$ Гц, $J(\text{HH}) = 3.6$ Гц, 1H, CH), 7.02-7.07 (м, 1H, CH_{Bn}), 7.20 (дт, $J(\text{FH}) = 2.7$ Гц, $J(\text{HH}) = 8.7$ Гц, 1H, CH_{Bn}),

7.24-7.32 (м, 3H, CH_{Bn}). ЯМР ^{13}C (100.5 МГц, $\text{DMCO}-d_6$) δ 182.2, 161.4 (д, $J(\text{FC}) = 249.7$ Гц), 158.4 (д, $J(\text{FC}) = 241.6$ Гц), 157.8, 146.8, 134.4 (д, $J(\text{FC}) = 5.3$ Гц), 130.9 (д, $J(\text{FC}) = 10.0$ Гц), 125.9 (д, $J(\text{FC}) = 2.9$ Гц), 124.3 (д, $J(\text{FC}) = 24.2$ Гц), 120.3 (д, $J(\text{FC}) = 16.4$ Гц), 118.5 (д, $J(\text{FC}) = 7.4$ Гц), 114.9 (д, $J(\text{FC}) = 22.5$ Гц), 112.0 (д, $J(\text{FC}) = 6.3$ Гц), 111.6 (д, $J(\text{FC}) = 24.5$

Гц), 36.2 (д, $J(\text{FC}) = 3.2$ Гц). Масс-спектр (ESI): m/z 307.02 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$. Элементный анализ. $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{ClF}_2\text{NO}_2$. Вычислено, С, 58.55; Н, 2.62; Cl, 11.52; F, 12.35; N, 4.55; Найдено, %: С, 58.43; Н, 2.47; Cl, 11.41; F, 12.20; N, 4.42.

Таким образом, предложены соединения, расширяющие арсенал противоопухолевых средств - фторсодержащие бензилированные изатины, обладающие противоопухолевой активностью. Соединения, два из которых являются новыми, не обладают гемолитической активностью, менее токсичны в отношении линии нормальных клеток печени человека Chang Liver, проявляют селективность против линий раковых клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (HuTu 80) и превосходят по цитотоксичности и селективности препарат сравнения 5-фторурацил. Механизм действия заявляемых соединений связан с индукцией апоптоза, протекающего по внутреннему митохондриальному пути. Все вышесказанное делает их перспективными в качестве противоопухолевых агентов нового поколения.

Таблица

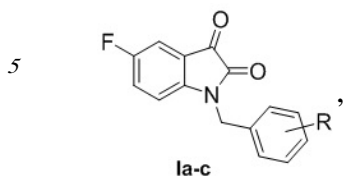
Цитотоксические эффекты и значения индекса селективности (SI) исследуемых соединений и веществ сравнения

Соединения	Опухолевые линии				Нормальные клеточные линии c Chang liver IC ₅₀
	a M-HeLa		b HuTu 80		
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	
Ia	32,1±2,5	2,2	38,3±3,0	1,8	71,5±5,6
Ib	74,6±5,9	нс	25,2±1,9	2,1	53,0±4,2
Ic	53,8±4,3	1,9	31,0±2,4	3,2	100,0
TAM	28,0±2,5	1,7	нд	^d	46,2±3,5
5-FU	62,0±4,9	нс	65,2±5,6	нс	19,0±1,7

a M-HeLa - эпителиоидная карцинома шейки матки человека; b HuTu-80 - аденокарцинома двенадцатиперстной кишки человека; c Chang liver - гепатоцит человека; ^d - не рассчитывался по причине отсутствия активности; TAM - тамоксифен, 5-FU - 5-фторурацил. н.с. - нет селективности; н.а. - неактивен. Опыты повторялись трижды.

(57) Формула изобретения

Применение фторсодержащего бензилированного изатина общей формулы



где R = 2-Cl (a), 2-F (b), 2-Cl-6-F (c),

10 в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью в отношении клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (HuTu80).

