



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 233/22 (2020.02); A61K 31/4164 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019124301, 31.07.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.07.2019

Дата регистрации:
24.08.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.07.2019

(45) Опубликовано: 24.08.2020 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

119234, Москва, ул. Ломоносовский проспект,
27, стр. 1, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Фонд
"Национальное интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Базанов Даниил Романович (RU),
Лозинская Наталья Александровна (RU),
Первушин Николай Викторович (RU),
Копейна Гелина Сергеевна (RU),
Аникина Лада Владимировна (RU),
Савицкая Виктория Юрьевна (RU),
Максимова Анита Ирековна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)

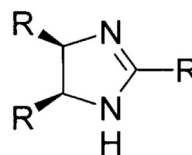
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 5182268 А, 26.01.1993. Н.А.
Лозинская и др. "Синтез цис- и транс-2,4,5-
триарилимидазолинов и 2,4,5-
триарилимидазолонов из простых реагентов"
Известия Академии наук Серия химическая,
N3, 2003, 646-650. И.В. Бессонов и др.
"Стереоселективный синтез производных 1,2-
диарил-1,2-диаминоэтанов" Известия
Академии наук Серия химическая, N1,2005,
(см. прод.)

(54) 2,4,5-ТРИ(МЕТОКСИФЕНИЛ) ЦИС-ИМИДАЗОЛИН И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к производным цис-имидазолина общей формулы I, в которой R=2-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 2,3-диметоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 2,5-диметоксифенил, 2,4-диметоксифенил, 3,4,5-триметоксифенил, 3-метокси-4-этоксифенил или 3-метокси-2-этоксифенил. Изобретение также относится к активному компоненту и к способу получения соединения общей формулы I. Технический результат: получены новые производные цис-имидазолина общей формулы

I, обладающие ингибирующим действием в отношении роста клеток опухолей немелкоклеточного рака лёгкого. 3 н. и 3 з.п. ф-лы, 1 табл., 11 пр.



I

(56) (продолжение):

206-209, 1b. B. Kaboudin et al. "Alumina-ammonium acetate as an efficient reagent for the one-pot synthesis of cis-2,4,5-triarylimidazolines from aromatic aldehydes" HETEROCYCLES, Vol.65, N2, 2005, 353-357. H. Uchida et al. "Microwave-Assisted Rapid and Selective Synthesis of cis- and trans-2,4,5-Triarylimidazolines from Aromatic Aldehydes" Synlett, N8, 2003, 1117-1120. JP 2003321457 A, 11.11.2003.

R U 2 7 3 0 4 9 7 C 1

1 C 7 6 4 0 9 7 2 7 3 0 4 9 7 R U



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 233/22 (2006.01)*A61K 31/4164* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07D 233/22 (2020.02); A61K 31/4164 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)(21)(22) Application: **2019124301, 31.07.2019**(24) Effective date for property rights:
31.07.2019Registration date:
24.08.2020

Priority:

(22) Date of filing: **31.07.2019**(45) Date of publication: **24.08.2020 Bull. № 24**

Mail address:

119234, Moskva, ul. Lomonosovskij prospekt, 27,
str. 1, Moskovskij gosudarstvennyj universitet
imeni M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe
intellektualnoe razvitie"

(72) Inventor(s):

**Bazanov Daniil Romanovich (RU),
Lozinskaya Natalya Aleksandrovna (RU),
Pervushin Nikolaj Viktorovich (RU),
Kopeina Gelina Sergeevna (RU),
Anikina Lada Vladimirovna (RU),
Savitskaya Viktoriya Yurevna (RU),
Maksutova Anita Irekovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

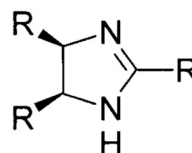
**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)**

(54) 2,4,5-TRI(METHOXYPHENYL)CIS-IMIDAZOLINE AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to cis-imidazoline derivatives of general formula I, in which R = 2-methoxyphenyl, 3-methoxyphenyl, 4-ethoxyphenyl, 2,3-dimethoxyphenyl, 3,4-dimethoxyphenyl, 2,5-dimethoxyphenyl, 2,4-dimethoxyphenyl, 3,4,5-trimethoxyphenyl, 3-methoxy-4-ethoxyphenyl or 3-methoxy-2-ethoxyphenyl. Invention also relates to an active component and a method of producing a compound of general formula I.

**I**

EFFECT: technical result is obtaining novel cis-imidazoline derivatives of general formula I, having inhibitory action on cell growth of non-small-cell lung cancer.

