



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C07C 39/06 (2006.01)
C07C 233/30 (2006.01)
C07D 209/02 (2006.01)
C07D 209/26 (2006.01)
A61K 31/403 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07C 39/06 (2020.02); C07C 233/30 (2020.02); C07D 209/02 (2020.02); C07D 209/26 (2020.02); A61K 31/403 (2020.02); A61K 31/405 (2020.02); A61K 31/165 (2020.02); A61P 29/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018140051, 14.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.11.2018

Дата регистрации:
15.09.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.11.2018

(43) Дата публикации заявки: 14.05.2020 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 15.09.2020 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

121205, Москва, территория Инновационного
центра "Сколково", ул. Нобеля, 5, оф. 125, ООО
"ЦИС "Сколково", Котлову Д.В.

(72) Автор(ы):

Безуглов Владимир Виленович (RU),
Серков Игорь Викторович (RU),
Любимов Игорь Иванович (RU),
Грецкая Наталья Михайловна (RU),
Акимов Михаил Геннадьевич (RU),
Тетерин Игорь Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

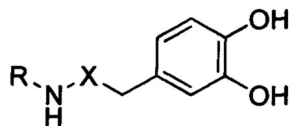
Общество с ограниченной ответственностью
"Гурус БиоФарм" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014018913 A2, 30.01.2014. WO
2014018913 A2, 30.01.2014. RU 2568603 C1,
20.11.2015. RU 2568603 C1, 20.11.2015. Christian
Sinning et al., ChemMedChem, 2008, 3, 1956-1964.
Mahindroo, Neeraj et al., Journal of Medicinal
Chemistry, 2009, vol. 52, N 14, p. 4277 - 4287.
STNext БД REGISTRY RN 1010864-82-0,
30.03.2008 (1H-Indene-3-acetamide, (см. прод.)

(54) Производные нестероидных противовоспалительных средств

(57) Реферат:

Изобретение относится к применимому в
медицине соединению общей формулы (I):



I

где R представляет собой остаток
нестероидного противовоспалительного средства,
содержащего карбоксильную группу,

присоединённого амидной связью и
представляющего собой диклофенак, ибупрофен,
напроксен, кеторолак, ацеклофенак, индометацин,
кетопрофен или сулиндак, а X представляет собой
CH₂, (CH₂)₃CONHCH₂ или CH₂CH₂O(CO)NHCH₂,
причем в случае, когда X представляет собой CH₂,
R не может быть остатком ибупрофена,
кетопрофена или сулиндака. Предложены новые
соединения, эффективные для применения в
качестве средства, обладающего
противовоспалительной, цитотоксической и/или
нейропротекторной активностью. 2 н.п. ф-лы, 4
табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-5-fluoro-2-methyl-1-[[4-(methylsulfinyl)phenyl]methylene]- STNext БД REGISTRY
RN 1007698-71-6, 13.03.2008 (Benzeneacetamide, N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-α-methyl-4-(2-methylpropyl)-).

WO 2015162216 A1, 29.10.2015. WO 2015050379 A1, 09.04.2015. WO 9640118 A1, 19.12.1996. WO 2012075287 A2, 07.06.2012. WO 2012067965 A1, 24.05.2012. US 6017919 A1, 25.01.2000. WO 2008097692 A1, 14.08.2008. RU 2241708 A1, 27.08.1998. WO 9955705 A1, 04.11.1999. WO 2006138660 A2, 28.12.2006. WO 2003104203 A1, 18.12.2003. Pubchem on line, 07.05.2010 (45268743, (2S)-N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-2-(3-phenoxyphenyl)propanamide). RU 2158138 C2, 27.10.2000.

R U 2 7 3 2 2 9 7 C 2

R U 2 7 3 2 2 9 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07C 39/06 (2006.01)*C07C 233/30* (2006.01)*C07D 209/02* (2006.01)*C07D 209/26* (2006.01)*A61K 31/403* (2006.01)*A61K 31/405* (2006.01)*A61K 31/165* (2006.01)*A61P 29/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07C 39/06 (2020.02); *C07C 233/30* (2020.02); *C07D 209/02* (2020.02); *C07D 209/26* (2020.02); *A61K 31/403* (2020.02); *A61K 31/405* (2020.02); *A61K 31/165* (2020.02); *A61P 29/00* (2020.02)

(21)(22) Application: **2018140051**, 14.11.2018

(24) Effective date for property rights:
14.11.2018

Registration date:
15.09.2020

Priority:

(22) Date of filing: **14.11.2018**(43) Application published: **14.05.2020** Bull. № 14(45) Date of publication: **15.09.2020** Bull. № 26

Mail address:

**121205, Moskva, territoriya Innovatsionnogo
tsentra "Skolkovo", ul. Nobelya, 5, of. 125, OOO
"TSIS "Skolkovo", Kotlovu D.V.**

(72) Inventor(s):

**Bezuglov Vladimir Vilenovich (RU),
Serkov Igor Viktorovich (RU),
Lyubimov Igor Ivanovich (RU),
Gretskaya Natalya Mikhajlovna (RU),
Akimov Mikhail Gennadevich (RU),
Teterin Igor Yurevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

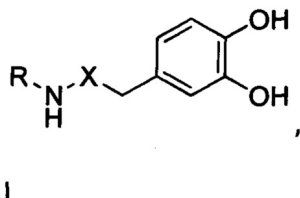
**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Gurus BioFarm" (RU)**

(54) DERIVATIVES OF NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY AGENTS

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a compound of
general formula (I) applicable in medicine:



where R is a non-steroidal anti-inflammatory agent

residue containing a carboxyl group, attached by an amide bond and representing diclofenac, ibuprofen, naproxen, ketorolac, aceclofenac, indometacin, ketoprofen or sulindac, and X is CH₂, (CH₂)₃CONHCH₂ or CH₂CH₂O(CO)NHCH₂, wherein when X is CH₂, R cannot be a residue of ibuprofen, ketoprofen or sulindac.

EFFECT: invention discloses novel compounds which are effective for use as an agent possessing anti-inflammatory, cytotoxic and/or neuroprotective activity.

2 cl, 4 tbl, 10 ex

Изобретение относится к области медицинской химии и может найти применение в медицине в качестве противовоспалительных, нейрозащитных средств, а также в качестве цитостатических агентов для применения в онкологии путем использования производных нестероидных противовоспалительных средств, содержащих дополнительный функциональный структурный элемент.

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) представляют собой обширную группу лекарственных препаратов, применяемых для снижения болевого синдрома, воспалений различной этиологии и в качестве жаропонижающего средства. НПВС различаются между собой по химической структуре действующего вещества, ферменту, который они ингибируют, а также продолжительности действия.

Выделяют несколько подгрупп НПВС:

- салицилаты ацетилсалициловая кислота (аспирин) - один из самых продаваемых лекарственных препаратов безрецептурного отпуска, как и другие производные салициловой кислоты - салициламид, дифлунизал и др.;
- производные фенилуксусной кислоты - диклофенак, ацеклофенак, сулиндак, кетеролак;
- производные индолилуксусной кислоты - индометацин;
- производные пропионовой кислоты, имеют окончание «-профен» - кетопрофен, ибупрофен, флуноксапрофен, фенпрофен и др.;
- производные антраиловой кислоты, имеют окончание «-фенамовая кислота» - мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота, меклофенамовая кислота и др.;
- препараты из группы «оксикамов» - дроксикам, мелоксикам, пироксикам, теноксикам и др.;
- пиразолоны - метамизол (анальгин), клофезон, кебузон, фенилбутазон и др.;
- коксибы - селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 - лумиракоксиб, целекоксиб, вальдекоксиб и др.