15

20

25

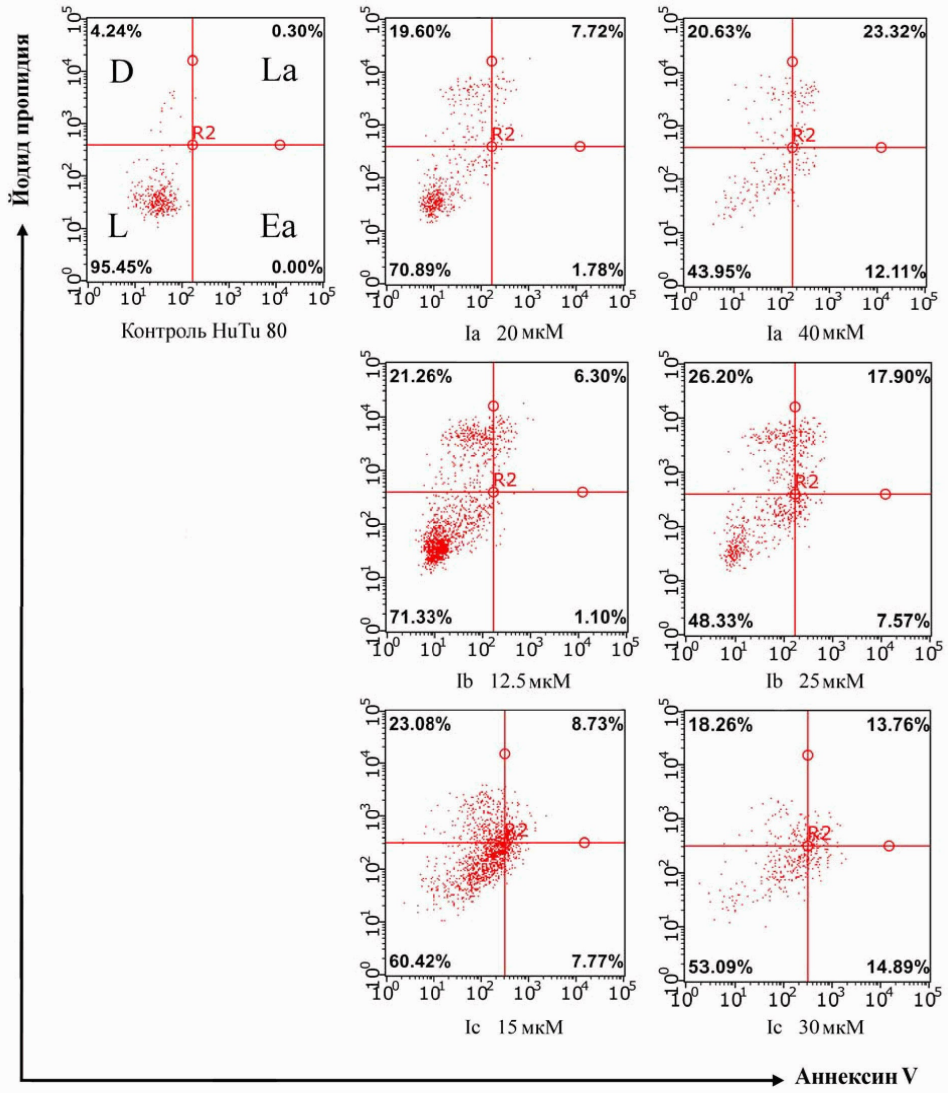
30

35

40

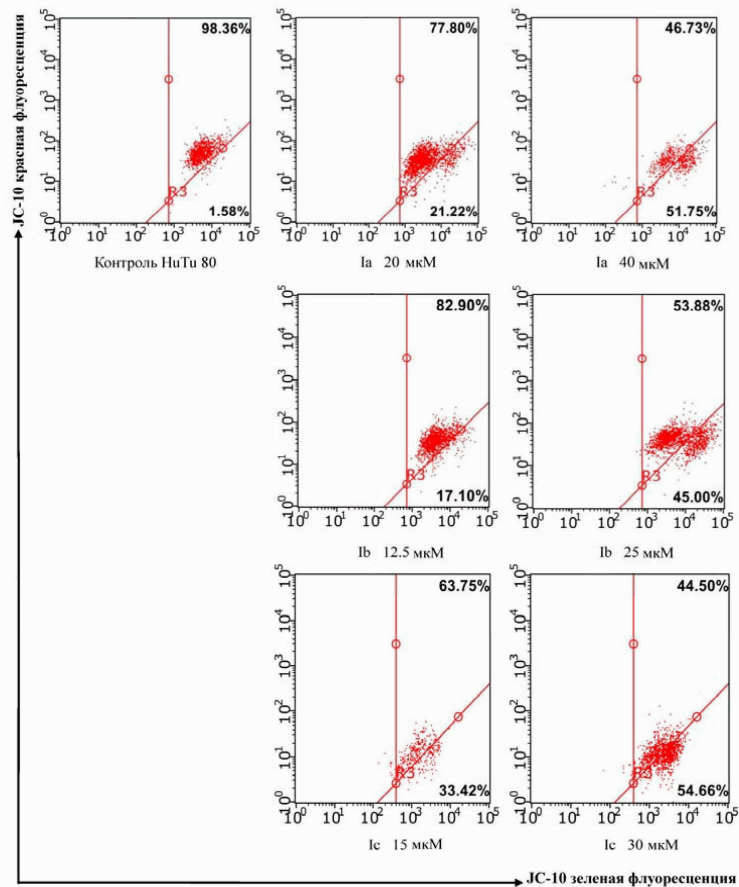
45

1

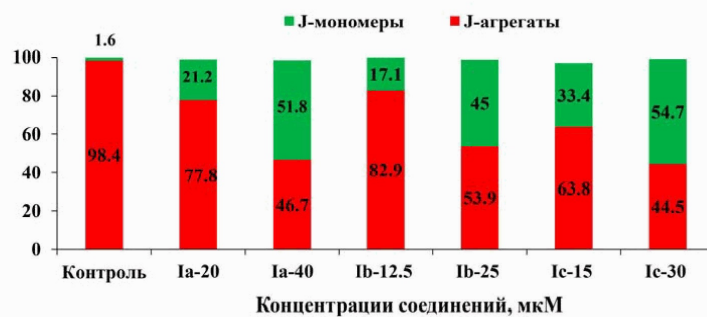