6 cl, 1 tbl, 11 ex

Область техники

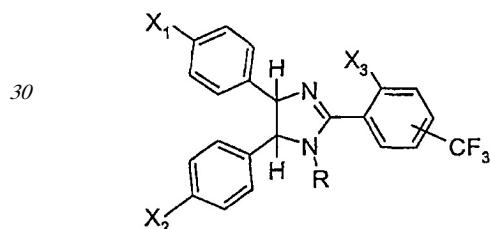
Изобретение относится к области органической и медицинской химии, фармацевтики и медицины, в частности онкологии, конкретно к новым производным 2,4,5-трис (метоксиарил)-цис-имидазолинов обладающих антипролиферативными свойствами.

Изобретение может быть использовано для лечения ряда онкологических заболеваний, связанных с пролиферацией опухолевых клеток, в частности немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, и других злокачественных новообразований.

Уровень техники

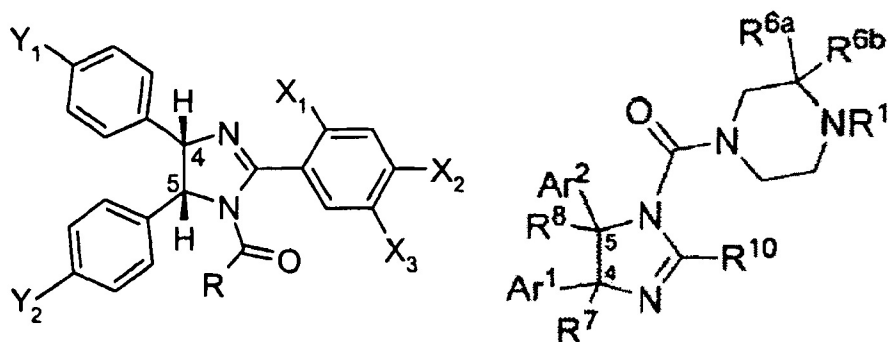
В настоящее время лечение онкологических заболеваний, связанных с пролиферацией опухолевых клеток, в частности немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, и других злокачественных новообразований представляет собой серьезную проблему, поскольку известные химиотерапевтические агенты, применяемые с этой целью, отличаются высокой острой токсичностью, их использование приводит к сужению терапевтического индекса и сопряжено с различными побочными эффектами в отношении здоровых клеток.

Известны соединения цис-имидазолинов общей формулы II (WO 2005/003097, 13.01.2005), обладающие антипролиферативной активностью, основанной на ингибировании MDM2-p53 взаимодействия, а также способ их получения. Способ заключается в последовательном проведении нескольких реакций с выделением промежуточных продуктов, в частности получение 1,2-бис(4-хлорфенил)этан-1,2-диамина, 4,5-бис(4-хлорфенил)-2-(2-изопропокси-4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазола их структурных аналогов с различными заместителями при атоме азота в имидазолиновом ядре. Однако данный способ получения соединений является трудоемким и высокзатратным, промежуточные вещества требуют дополнительных очисток (Zhuang C, Miao Z, Zhu L, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of orally active pyrrolidone derivatives as novel inhibitors of p53-MDM2 protein-protein interaction, J Med Chem., 2012).



II

Известны и другие структурные аналоги предлагаемых соединений, а именно соединения цис-имидазолинов общей формулы III (WO 2005/110996) и IV (WO 2009/047161), антипролиферативное действие которых основано также на ингибировании MDM2-p53 взаимодействия. Способ получения заключается в получении диамина - 1,2-бис(4-хлорфенил)этан-1,2-диамин, с последующим получением из него имидазолина. Однако, известные способы многостадийны (3-4 стадии синтеза) и время, затраченное на синтез составляет не менее 2 суток.

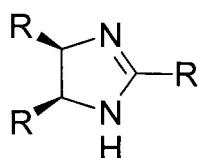


III

Технической проблемой является сложность и многостадийность способа получения цис-имидазолиновых структур, обладающих антипролиферативными свойствами.