Спектр применения препаратов в тактике лечения достаточно обширный: ревматоидный артрит, остеоартрит, подагра, дисменорея, мигрень, метастазирующие боли в костях, кишечная непроходимость, почечные колики, послеоперационные боли, стоматологические процедуры и т.д. В последнее время НПВС стали применять в схемах комбинированной химиотерапии при онкологических заболеваниях (Umar, A., Steele, V.E., Menter, D.G., & Hawk, E.T. (2016). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. *Seminars in Oncology*, 43(1), 65-77. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.09.010). Принцип действия НПВС основан на ингибировании фермента, ответственного за биосинтез простагландинов - циклооксигеназу (COX-1 или COX-2). В зависимости от того, ингибируют ли препараты оба фермента или преимущественно только один фермент (COX-1 или COX-2), все НПВС делятся на селективные и неселективные. Наиболее известные неселективные НПВС, такие как аспирин, ибупрофен, диклофенак и т.д., широко доступны в большинстве стран мира, отпускаются без рецепта и достаточно хорошо переносятся пациентами, однако в случае длительного применения (например, при ревматоидном артрите) необходимо учитывать основные побочные эффекты НПВС.

К основным побочным эффектам можно отнести, во-первых, ulcerогенное действие (способность повреждать слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки), возникающее за счет ингибирования биосинтеза гастроцитопротекторных простагландинов. Кратковременное применение НПВС может вызвать расстройство желудка, в то время как длительное применение, особенно в высоких дозах, может приводить к язвенной болезни желудка и желудочным кровотечениям. Кроме того,

кишечнорастворимые лекарственные формы НПВС могут вызывать серьезные поражения кишечника (SostresC., CarlaJ., GargalloC.J., LanasaA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *ArthritisRes. Ther.*, 2013. 15(suppl3): p. S3).

5 Во-вторых, при селективном ингибировании СОХ-2 возникают серьезные осложнения сердечно-сосудистой системы вплоть до смертельных исходов. Именно поэтому ряд препаратов (например, Рофекоксиб) были сняты с производства и применения, а в отношении других (например, Целекоксиб, Валдекоксиб, Эторикоксиб и др.) проводятся дополнительные клинические исследования с целью изучения безопасности их
10 применения.

В-третьих, токсическое воздействие на почки - вазоконстрикция (сужение сосудов) и обратимая форма почечной недостаточности из-за неспецифической блокировки циклооксигеназы, что при продолжительном применении НПВС приводит к острой почечной недостаточности и острому тубулярному некрозу.

15 Одним из эффективных способов снижения побочных эффектов от действия НПВС является химическая модификация их структуры. С одной стороны, применяются временные защитные группы, блокирующие свободную карбоксильную группу ряда НПВС, что снижает гастротоксичность, а с другой - синтезируются бифункциональные мультитаргетные препараты на основе НПВС. Особенность второй группы
20 модифицированных НПВС состоит в использовании нескольких фармакологических мишеней для повышения эффективности действия и безопасности такого лекарственного средства. Заявляемые в настоящем изобретении вещества относятся ко второй группе модифицированных НПВС.

Известны производные ибупрофена и аминоспиртов, в частности амид ибупрофена
25 и аминоэтанола (Zhong, Guangxiang; Chen, Lulu; Jiang, Jiansong, Assignee: Zhejiang University of Technology, Peop. Rep. China, CN 101531611, CN 2009-10096554 Mar 6, 2009), который получают обработкой ибупрофена тионилхлоридом с последующей конденсацией образовавшегося хлорангидрида с аминоэтанола. Также описаны в открытых
30 источниках амиды ибупрофена и индометацина и аминоэтанола, которые далее превращали в производные метакрилата с последующей контролируемой полимеризацией (Davaran, S., & Entezami, A.A. (1997). Acrylic type polymers containing ibuprofen and indomethacin with difunctional spacer group: synthesis and hydrolysis. *Journal of Controlled Release*, 47(1), 41-9. doi:10.1016/s0168-3659(96)01614-8).

Амид ибупрофена с гамма-аминомасляной кислотой был использован для синтеза
35 бифункциональных производных ибупрофена, обладающих противовоспалительными свойствами и способностью ингибировать болевой рецептор TRPV1 (Yan L., Pan M, Fu M., Wang J., Huang W., Qian H. Design, synthesis and biological evaluation of novel analgesic agents targeting both cyclooxygenase and TRPV1. *BioorgMedChem.* 2016 Feb 15;24(4):849-57. doi:10.1016/j.bmc. 2016.01.009).

40 Также известны производные дофамина, присоединенные через линкер, состоящий из гамма-аминомасляной кислоты или аминоэтанола, к простагландину E2 (Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Акимов М.Г., Зинченко Г.Н., Туховская Е.А., Мурашев А.Н. Производные простагландина, обладающие противовоспалительной и анальгезирующей активностью. Патент РФ №2568603, заявка №2015100913, приоритет от 15.01.2015,
45 опубликовано 20.11.2015, Бюл. №32.)

Однако ни в патентной, ни в открытой литературе не содержится сведений о бифункциональных производных нестероидных противовоспалительных средств, содержащих остаток дофамина, присоединенный через линкер, представляющий собой

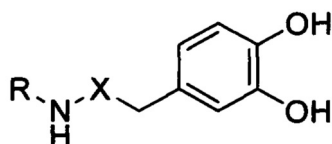
остаток аминоксанола и гамма-аминомасляной кислоты, существенное цитотоксическое и нейрозащитное действие которых в комплексе с НПВС было неожиданно обнаружено в процессе исследований.

В регистре CAS приведены структуры амидов нестероидных противовоспалительных средств и дофамина (в частности, для амида ибупрофена и дофамина CAS №1007698-71-6), однако отсутствуют ссылки на источники, где описан синтез и биологическая активность соединений данного типа. Таким образом, какая-либо биологическая активность данных соединений, в том числе и противовоспалительная активность, неизвестна из уровня техники.

Задача данного изобретения - расширение номенклатуры биологически активных производных нестероидных противовоспалительных средств, обладающих противовоспалительным действием. Поставленная задача решается путем синтеза амидных производных нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), содержащих карбоксильную группу, например, но не ограничиваясь, диклофенак, ибупрофен, напроксен, кетопрофен, сулиндак, кеторолак, ацеклофенак, индометацин, в которых амидная часть представлена аминоксанолом или гамма-аминомасляной кислотой, замещенными остатком дофамина.

Таким образом, объектом данного изобретения являются амидные производные нестероидных противовоспалительных средств общей формулы

(I):



где R = остаток нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), содержащий карбоксильную группу, например, но не ограничиваясь, диклофенак, ибупрофен, напроксен, кетопрофен, сулиндак, кеторолак, ацеклофенак, индометацин, присоединенных амидной связью, а X=(CH₂)₃CONHCH₂ или CH₂CH₂O(CO)NHCH₂.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют тот же смысл, который общепринят в области, к которой принадлежит изобретение, и может быть понят специалистом, имеющим соответствующие навыки.