Фиг. 1

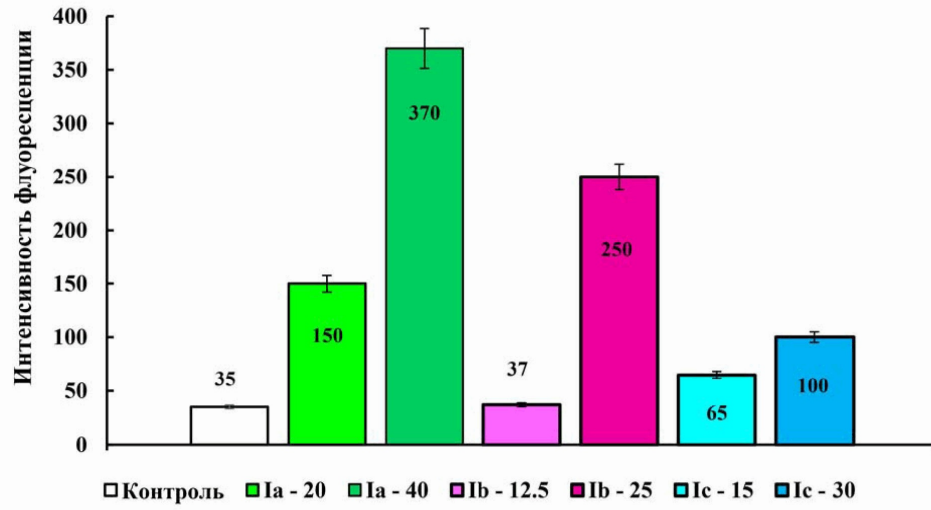
2



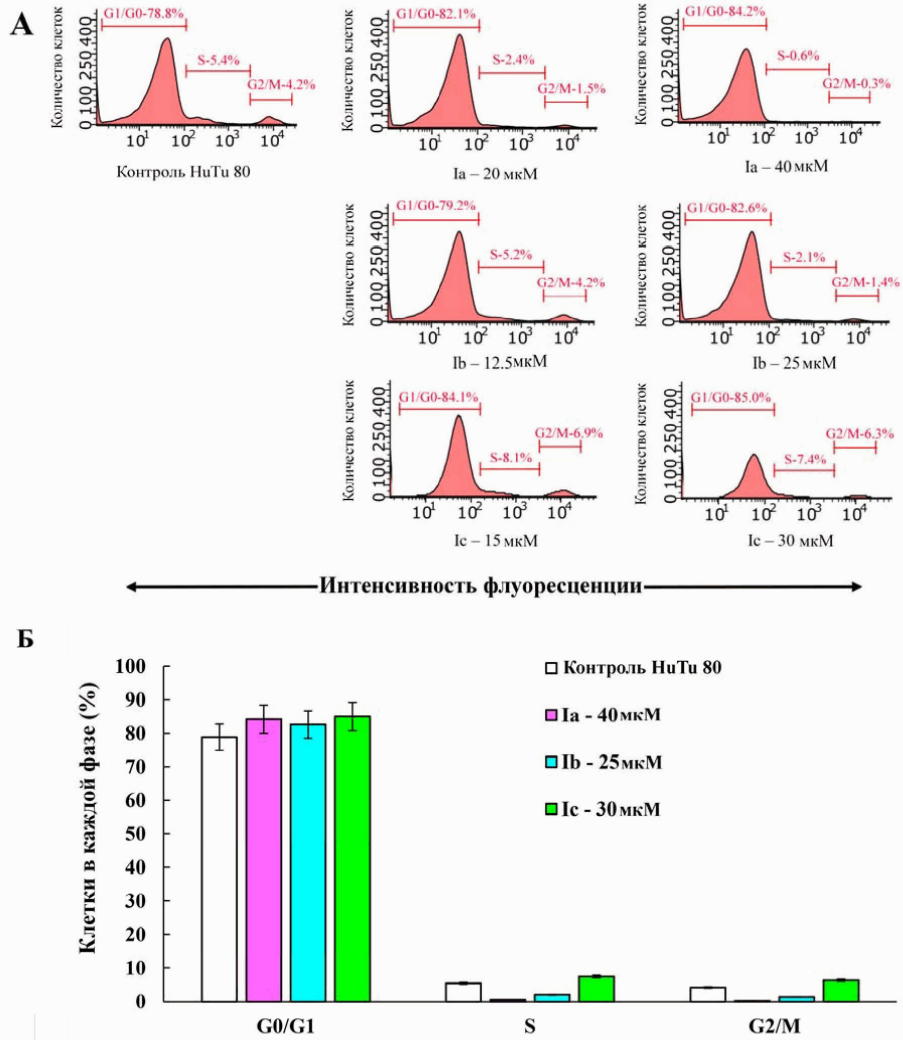
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5