Раскрытие изобретения

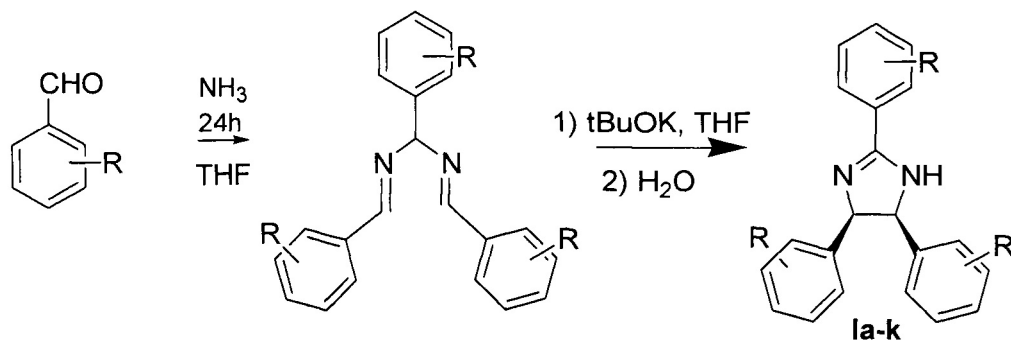
Техническая проблема решается новыми соединениями общей формулы I, где R = 2-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-метоксифенил, 4-этоксифенил, 2,3-диметоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 2,5-диметоксифенил, 2,4-диметоксифенил, 3,4,5-триметоксифенил, 3-метокси-4-этоксифенил, 3-метокси-2-этоксифенил.



I

Техническая проблема решается также активным компонентом, представляющим собой заявляемое соединение, обладающим антипролиферативными свойствами.

Также техническая проблема решается способом получения заявляемых



соединений формулы, который представляет собой двухстадийный синтез без выделения промежуточного продукта. На первой стадии проводят смешение исходных соединений в качестве которых использовали соответствующий алкоксибензальдегид и насыщенный аммиаком растворитель, взятый в массовом соотношении 1:10-1:100. По прошествии не менее 12 часов в реакционную смесь добавляли органическое основание, растворимое в используемом органическом растворителе в массовом соотношении исходный альдегид : органическое основание 1:0,1-1:3 (вторая стадия), после исчезновения интенсивной окраски в реакционную смесь добавляли воду для остановки реакции. Предпочтительно добавляют воду в массовом соотношении реакционная смесь : вода 1:0,1-1:10. Продукт экстрагировали, органическую вытяжку сушили над гигроскопичной неорганической солью, растворитель удаляли на вакууме. Производные

цис-имидазолина при необходимости очищали от примесей исходных веществ на силикагеле для хроматографии, в качестве элюента использовали смесь этилацетата с гексаном в объемном отношении 1:1 (Daniil R. Bazanov, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.007>).

Техническим результатом заявляемой группы изобретений является разработка одностадийного способа получения цис-имидазолиновых структур с сохранением цитотоксичности в микромолярном диапазоне за время не превышающее 24 часов.

Данные соединения позволяют расширить арсенал средств, обладающих антипролиферативным действием.

Осуществление изобретения.

Все используемые реагенты являются коммерчески доступными, все процедуры, если не оговорено особо, осуществляли при комнатной температуре или температуре окружающей среды, то есть в диапазоне от 18 до 25°C; выпаривание растворителя осуществляли с использованием роторного испарителя, при пониженном давлении при температуре бани примерно 50°C; контроль за ходом реакции осуществляли при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ), и время реакции указано только для иллюстрации; структуру и чистоту всех выделенных соединений подтверждали, по меньшей мере, одним из следующих методов: ТСХ (пластины для ТСХ с предварительно нанесенным силикагелем 60 F₂₅₄ Merck), масс-спектрометрия или ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Для получения заявляемых соединений использовали следующие коммерческие реагенты и растворители: тетрагидрофуран, сульфат натрия (осушитель), силикагель для колоночной хроматографии, этилацетат, гексан, газообразный аммиак, соответствующие альдегиды (Sigma Aldrich).

Выход продукта приведен только для иллюстрации. Колоночную флэш-хроматографию осуществляли, используя Merck силикагель 60 (230-400 меш ASTM). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) положительных ионов зарегистрированы на спектрометре Jeol GCMate II при энергии ионизации 70 eV. Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance-400 (рабочая частота 400.1 и 100.6 МГц для ¹H и ¹³C, соответственно) и Agilent 400-MR (рабочая частота 400.0 и 100.6 МГц для ¹H и ¹³C, соответственно), используя дейтерированный хлороформ (99,8% D) или метанол (99,8% D) или вода (99,9% D) в качестве растворителя, если не указано иное, относительно тетраметилсилана (TMS) в качестве внутреннего стандарта, миллионных долях (м.д.).

Структура заявляемых соединений доказана данными спектроскопии ЯМР (¹H и ¹³C), а индивидуальность - данными масс спектрометрии высокого разрешения.