«Замещенный» означает, что специфическая группа или остаток включают один или более заместителей, отличных от атома водорода.

«Остаток» означает фрагмент молекулы с одним или несколькими удаленными атомами водорода.

«Смесь» означает совместное включение двух и более веществ без образования химических связей, а физические свойства каждого из компонентов сохраняются без изменений.

«Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» означает, что компонент, используемый для приготовления лекарственной формы заявляемых веществ, не будет наносить вред организму человека.

«Фармацевтически приемлемый растворитель» означает, что данный растворитель при образовании раствора заявляемого вещества не будет наносить вред организму человека.

В общем виде вещества настоящего изобретения могут быть синтезированы методами, известными из области химии. Некоторые процессы производства конкретных веществ

настоящего изобретения иллюстрируют схемы, приведенные в примерах.

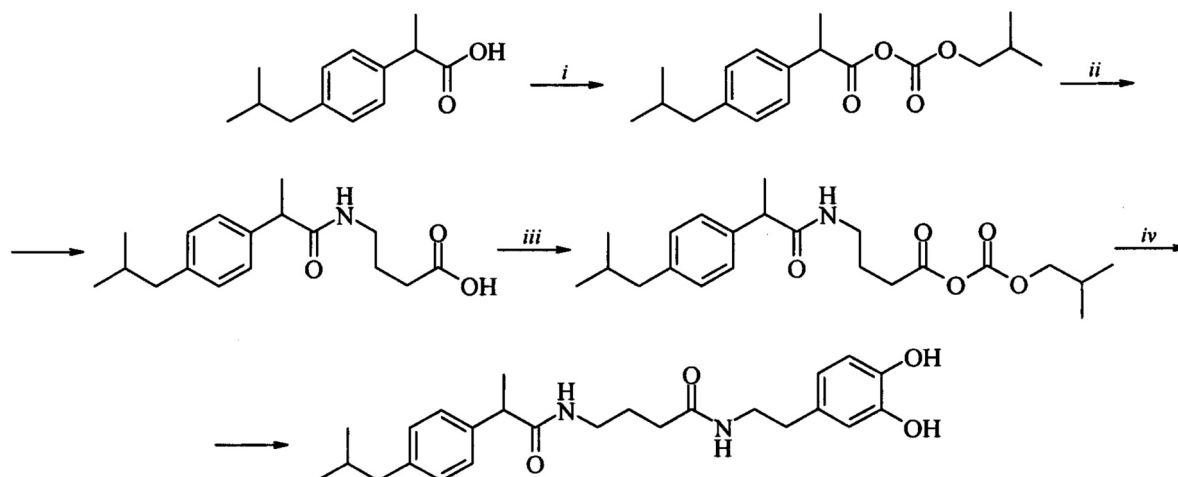
Заявляемые вещества могут быть использованы в виде смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами для формирования таблеток, капсул, пилюль, а также в виде гелей или растворов в фармацевтически приемлемых растворителях. Заявляемые вещества в указанных формах могут вводиться перорально, интраназально или парентерально.

Биологические эффекты заявляемых веществ включают противовоспалительное действие, цитотоксическое действие для опухолевых клеток и нейрозащитное действие в моделях нейротоксичности.

Таким образом, задача данного изобретения решается путем синтеза амидных производных нестероидных противовоспалительных средств, содержащих карбоксильную группу, например, но не ограничиваясь, диклофенак, ибупрофен, напроксен, кетопрофен, сулиндак, кеторолак, ацеклофенак, индометацин, в которых амидная часть представлена аминоктанолом или гамма-аминомасляной кислотой, замещенными остатком дофамина, которые обладают противовоспалительным, цитотоксическим и нейрозащитным действием.

Нижеследующие примеры приведены в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Конъюгат ибупрофена, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (IBU-GABA-DA)



i - E_3N , $iBuCl$, $MeCN$, 1 ч., комнатная температура; ii - GABA (силилированная форма), $MeCN$, 18 ч., комнатная температура; iii - E_3N , $iBuCl$, $MeCN$, 1 ч. комнатная температура; iv - Et_3N , $MeCN$, $DA \cdot HCl$ (силилированная форма), комнатная температура.

53 мг гамма-аминомасляной кислоты (GABA, 0.51 ммоль) растворяли в ацетонитриле (0.5 мл) и прибавляли 250 мкл BSTFA и перемешивали до полного растворения GABA.

К ибупрофену 110 мг (0.53 ммоль) в 2000 мкл ацетонитрила добавляли 81 мкл (0.58 ммоль) триэтиламина и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин., затем добавили 76 мкл (0.58 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 1 ч. отфильтровывали осадок гидрохлорида триэтиламина и к получившемуся раствору смешанного ангидрида ибупрофена прибавляли силилированную гамма-аминомасляную кислоту в ацетонитриле и оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Упаривали ацетонитрил из реакционной смеси, разбавляли остаток водой, подкисленной бисульфатом, и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, рассолом и сушили над безводным Na_2SO_4 . Органический слой упаривали, остаток растворяли в хлороформе и наносили

на колонку с SilicaGel 60. Продукт элюировали с колонки системой хлороформ-метанол. Выход IBY-GABA 124 мг (93%) в виде бесцветного масла.

104 мг (0.55 ммоль) гидрохлорида дофамина растворяли в 1200 мкл ацетонитрила с 435 мкл BSTF и 100 мкл пиридина. Перемешивали до полного растворения дофамина.

К 124 мг (0.5 ммоль) IBU-GABA в 1200 мкл ацетонитрила прибавляли 76 мкл (0.49 ммоль) триэтиламина и 70 мкл (0.54 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 1 ч.

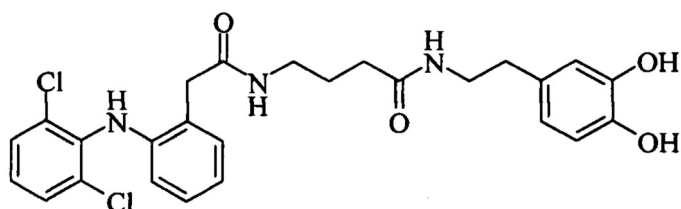
прибавляли раствор силилированного дофамина. Оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом, выдерживали 30 мин., упаривали, разбавляли остаток водой, подкисленной бисульфатом, и экстрагировали этилацетатом.

Органический слой промывали водой, рассолом и сушили над безводным Na_2SO_4 .

Органический слой упаривали, остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SilicaGel 60. Продукт элюировали с колонки системой хлороформ-метанол. Выход 105 мг (50%). Желтое вязкое масло. $R_f=0.37$ (хлороформ-метанол, 10:1). Масс спектр:

расчетн. 426.252, $C_{25}H_{34}N_2O_4$, найдено: 427.27 $[M+H]^+$.

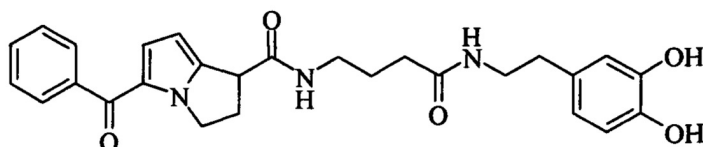
Пример 2. Конъюгат ацеклофенака, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (АЦЕК-GABA-DA)



Получен аналогично описанному в примере 2. Выход 50%. Коричневатое вязкое масло. $R_f=0.37$ (хлороформ-метанол, 10:1). Масс спектр: расчетн. 515,1379,

$C_{26}H_{27}Cl_2N_3O_4$; найдено: 516.147 $[M+H]^+$, 540.119 $[M+Na]^+$.

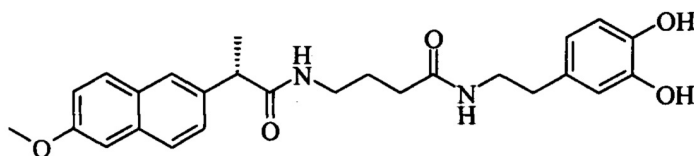
Конъюгат кеторолака, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (KTR-GABA-DA)



Получен аналогично описанному в примере 2. Выход 40%. Бесцветное масло. $R_f=0.36$ (хлороформ-метанол, 10:1). Масс спектр: расчетн. 475,2107, $C_{27}H_{29}N_3O_5$; найдено:

476.221 $[M+H]^+$, 498.201 $[M+Na]^+$.

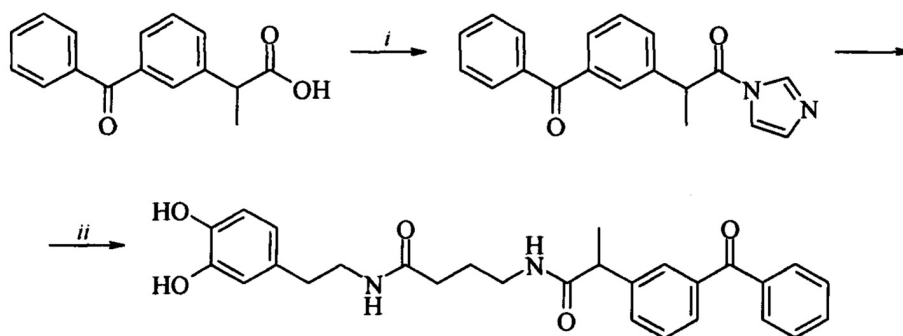
Конъюгат напроксена, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (NAP-GABA-DA)



Получен аналогично описанному в примере 2. Выход 82%. Бежевое масло. $R_f=0.43$ (хлороформ-метанол, 10:1). Масс спектр: расчетн. 450,2155, $C_{26}H_{30}N_2O_5$; найдено:

451.233 $[M+H]^+$, 473.208 $[M+Na]^+$.

Пример 3. Конъюгат кетопрофена, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (KET-GABA-DA)



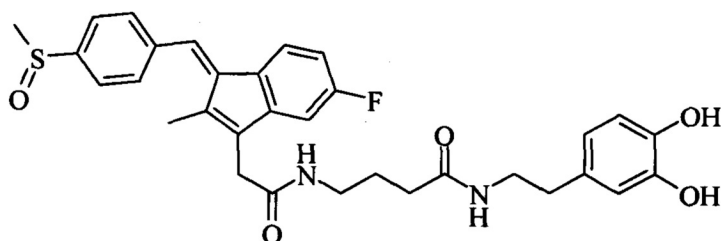
i - 1,1'-CDI, MeCN, 1 ч., комнатная температура; ii - GABA-DA*CF₃COOH, Et₃N, DMF, 1.5 ч., комнатная температура.

К 100 мг (0.39 ммоль) кетопрофена, растворенного в 5000 мкл ацетонитрила добавляли 77 мг (0.47 ммоль) 1,1'-карбонилдимидазола (1,1'-CDI). Перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Затем прибавляли 166 мг (0.47 ммоль) GABA-DA в виде соли с трифторуксусной кислотой и 65 мкл (0.47 ммоль) Et₃N в 1 мл ДМФА, перемешивали 1.5 ч. при комнатной температуре.

Органические растворители упаривали, остаток разбавляли водой, подкисленной

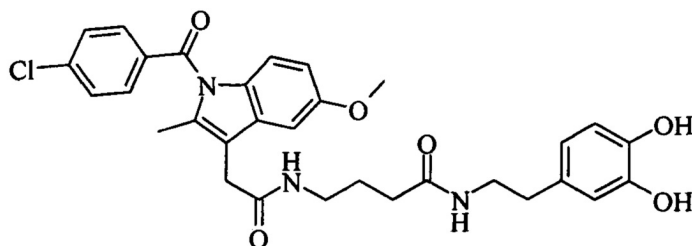
бисульфатом, и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, рассолом и сушили над безводным Na_2SO_4 . Органический слой упаривали, остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SilicaGel 60. Продукт элюировали с колонки системой хлороформ-метанол. Выход 82 мг (44%). $R_f=0.36$. Коричневое
 5 масло. Масс спектр: расчетн. 474,2155, $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$; найдено: 475.226 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 497.212 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Конъюгат сулиндака, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (SUL-GABA-DA)



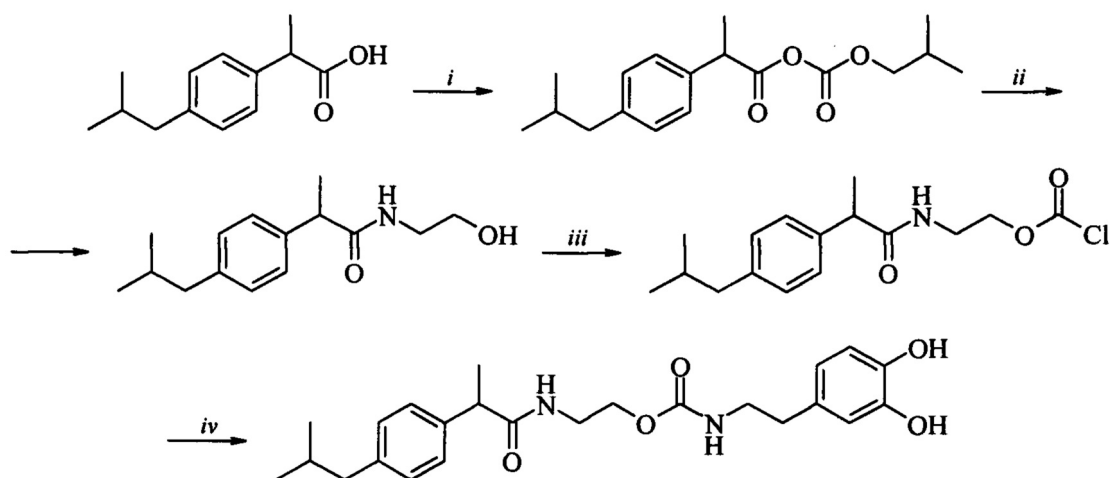
Получен аналогично описанному в примере 3. Выход 41%. $R_f=0.41$ (хлороформ-метанол, 10:1). Желто-коричневое масло. Масс спектр: расчетн. 576,2094, $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{FN}_2\text{O}_5\text{S}$; найдено: 577.219 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 599.209 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

20 Конъюгат индометацина, гамма-аминомасляной кислоты и дофамина (INDO-GABA-DA)