Ниже представлено более подробное описание заявляемого изобретения. Настоящее изобретение может подвергаться различным изменениям и модификациям, понятным специалисту на основе прочтения данного описания. Такие изменения не ограничивают объем притязаний. Например, могут изменяться растворители, насыщенные аммиаком (тетрагидрофуран, диоксан, диэтиловый эфир, хлористый метилен), органические основания (третбутилат калия, третбутилат натрия, этилат калия, этилат натрия, гидрид натрия или гидрид калия), экстрагирующие агенты (этилацетат, диэтиловый эфир, хлороформ, хлористый метилен), гигроскопические неорганические соли для осушивания (безводный сульфат натрия, хлорид кальция и др.).

Пример 1. Цис-2,4,5-трис(2-метоксифенил)имидазолин (Ia).

Из 1,0 грамма (7,4 ммоль) 2-метоксибензальдегида растворяли в 10 мл насыщенного

аммиаком тетрагидрофурана. Реакционную смесь оставляли перемешиваться на 12 часов при комнатной температуре. Затем в реакционную смесь добавляли третбутилат калия 0,1 грамма, после исчезновения интенсивной окраски в реакционную смесь добавляли 3 мл воды. Продукт экстрагировали этилацетатом, органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, растворитель удаляли в вакууме. Очистку продукта проводили на хроматографической колонке, в качестве элюента использовали смесь этилацетата с гексаном в равных объемных отношениях. Время синтеза составило 18 часов.

Было получено 0,6 грамм желтого масла (63%); ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3 , 400,13 МГц), δ 3,63 (с, 6H); 3,93 (с, 3H); 5,87 (с, 2H); 6,56 (д, $J=8,1$ Гц, 2H); 6,65 (т, $J=7,5$ Гц, 2H); 6,98-7,12 (м, 6H); 7,47 (дд, $J=1,8$ Гц, $J=7,8$ Гц, 1H); 8,37 (дд, $J=1,6$ Гц, $J=7,7$ Гц, 1H); ^{13}C ЯМР-спектр (CDCl_3 , 100,61 МГц) δ 54,92; 55,77; 62,69; 109,05; 111,41; 119,46; 121,28; 127,55; 128,45; 131,71; 132,08; 156,58; 157,75; 163,44. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ 388.1787, найдено: 389.1867 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 2. Цис-2,4,5-трис(3-метоксифенил)имидазолин (Ib).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1, только в качестве растворителя использовали 100 мл насыщенного аммиаком диоксана, 1 грамм этилата калия, для остановки реакции использовали 10 мл воды, а для осушки органического слоя безводный сульфатом натрия.

Из 1,0 грамма (7,4 ммоль) 3-метоксибензальдегида получено 0,65 грамм желтого масла (68%); ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3 , 400,13 МГц), δ 3,60 (с, 6H); 3,88 (с, 3H); 5,41 (с, 2H); 6,49 (с, 2H); 6,59 (м, 4H); 6,98 (т, $J=7,9$ Гц, 2H); 7,08 (дд, $J=7,5$ Гц, $J=2,5$ Гц, 1H); 7,38 (т, $J=8,1$ Гц, 1H); 7,48 (д, $J=7,6$ Гц, 1H); 7,58 (м, 1H). ^{13}C ЯМР-спектр (CDCl_3 , 100,61 МГц) δ 55,10; 55,53; 112,12; 112,81; 113,03; 117,61; 119,37; 120,05; 128,61; 129,66; 131,36; 140,54; 159,13; 159,82; 164,49. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ 388.1787, найдено 389.1852 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 3. Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)имидазолин (Ic).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1, только в качестве растворителя использовали 50 мл насыщенного аммиаком хлороформа, 1 грамм гидрида натрия и 100 мл воды для остановки реакции.

Из 1,0 грамма (7,4 ммоль) 4-метоксибензальдегида получено 0,9 грамм белого твердого вещества (95%); ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3 , 400,13 МГц), δ 3,68 (с, 6H); 3,87 (с, 3H); 5,32 (с, 2H); 6,59 (д, $J=8,6$ Гц, 4H); 6,86 (д, $J=8,7$ Гц, 4H); 6,97 (д, $J=8,7$ Гц, 2H); 7,91 (д, $J=8,7$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР-спектр (CDCl_3 , 100,61 МГц) δ 55,11; 55,43; 69,95; 113,08; 113,94; 122,13; 128,57; 128,99; 131,15; 158,36; 161,93; 164,00.