30 Получен аналогично описанному в примере 3. Выход 31%. $R_f=0.33$ (хлороформ-метанол, 10:1). Слегка желтоватые кристаллы, Т пл. 184-186°C. Масс спектр: расчетн. 577.1980 ($\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_6$); найдено 578.200 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 600.192 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Пример 4. Конъюгат ибупрофена, этаноламина и дофамина (IBU-EA-DA)



i - Et_3N , iBuClF , MeCN , 1 ч., комнатная температура; ii - моно-этаноламин, MeCN , 18 ч., комнатная температура; iii - раствор 2М фосген в толуоле, THF , Et_3N , 0°C, 20 мин.,

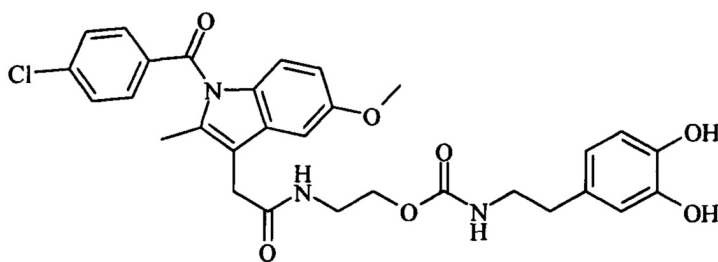
1 ч. при комнатной температуре; iv - DA (в силилированной форме), MeCN, 18 ч., комнатная температура.

К ибупрофену 205.7 мг (0.99 ммоль) в 4000 мкл ацетонитрила прибавляли 152 мкл (1.1 ммоль) триэтиламина, перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин., прибавляли 142 мкл (1.1 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 15 мин. реакционную смесь фильтровали и к полученному раствору прибавляли 90 мкл (1.5 ммоль) моно-этанолamina в 0.5 мл ацетонитрила и оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Реакционную смесь упаривали, остаток разбавляли водой, подкисленной бисульфатом, и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, рассолом и сушили над безводным Na₂SO₄. Органический слой упаривали, остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SilicaGel 60. Продукт элюировали с колонки градиентной системой хлороформ-метанол. Выход IBU-EA 209 мг (83%) в виде бесцветного масла.

51 мг (0.25 ммоль) гидрохлорида дофамина растворяли в 1000 мкл ацетонитрила, содержащего 200 мкл BSTF и 100 мкл пиридина. Перемешивали при комнатной температуре до полного растворения дофамина.

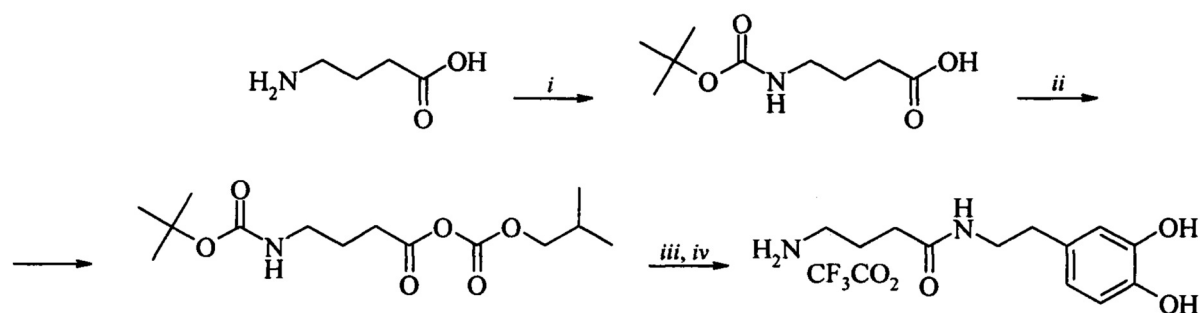
К 1 мл охлажденного до 0°C раствора 2М фосгена в толуоле постепенно прибавляли раствор 80 мг (0.23 ммоль) IBU-EA в 4000 мкл тетрагидрофурана и 45 мкл (0.32 ммоль) триэтиламина. Позволяли смеси нагреться до комнатной температуры в течение 20 мин. и фильтровали. К полученному раствору прибавляли раствор силилированного дофамина. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре на 18 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом, выдерживали 30 мин. При комнатной температуре упаривали, остаток разбавляли водой, подкисленной бисульфатом, и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, рассолом и сушили над безводным Na₂SO₄. Органический слой упаривали, остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с SilicaGel60. Продукт элюировали с колонки системой хлороформ-метанол. Выход 65,6 мг (65%). Коричневатое масло. R_f=0.24 (хлороформ-метанол, 15:1). Масс спектр: вычислено 428.2311 (C₂₄H₃₂N₂O₅); найдено 429.1300 [M+H]⁺.

Конъюгат индометацина, этаноламина и дофамина (INDO-EA-DA)



Получали аналогично описанному в примере 4 из индометацина, этаноламина и гидрохлорида дофамина. R_f=0.28 (хлороформ-метанол, 15:1). Выход 60%, желтоватое масло. Масс спектр: вычислено 579.1772 (C₃₀H₃₀ClN₃O₇); найдено 580.1823 [M+H]⁺.

Пример 5. Конъюгат гамма-аминомасляной кислоты с дофамином (GABA-DA)



i - Woc_2O , NEt_3 , $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ (1:1), 2 ч., 0°C ; ii - E_3N , изобутилхлорформиат, MeCN , 1 ч., комнатная температура; iii - силилированный дофамин, NEt_3 , MeCN , 18 ч., комнатная температура; iv - CF_3CO_2 , CH_2Cl_2 , 1 ч., комнатная температура.

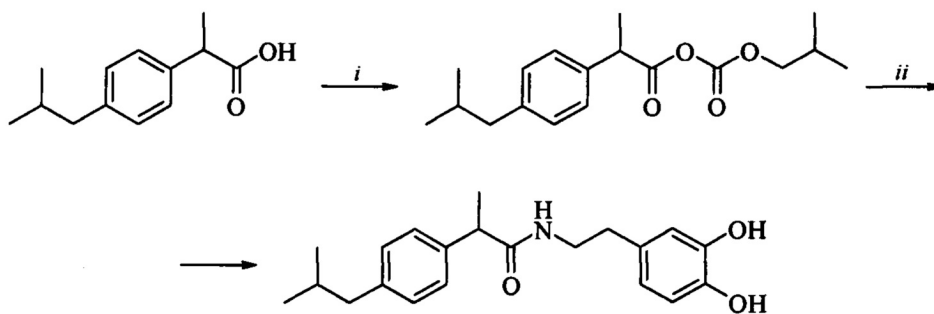
К раствору 1.11 г (10.76 ммоль) γ -аминомасляной кислоты в 10 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1) прибавляют 2.91 мл (12.68 ммоль) $(\text{Woc})_2\text{O}$ и 1.75 мл (12.68 ммоль)

триэтиламина и перемешивают 2 ч. при 0°C . Реакционную смесь промывают гексаном (2×100 мл), ацетонитрил упаривают, водную фракцию подкисляют до pH 3 и экстрагируют этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический экстракт промывают водой (2×50 мл), рассолом, сушат над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме водоструйного насоса. Получают 1.56 г N-Woc-GABA, выход 80%, бесцветное масло.

К раствору 1.57 г (8.3 ммоль) гидрохлорида дофамина в 10 мл ацетонитрила прибавляют 5.8 мл BSTF и 1.5 мл пиридина и перемешивают при 25°C до полного растворения дофамина. К раствору 1.56 г (7.69 ммоль) N-Woc-GABA в 15 мл ацетонитрила прибавляют 1.18 мл (8.5 ммоль) триэтиламина и 1.09 мл (8.5 ммоль) изобутилхлорформиата, перемешивают 1 ч. при 25°C , прибавляют раствор силилированного дофамина и перемешивают 18 ч. Реакционную смесь упаривают в вакууме, остаток растворяют в 200 мл этилацетата и промывают 2Н раствором бисульфата натрия (200 мл), водой (2×100 мл), рассолом, сушат над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (SilicaGel 60) в градиентной системе хлороформ-метанол. Фракции, содержащие продукт (контроль осуществляется с помощью ТСХ), объединяют, растворитель упаривают в вакууме. Получают 1.61 г Woc-GABA-DA, выход 62%.

К раствору 1.61 г Woc-GABA-DA в 10 мл хлористого метилена прибавляют 1.0 мл трифторуксусной кислоты и перемешивают 1 ч. при 25°C . Реакционную смесь упаривают в вакууме водоструйного насоса. Получают 1.64 г трифторацета конъюгата γ -аминомасляной кислоты и дофамина, выход 98%, бесцветное масло. Масс спектр: вычислено 238.1317 ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$); найдено 239.1327 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 261.1326 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

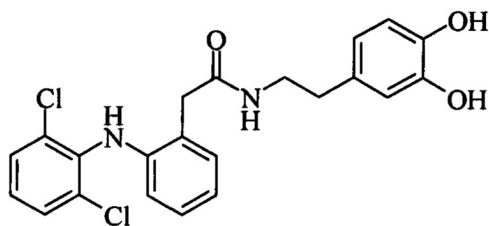
Пример 6. Конъюгат ибупрофена и дофамина (IBU-DA)



i - E_3N , изобутилхлорформат, MeCN, 1 ч., комнатная температура; ii - силилированный дофамин, NEt_3 , MeCN, 18 ч., комнатная температура.

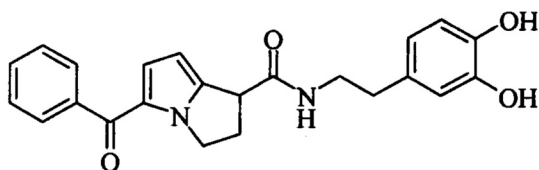
К раствору 110 мг (0.58 ммоль) гидрохлорида дофамина в 1 мл ацетонитрила прибавляют 400 мкл BSTF и 100 мкл пиридина и перемешивают до полного растворения дофамина при 25°C. К раствору 200 мг (0.97 ммоль) ибупрофена в 3 мл ацетонитрила добавляют 147 мкл (1.07 ммоль) триэтиламина и 137 мкл (1.07 ммоль) изобутилхлорформата, перемешивают 1 ч. при 25°C. К полученному смешанному ангидриду ибупрофена прибавляют раствор силилированного дофамина и перемешивают 18 ч. при 25°C. Реакционную смесь упаривают, остаток растворяют в 50 мл этилацетата и промывают 2Н раствором бисульфата натрия (20 мл), водой (2×20 мл), рассолом, сушат над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (SilicaGel 60) в градиентной системе хлороформ-метанол. Фракции, содержащие продукт (контроль осуществляется с помощью ТСХ), объединяют, растворитель упаривают в вакууме. Получают 123 мг конъюгата ибупрофена и дофамина, выход 61%, бесцветное вязкое масло, $R_f=0.36$ хлороформ-метанол, 19:1). Масс спектр: вычислено 341.1991 ($C_{21}H_{27}NO_3$); найдено 342.2098 $[M+H]^+$, 364.2 $[M+Na]^+$.

Конъюгат диклофенака и дофамина (DIC-DA)



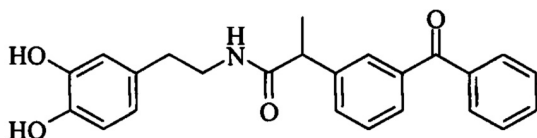
Получают аналогично описанному в примере 6 из диклофенака и гидрохлорида дофамина. Выход 62%, коричневое масло, $R_f=0.7$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 430.0851 ($C_{22}H_{20}Cl_2N_2O_3$); найдено 431.095 $[M+H]^+$, 453.072 $[M+Na]^+$.

Конъюгат кеторолака и дофамина (KTR-DA)



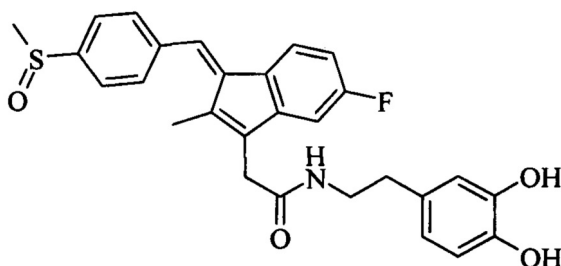
Получают аналогично описанному в примере 6 из кеторолака и гидрохлорида дофамина. Выход 63%, желтое масло, $R_f=0.7$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 390.1580 ($C_{23}H_{22}N_2O_4$); найдено 391.1681 $[M+H]^+$, 413.1513 $[M+Na]^+$.

Конъюгат кетопрофена и дофамина (KET-DA)



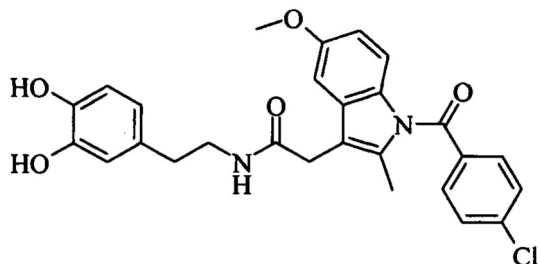
Получали аналогично описанному в примере 6 из кетопрофена и гидрохлорида дофамина. Выход 59%, кристаллизующееся бесцветное масло, $R_f=0.4$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 389.1627 ($C_{24}H_{23}NO_4$); найдено 390.1723 $[M+H]^+$, 412.1581 $[M+Na]^+$.

Конъюгат сулиндака и дофамина (SUL-DA)



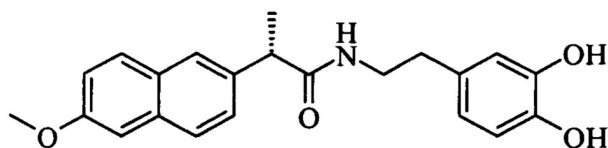
Получали аналогично описанному в примере 6 из сулиндака и гидрохлорида дофамина. Выход 54%, желтые кристаллы, $T_{пл.}=138-142^{\circ}C$. $R_f=0.72$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 491.1567 ($C_{28}H_{26}FNO_4S$); найдено 492.1670 $[M+H]^+$, 514.1447 $[M+Na]^+$.