Пример 4. Цис-2,4,5-трис(2,3-диметоксифенил)имидазолин (Id).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1, только в качестве растворителя использовали 50 мл насыщенного аммиаком диэтилового эфира, 2,5 грамма этилат натрия и 200 мл воды для остановки реакции.

Из 2,0 грамм (12 ммоль) 2,3-диметоксибензальдегида получено 1,2 грамма желтого масла (67%); ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3 , 400,13 МГц), δ 3,73 (с, 6H); 3,74 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 3,91 (с, 6H); 5,79 (д, $J=10,4$ Гц, 1H); 5,90 (д, $J=10,4$ Гц, 1H); 6,51 (с, 1H); 6,63 (д, $J=7,2$ Гц, 2H); 6,74-6,79 (м, 2H); 7,04 (д, $J=7,0$ Гц, 1H); 7,15 (дд, $J=7,9$ Гц, $J=15,9$ Гц, 2H); 7,89 (д, $J=7,8$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР-спектр (CDCl_3 , 100,61 МГц) δ 55,81; 55,98; 59,34; 60,39; 60,73; 61,54; 66,77; 111,26; 111,46; 112,12; 114,47; 120,50; 122,13; 122,55; 122,81; 124,33; 133,23; 146,81; 148,07; 151,98; 152,89; 163,37. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$

478.2104, найдено (М-Н): 477.2010 [М-Н]+.

Пример 5. Цис-2,4,5-трис(3-метокси-2-этоксифенил)имидазолин (Ie).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1.

Из 1,0 грамма (5,6 ммоль) 3-метокси-2-этоксibenзальдегида получено 0,8 грамм
 5 желтого масла (83%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 1,27 (т, J=7,1 Гц, 3H); 1,41
 (т, J=7,1 Гц, 3H); 3,71 (с, 6H); 3,89 (с, 3H); 4,00 (кв, J=13,0 Гц, 4H); 4,12 (кв, J=13,6 Гц, 2H);
 5,87 (кв, 2H); 6,62 (дд, J=1,4 Гц, J=7,6 Гц, 4H); 6,75 (т, J=7,8 Гц, 2H); 6,85 (д, J=7,6 Гц, 2H);
 7,03 (дд, J=1,5 Гц, J=8,1 Гц, 1H); 7,15 (т, J=8,1 Гц, 1H); 7,88 (дд, J=1,5 Гц, J=7,9 Гц, 1H). ¹³C
 ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 15,48; 15,87; 55,78; 68,62; 70,05; 111,25; 114,41; 122,53;
 10 122,65; 124,20; 133,31; 146,05; 146,98; 152,12; 152,98; 163,60. HRMS (ESI): m/z вычислено
 для C₃₀H₃₄N₂O₆ 520.2573, найдено: 519.2478 [М-Н]+.

Пример 6. Цис-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)имидазолин (If).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1.

Из 3,0 граммов (18,1 ммоль) 2,4-диметоксibenзальдегида получено 2,2 грамма
 15 желтого масла (76%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 3,60 (с, 6H); 3,70 (с, 6H);
 3,88 (с, 3H); 3,89 (с, 3H); 5,69 (с, 2H); 6,15 (д, J=2,3 Гц, 2H); 6,20 (дд, J=8,5 Гц, J=2,3 Гц,
 2H); 6,53 (д, J=2,2 Гц, 1H); 6,64 (дд, J=8,7 Гц, J=2,3 Гц, 1H); 6,94 (д, J=8,5 Гц, 2H); 8,39 (д,
 J=8,7 Гц, 1H). ¹³C ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 54,98; 55,22; 55,58; 55,77; 61,96;
 20 97,26; 98,73; 103,20; 105,47; 120,65; 128,88; 133,19; 157,53; 159,49; 162,96; 163,12. HRMS
 (ESI): m/z вычислено для C₂₇H₃₀N₂O₆ 478.2104, найдено: 479.2166 [М+Н]+.

Пример 7. Цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)имидазолин (Ig).

Получение соединения проводили аналогично примеру 3.

Из 2,0 граммов (12,0 ммоль) 3,4-диметоксibenзальдегида получен 1,3 грамма желтого
 25 масла (67%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 3,77 (с, 3H); 3,78 (с, 3H); 3,85 (с,
 6H); 3,88 (с, 6H); 6,74 (д, J=8,0 Гц, 1H); 6,79 (дд, J=1,7 Гц, J=8,2 Гц, 2H); 6,85 (д, J=1,7 Гц,
 1H); 6,90 (д, J=8,2 Гц, 2H); 7,32 (д, J=1,8 Гц, 2H); 7,38 (дд, J=1,8 Гц, J=8,2 Гц, 2H). ¹³C
 ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 55,91; 56,10; 67,87; 108,86; 110,36; 119,36; 123,87;
 30 126,77; 129,19; 130,06; 135,03; 149,22; 149,53; 151,62; 154,41; 160,24. HRMS (ESI): m/z
 вычислено для C₂₇H₃₀N₂O₆ 478.2104, найдено: 479.2166 [М+Н]+.

Пример 8. Цис-2,4,5-трис(2,5-диметоксифенил)имидазолин (Ih).

Получение соединения проводили аналогично примеру 2.

Из 2,0 граммов (12,0 ммоль) 2,5-диметоксibenзальдегида получено 1,8 грамма
 35 желтого порошка (90%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 3,55 (с, 6H); 3,58 (с,
 6H); 3,85 (с, 3H); 3,90 (с, 3H); 5,76 (с, 1H); 5,88 (с, 1H); 6,50 (д, J=8,7 Гц, 2H); 6,55 (дд, J=
 2,5 Гц, J=9,0 Гц, 2H); 6,67 (д, J=15,2 Гц, 2H); 6,96 (д, J=9,1 Гц, 1H); 7,03 (дд, J=3,2 Гц, J=
 8,9 Гц, 1H); 7,87 (дд, J=3,0 Гц, 1H). ¹³C ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 55,56; 55,70;
 56,04; 56,32; 110,23; 112,75; 112,95; 114,80; 118,80; 129,31; 151,10; 152,09; 152,89; 153,78;
 40 163,60. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₇H₃₀N₂O₆ 478.2104, найдено: 479.2163 [М+
 Н]+.

Пример 9. Цис-2,4,5-трис(3,4,5-триметоксифенил)имидазолин (Ii).

Получение соединения проводили аналогично примеру 1.

Из 2,0 граммов (10,2 ммоль) 3,4,5-триметоксibenзальдегида получено 1,6 грамма
 45 желтого порошка (73%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 3,63 (с, 12H); 3,69 (с,
 6H); 3,91 (с, 9H); 5,44 (с, 1H); 5,54 (с, 1H); 6,12 (с, 4H); 7,21 (с, 2H). ¹³C ЯМР-спектр
 (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 56,02; 56,38; 60,76; 60,98; 104,49; 105,21; 125,25; 134,54; 152,59;
 153,34; 164,55. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₃₀H₃₆N₂O₉ 568.2421, найдено: 569.2484

[M+H]⁺.

Пример 10. Цис-2,4,5-трис(4-этоксифенил)имидазолин (Ij).

Получение соединения проводили аналогично примеру 3.

Из 2,0 граммов (13,3 ммоль) 4-этоксibenзальдегида получено 1,6 грамма желтого масла (76%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 1,33 (т, J=6,9 Гц, 6H); 1,36 (т, J=6,9 Гц, 3H); 3,88 (кв, J=7,0 Гц, 4H); 4,10 (кв, J=6,9 Гц, 2H); 5,23 (с, 2H); 6,56 (с, J=8,7 Гц, 4H); 6,77 (д, J=8,7 Гц, 4H); 6,97 (д, J=8,7 Гц, 2H); 8,03 (д, J=8,7 Гц, 2H). ¹³C ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 14,28; 27,53; 29,89; 35,45; 62,71; 32,82; 65,55; 113,44; 114,50; 115,37; 127,05; 128,04; 130,87; 157,82; 162,95; 164,26; 179,87. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₇H₃₀N₂O₃ 430.2256, найдено: 431.2320 [M+H]⁺.

Пример 11. Цис-2,4,5-трис(3-метокси-4-этоксифенил)имидазолин (Ik).

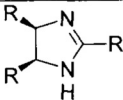
Получение соединения проводили аналогично примеру 1.