Конъюгат индометацина и дофамина (INDO-DA)



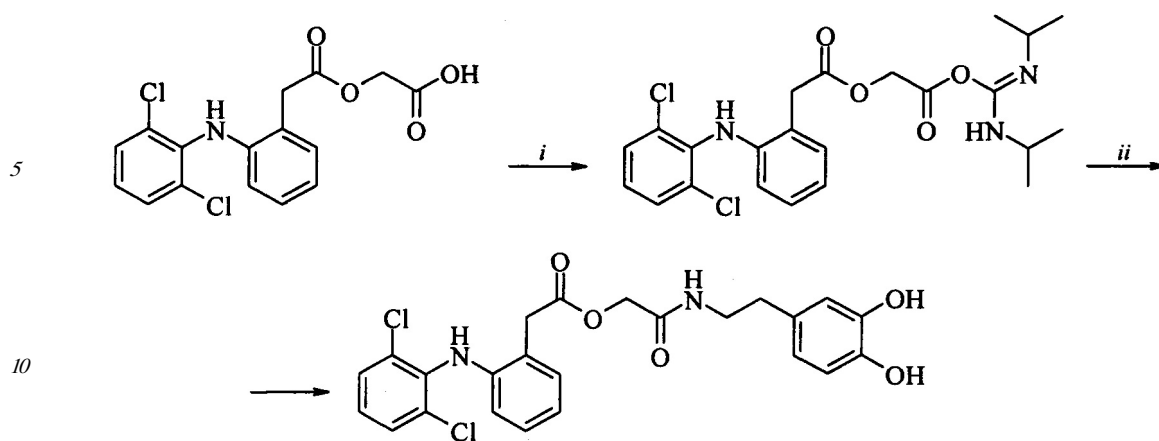
Получали аналогично описанному в примере 6 из индометацина и гидрохлорида дофамина. Выход 80%, желтоватое масло. $R_f=0.65$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 492.1452 ($C_{27}H_{25}ClN_2O_5$); найдено 493.1552 $[M+H]^+$, 515.1322 $[M+Na]^+$.

Конъюгат напроксена и дофамина (NAP-DA)



Получали аналогично описанному в примере 6 из напроксена и гидрохлорида дофамина. Выход 80%, бежевые кристаллы, $T_{пл.}=143-145^{\circ}C$. $R_f=0.75$ (хлороформ-метанол, 9:1). Масс спектр: вычислено 365.1627 ($C_{22}H_{23}NO_4$); найдено 366.1729 $[M+H]^+$, 388.1592 $[M+Na]^+$.

Пример 7. Конъюгат ацеклофенака и дофамина



i - диизопропилкарбодиимид, 1-гидроксibenзотриазол, 1 ч., комнатная температура;
ii - гидрохлорид дофамина, ДМФА, NEt_3 , 1 ч., комнатная температура.

К раствору 200 мг (0.56 ммоль) ацеклофенака в 4 мл хлористого метилена прибавляют 86.5 мг (0.56 ммоль) 1-гидроксibenзолтриазола и 96 мкл (0.62 ммоль) диизопропилкарбодиимида и перемешивают 1.5 ч. при 25°C. Выпавший осадок отфильтровывают, прибавляют 117.8 мг (0.62 ммоль) раствора гидрохлорида дофамина в 1.5 мл диметилформамида и 30 мкл (0.68 ммоль) триэтиламина и перемешивают 1.5 ч. при 25°C. Реакционную смесь упаривают, остаток растворяют в 50 мл этилацетата и промывают 2М раствором бисульфата натрия (20 мл), водой (2×20 мл), рассолом, сушат над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (SilicaGel 60) в градиентной системе хлороформ-метанол. Фракции, содержащие продукт (контроль осуществляется с помощью ТСХ), объединяют, растворитель упаривают в вакууме. Получают 135 мг конъюгата ацеклофенака и дофамина, выход 49%. Желто-коричневые светлые кристаллы, Т пл.=89-92°C. Масс спектр: вычислено 488.0906 (C₂₄H₂₂Cl₂N₂O₅); найдено 489.099 [M+H]⁺, 511.081 [M+Na]⁺.

Пример 8. Противовоспалительное действие производных НПВС на клетках линии RAW-264.7

Клеточная линия RAW-264.7 представляет собой моноциты/макрофаги, выделенные из асцитной жидкости AMLV-индуцированной лейкемии мыши. При стимуляции липополисахаридом клеточной стенки бактерий клетки отвечают по воспалительному типу, выбрасывая в среду различные медиаторы - индикаторы воспаления, в частности - оксид азота. Изменение уровня этого медиатора (измеряемое по количеству нитрит-иона в среде инкубации клеток) служит показателем про- или противовоспалительного действия соединений.

Клетки RAW-264.7 были приобретены в клеточном банке Института цитологии Санкт-Петербурга. Клетки инкубировали при 95% влажности, в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37°C. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 7% FBS, 2 mM глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки пересеивали каждые 48-72 ч. Для суспендирования клетки инкубировали в растворе Версена в течение 2-3 мин. в растворе Трипсин-ЭДТА (0.25%).

Тестирование противовоспалительной активности

Клетки рассеивали по 100 тыс. в лунки 96-луночного планшета в 100 мкл среды. Индукцию воспалительного ответа проводили с помощью 1 мкг/мл липополисахарида в среде культивирования. Аликвоту стандартного раствора исследуемых веществ в

DMSO прибавляли к среде для индукции воспалительного ответа со стимуляторами и заменяли среду культивирования в лунках на полученный раствор. Инкубировали 20 ч. После этого из каждой лунки отбирали аликвоту среды, и определяли концентрацию NO по модифицированному методу Гриса. К 75 мкл анализируемой смеси в лунках 96-луночного планшета для ИФА добавляли 12.5 мкл 0,04% водного раствора сульфаниламида, выдерживали при комнатной температуре 10 мин. с защитой от света, прибавляли 12.5 мкл 2% раствора нафтилэтилендиамина в 3М HCl, выдерживали еще 10 мин. при комнатной температуре с защитой от света, после чего определяли оптическое поглощение при длине волны 540 нм.

Наиболее активными в данном тесте оказались дофаминовые производные кетопрофена (KET-DA, KET-GABA-DA) EC50 28,86±1; 33,65±0,5 и кетеролака (KTR-DA, KTR-GABA-DA) EC50 34,73±1; 37,77±2. Следует отметить, что данные производные не оказывали цитотоксического действия на данные клетки.

Другие производные НПВС также обладали умеренной противовоспалительной активностью (таблица 1).

Таблица 1. Противовоспалительное действие производных НПВС с дофамином в концентрации 5 мкМ (уровень генерации NO в % от максимального – 100%) на клетках RAW-264.7

IBU-DA	IBU-GABA-DA	DIK-DA	DIK-GABA-DA	NAP-DA	NAP-GABA-DA	ACEK-DA	ACEK-GABA-DA	SUL-DA	SUL-GABA-DA	INDO-DA	INDO-GABA-DA
63,31±4	68,9±2	58,5±8	64,9±1	55,1±2	51,8±3	55,4±2	50,8±1	50,7±4	61,8±1	50,1±4	51,8±3

В этой модели производные НПВС с дофамином, соединенные через остаток аминокетанола, проявили высокую противовоспалительную активность. Так, для IBU-DA значение EC50 составило 11±3 мкМ.