Из 1,0 грамма (13,3 ммоль) 3-метокси-4-этоксibenзальдегида получено 0,7 грамма желтого масла (73%); ¹H ЯМР-спектр (CDCl₃, 400,13 МГц), δ 1,28 (т, J=6,3 Гц, 3H); 1,4 (т, J=6,2 Гц, 6H); 3,45 (с, 6H); 3,80 (с, 3H); 3,85 (q, J=13,8 Гц, 4H); 4,04 (q, J=13,4 Гц, 2H); 5,12 (с, 2H); 6,22 (с, 2H); 6,47 (dd, J=7,7 Гц, J=20,8 Гц, 4H); 6,76 (д, J=7,9 Гц, 1H); 7,33 (д, J=7,5 Гц, 2H); 7,56 (с, 1H). ¹³C ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,61 МГц) δ 14,65; 30,79; 55,62; 56,01; 64,10; 64,28; 110,55; 111,46; 111,80; 119,68; 120,02; 122,50; 131,77; 147,05; 148,56; 149,11; 150,70. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₃₀H₃₆N₂O₆ 520.2573, найдено: 521.2634 [M+H]⁺.

Исследование антипролиферативной активности заявляемых соединений проводили на серии клеток немелкоклеточного рака легкого (A549) с помощью стандартного МТТ-теста с (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий бромидом. Результаты биологических испытаний представлены в Таблице 1.

Исследование антипролиферативной активности заявляемых соединений показало наличие ингибирующего действия в отношении роста клеток опухолей немелкоклеточного рака легкого (A549), для соединения If механизм действия дополнительно изучен для клеток колоректального рака (RKO).

Таблица 1. Ингибирующая активность заявляемых соединений.

Общая формула	Соединение	R	Ингибирующая активность, A549 (IC ₅₀ , μM)
	Ia	2-MeOPh	27.36±0.79
	Ib	3-MeOPh	64.31±1.04
	Ic	4-MeOPh	43.90±1.87
	Id	2,3-diMeOPh	16.18±0.29
	Ie	2-EtO,3-MeOPh	24.26±2.10
	If	2,4-diMeOPh	9.32±0.47
	Ig	3,4-diMeOPh	84.69±0.76
	Ih	2,5-diMeOPh	21.42±1.07
	Ii	3,4,5-trisMeOPh	356±5
	Ij	4-EtOPh	13.26±0.37
	Ik	3-MeO,4-EtOPh	67.49±0.04
	Nutlin-3a		15,12

Вестерн-блот анализ свидетельствует о том, что соединения Ic и If вызывают повышение уровня белка p53, что свидетельствует о схожем механизме действия

полученных соединений с их литературными аналогами. Так, для соединения If зафиксировано повышение концентрации белка p53 в 3,5 раза по сравнению с контролем.

Сравнимые значения цитотоксичности с известным аналогом Nutlin-3a, [Zhuang C, Miao Z, Zhu L, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of orally active pyrrolidone derivatives as novel inhibitors of p53-MDM2 protein-protein interaction, J Med Chem., 2012] а также данные вестерн-блот анализа по активации белка p53 свидетельствуют о потенциальной возможности их использования для лечения онкологических заболеваний, связанных с пролиферацией опухолевых клеток.

Определение антипролиферативных свойств.

Антипролиферативные свойства заявляемых соединений были определены по МТТ-тесту [Mather J.P., Roberts P.E. Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique. New York: Plenum Press, 1998, 175-194]. Культуры клеток человека A549 (ATCC®CCL-185™) выращивали в среде DMEM (НЛП ПанЭко), а клеток MCF7 (ATCC® HTB-22™) - в среде EMEM (НЛП ПанЭко). В ростовую среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2 ммоль L-глутамин (НЛП ПанЭко), 1% гентамицина (ОАО Биохимик) в качестве антибиотика и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Клетки сеяли в 96-луночный планшет (CELLTREAT™) в количестве 1×10⁴ клеток/200 мкл и культивировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли растворы тестируемых соединений различных концентраций (от 100 до 0,0012 мкмоль/л) и далее клетки культивировали в тех же условиях в течение 72 ч. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторностях. Все соединения растворяли в ДМСО (PANREAC QUIMICA S.L.U). Конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1% и не была токсична для клеток. В контрольные лунки добавляли растворитель в количестве 0,1%. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора 5 мг МТТ [бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия] (SigmaAldrich) в 1 мл ДМСО и дополнительно инкубировали в течение 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм, за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), оценивали на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0. Результаты определения концентраций заявляемых соединений, вызывающих 50%-ное ингибирование роста популяции клеток, приведены в таблице, представленной выше.