Производные НПВС с дофамином также оказывали противовоспалительное действие на культуре клеток микроглии BV-2. Вещества тестировали как описано выше. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Противовоспалительное действие производных НПВС с дофамином на клетках BV-2

Соединение	EC ₅₀ , мкМ
IBU	154,7
IBU-DA	243,1
IBU- GABA-DA	100,4
DIK	126,8
DIK -DA	53,0
DIK - GABA-DA	65,2
NAP -DA	107,8
NAP - GABA-DA	106,3
KET - GABA-DA	52,6
SUL - GABA-DA	132,2
KTR -DA	88,8
KTR - GABA-DA	83,4
ACEK	65,3

Наибольшей активностью на данной клеточной линии обладали DIK-DA, DIK-GABA-DA и KET-GABA-DA (EC₅₀ 53,0; 65,2; 52,6, соответственно). При этом активность производных НПВС с дофамином превосходила активность исходного НПВС, в некоторых случаях почти в 2 раза. Так, значение EC₅₀ для диклофенака составило 126,8 мкМ, а для его производных с дофамином (DIK-DA, DIK-GABA-DA) - 53,0 и 65,2 мкМ, соответственно.

Пример 9. Цитотоксическое действие производных НПВС с дофамином на линии раковых клеток

Клетки карциномы легкого A549 приобретены в клеточном банке Института цитологии Санкт-Петербурга. Клетки инкубировали при 95% влажности, в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37°C. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 7% FBS, 2 мМ глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки пересеивали каждые 48-72 ч.

Оценка действия веществ на клетки

Клетки рассеивали по 10 тыс. в лунки 96-луночного планшета в 100 мкл среды. Через 24 ч. культивирования к клеткам добавляли 100 мкл исследуемых веществ в виде раствора DMSO в среде для культивирования клеток с финальной концентрацией DMSO 0.5%. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами 24 ч. В качестве положительного

контроля использовали клетки, к которым добавляли 100 мкл среды с 0,5% DMSO.

Оценка выживаемости клеток в культуре с помощью МТТ-теста

После окончания инкубации из каждой лунки удаляли среду и добавляли по 100 мкл реактива МТТ (0.5 мг/мл МТТ, 3.5 мг/мл D-глюкозы в растворе Хэнкса). Инкубировали в CO₂-инкубаторе 1.5 ч. Среду с МТТ удаляли и в каждую лунку добавляли по 100 мкл DMSO, перемешивали 2 мин. Определяли оптическую плотность раствора при длинах волн 576 нм и 620 нм. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Цитотоксическая активность производных НПВС с дофамином в отношении клеток карциномы легкого человека A549

Соединение	LC ₅₀ , мкМ
IBU	32.5±2

IBU-DA	29.8±0.5
IBU-GABA-DA	45.4±1
DIK	>100
DIK -DA	61.7±1
DIK -GABA-DA	60.8±1.5
INDO	>100
INDO -DA	43.5±0.5
INDO-GABA-DA	55.8±0.5

Наиболее активным соединением в данном тесте оказался амид ибупрофена с дофамином (IBU-DA), значение полулетальной концентрации для которого составило 29.81±0.5 мкМ. Амиды диклофенака и индометацина также проявили цитотоксическую

активность по отношению к данному типу раковых клеток в диапазоне LC₅₀, 40-60 мкМ, в то время как исходные НПВС были неактивны в данном тесте. На клетках глиомы крысы C6 производные индометацина были существенно активнее исходного индометацина. Значения LC₅₀ для INDO-DA и INDO-GABA-DA составили 72.1±1.5 и 32.3±2 мкМ соответственно, тогда как для индометацина это значение существенно превосходило 100 мкМ. Следует отметить, что введение фрагмента гамма-аминомасляной кислоты в структуру дофаминового производного индометацина более чем в два раза увеличило цитотоксическую активность INDO-GABA-DA по отношению к клеткам C6.

Пример 10. Нейропротективное действие производных НПВС с дофамином

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y используют в качестве модели для тестирования нейрозащитного потенциала химических соединений.

Клетки приобретены в коллекции клеточных культур АТСС. Клетки инкубировали при 95% влажности, в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37°C. Культивирование

проводили в среде DMEM, содержащей 7% FBS, 2 мМ глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В.

Оценка действия веществ на клетки

Клетки рассеивали по 20 тыс. в лунки 96-луночного планшета в 100 мкл среды. Через 24 ч. культивирования к клеткам добавляли 100 мкл исследуемых веществ в виде раствора DMSO в среде для культивирования клеток с финальной концентрацией DMSO 0.5%. Нейротоксин MPP⁺ и производное НПВС добавляли либо одновременно, либо в последовательности, указанной в таблице 4. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами 24 ч. В качестве положительного контроля использовали клетки, к которым добавляли 100 мкл среды с 0,5% DMSO. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Нейрозащитное действие производных НПВС на клетках SH-SY5Y при индукции клеточной смерти нейротоксином MPP⁺

Соединение	Условия эксперимента, значение EC ₅₀ , мкМ		
	Одновременное добавление MPP ⁺ и НПВС	Прединкубация с MPP ⁺ 30 мин, далее добавление НПВС	Прединкубация с НПВС 3 часа, далее добавление MPP ⁺
IBU-DA	14,62±2	11,00	11,22
IBU-GABA-DA	13,92±1	13,24	14,44
DIK-DA	8,142±0,5	11,39	12,62
DIK-GABA-DA	21,54±0,5	12,87	13,00
NAP-DA	-	-	14,92
NAP-GABA-DA	-	-	20,37
KET-DA	34,63±0,5	28,13	12,51
KET-GABA-DA	33,09±1	50,56	21,62
SUL-GABA-DA	-	-	39,77
KTR-DA	-	-	12,65
KTR-GABA-DA	36,62±0,5	72,60	38,23
ACEK-DA	-	-	8,582
ACEK-GABA-DA	-	-	9,680
INDO-DA	-	-	24,97
INDO-GABA-DA	-	-	14,67

Наибольшую нейропротективную активность при всех вариантах постановки эксперимента проявили дофаминовые производные ибупрофена и диклофенака.

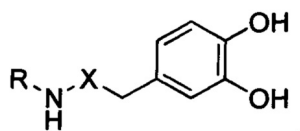
Дофаминовые производные ибупрофена были также активны в модели химической гипоксии на клетках SH-SY5Y, индуцированной добавлением в среду инкубации $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (425 мкМ). Для IBU-DA и IBU-GABA-DA значения EC_{50} составили 18,5 и 55,8 мкМ соответственно.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что заявляемые вещества обладают противовоспалительной, цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам, а также оказывают нейрозащитное действие на клетки нервной системы.

Должно быть понятно, что, тогда как изобретение описывается совместно с его подробным описанием, вышеупомянутое описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объема изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие :

(57) Формула изобретения

1. Соединение общей формулы (I):



I

где R представляет собой остаток нестероидного противовоспалительного средства, содержащего карбоксильную группу, присоединённого амидной связью и представляющего собой диклофенак, ибупрофен, напроксен, кеторолак, ацеклофенак, индометацин, кетопрофен или сулиндак, а X представляет собой CH_2 , $(\text{CH}_2)_3\text{CONHCH}_2$ или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CO})\text{NHCH}_2$, причем в случае, когда X представляет собой CH_2 , R не может быть остатком ибупрофена, кетопрофена или сулиндака.

2. Применение соединения по п.1 в качестве средства, обладающего противовоспалительной, цитотоксической и/или нейропротекторной активностью.