Вестерн-блот анализ

После культивирования клеток в необходимых условиях, указанных в описании эксперимента, клетки отделяли от поверхности чашек Петри с помощью 0,15% раствора трипсина или скребком и переносили в кондиционированную среду. Затем клетки центрифугировали (1000 gcf, 5 мин, +4°C), отделяли надосадочную жидкость и промывали холодным раствором PBS (ПанЭко). Процедуру центрифугирования повторяли и вновь удаляли надосадочную жидкость. Образовавшийся клеточный осадок ресуспендировали в 20-100 µl RIPA-буфера и инкубировали на льду в течение 20 минут. После центрифугирования (13200 gcf, 15 мин, +4°C) часть супернатанта была взята для определения количества белка в лизатах с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Другую часть супернатанта использовали для Вестерн-блот анализа. Объем клеточного лизата с содержанием белка 20-40 мкг смешивали с 4-5 мкл 5X Лэммли буфера и водой (в количестве, необходимом для получения конечного

объема пробы 20-25 мкл). Полученные пробы прогревали при 95°C в течение 5 мин. Затем образцы разделяли в ПААГ геле (4% - концентрирующий, 12% - разделяющий, в качестве буфера для проведения гель-электрофореза использовали IX электродный буфер) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с помощью приборов

Trans-Blot TurboTransfer System (Bio-Rad) или камер для переноса Mini Trans-Blot (Bio-Rad). В качестве буфера для переноса использовали соответствующий IX буфер.

Дальнейшие процедуры выполняли в условиях перемешивания на качающемся шейкере (ELMI S-4). Для определения загрузки геля при помощи реагента Ponceau S мембраны помещали в соответствующий раствор на 1 минуту, затем дважды отмывали в растворе

TBS (по 5 минут). Мембраны блокировали в течение 40 минут в 5% растворе

обезжиренного молока, разведенного в TBS. При покраске антителами на фосфорилированные формы белков для блокировки использовали 2,5% раствор BSA (Amresco) в TBS. Далее мембрану четырежды отмывали в растворе TBS и инкубировали

с первичными антителами, разведенными в соответствующем буфере, на протяжении

18±6 часов при температуре +40°C. После трех серий промывок в TBST мембрану инкубировали со вторичными антителами, разведенными в 2,5% растворе обезжиренного

молока (или 1,25% растворе BSA) на протяжении 1 часа, затем трижды промывали в растворе TBST. Мембраны проявляли с помощью реагентов ECL (Promega) или

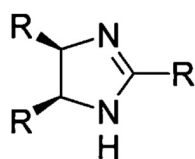
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) на приборе Molecular

Imager ChemiDoc (Bio-Rad). В случае необходимости покраски другими антителами мембраны инкубировали в Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) в течение 5-15 минут, после чего отмывали трижды раствором TBS, повторно блокировали мембрану, отмывали ее и заливали первичными антителами. Денситометрический анализ проводили с использованием ChemiDoc MP.

Таким образом, за время, не превышающее 24 часа, были синтезированы новые производные цис-имидазолинов, обладающие цитотоксичностью в микромолярном диапазоне. Также синтезированные производные цис-имидазолинов, обладают умеренной растворимостью в физиологических средах.

(57) Формула изобретения

1. Производные цис-имидазолина общей формулы I



I

где R=2-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 2,3-диметоксифенил, 3,4-диметоксифенил, 2,5-диметоксифенил, 2,4-диметоксифенил, 3,4,5-триметоксифенил, 3-метокси-4-этоксифенил или 3-метокси-2-этоксифенил.

2. Активный компонент, характеризующийся тем, что представляет собой соединение по п. 1, обладающее ингибирующим действием в отношении роста клеток опухолей немелкоклеточного рака легкого.

3. Способ получения соединения общей формулы I по п. 1, характеризующийся тем, что к соответствующему альдегиду при комнатной температуре добавляют насыщенный аммиак тетрагидрофуран, диоксан, диэтиловый эфир, хлороформ в массовом соотношении 1:10-1:100, по прошествии не менее 12 часов к реакционной смеси добавляют органическое основание в массовом соотношении исходный альдегид:

основание 1:0,1-1:3, реакцию ведут до исчезновения интенсивной окраски, затем к реакционной смеси добавляют воду для остановки реакции в массовом отношении 1:0,1-1:10, полученный продукт экстрагируют, органический слой сушат над гигроскопичной неорганической солью, растворитель удаляют в вакууме.

5 4. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что в качестве гигроскопичной неорганической соли используют безводный сульфат натрия или хлорид кальция.

5. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что дополнительно полученный продукт очищают на силикагеле смесью этилацетат:гексан 1:1.

10 6. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что в качестве органического основания используют третбутилат калия, третбутилат натрия, этилат калия, этилат натрия, гидрид натрия или гидрид калия.

15

20

25

30

35

40

45