



(51) МПК
C07D 403/04 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07D 403/04 (2023.02); A61K 31/53 (2023.02); A61P 35/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022135121, 29.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 29.12.2022

Дата регистрации:
 13.03.2023

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 29.12.2022

(45) Опубликовано: 13.03.2023 Бюл. № 8

Адрес для переписки:
 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.
 Ленинградская, 70, ФГБУ "РНЦРиХТ" МЗ
 РФ, Попова Алена Александровна

(72) Автор(ы):
 Молчанов Олег Евгеньевич (RU),
 Семенов Константин Николаевич (RU),
 Шаройко Владимир Владимирович (RU),
 Попова Елена Александровна (RU),
 Протас Александра Владимировна (RU),
 Миколайчук Ольга Владиславовна (RU),
 Попова Алена Александровна (RU),
 Майстренко Дмитрий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
 Федеральное государственное бюджетное
 учреждение "Российский научный центр
 радиологии и хирургических технологий
 имени академика А.М. Гранова"
 Министерства здравоохранения Российской
 Федерации (RU)

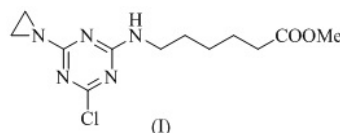
(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: Mikolaichuk, O.V. et al. A new
 tetrazole-containing 2-amino-4,6-di(aziridin-1-yl)-
 1,3,5-triazine derivative: synthesis, interaction with
 DNA, and antitumor activity. Russian Chemistry
 Bulletin, 2022, v.71, no.5, pp.1050-1056. Voeikov
 R.V. et al. Dioxadet-loaded nanogels as a potential
 formulation for glioblastoma treatment. Journal
 of (см. прод.)

(54) Метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноат, обладающий цитотоксическим действием

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтической химии, а именно к метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноату формулы (I). Технический результат: соединение формулы (I), обладающее выраженным цитотоксическим действием и

являющееся малотоксичным. 3 ил., 2 табл.



(56) (продолжение):

Pharmaceutical Investigation, 2017, v.47, pp.75-83. WO 2013102431 A1, 11.07.2013. PUBCHEM CID: 134001500, create date 26.03.2005. RU 2541525 C2, 20.02.2015.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 403/04 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07D 403/04 (2023.02); A61K 31/53 (2023.02); A61P 35/00 (2023.02)(21)(22) Application: **2022135121, 29.12.2022**(24) Effective date for property rights:
29.12.2022Registration date:
13.03.2023

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2022**(45) Date of publication: **13.03.2023** Bull. № 8

Mail address:

197758, Sankt-Peterburg, pos. Pesochnyj, ul.
Leningradskaya, 70, FGBU "RNTSRiKHT" MZ
RF, Popova Alena Aleksandrovna

(72) Inventor(s):

**Molchanov Oleg Evgenevich (RU),
Semenov Konstantin Nikolaevich (RU),
Sharoiko Vladimir Vladimirovich (RU),
Popova Elena Aleksandrovna (RU),
Protas Aleksandra Vladimirovna (RU),
Mikolaichuk Olga Vladislavovna (RU),
Popova Alena Aleksandrovna (RU),
Maistrenko Dmitrii Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie "Rossiiskii nauchnyi tsentr
radiologii i khirurgicheskikh tekhnologii imeni
akademika A.M. Granova" Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) METHYL 6-[(4-(AZIRIDIN-1-YL)-6-CHLORO-1,3,5-TRIAZIN-2-YL)AMINO]HEXANOATE, WHICH HAS A CYTOTOXIC EFFECT

(57) Abstract:

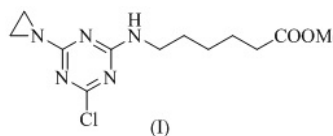
FIELD: pharmaceutical chemistry.

SUBSTANCE: methyl 6-[(4-(aziridin-1-yl)-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]hexanoate, which has a cytotoxic effect, belongs to a new chemical compound, which belongs to derivatives 1,3,5-triazine and has a cytotoxic effect. The invention relates to the field of pharmaceutical chemistry, namely to methyl 6-[(4-(aziridin-1-yl)-6-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]

hexanoate of formula (I).

EFFECT: compound of formula (I) which has a pronounced cytotoxic effect and is low toxic.

1 cl, 3 dwg, 2 tbl



Изобретение относится к новому химическому соединению, а именно метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноату, который относится к производным 1,3,5-триазина и обладает цитотоксическим действием. Указанное свойство определяет возможность использования соединения в медицине, и в частности, в онкологии.

В настоящее время в онкологической практике используются препараты, относящиеся по механизму действия к десяти группам:

1. Алкилирующие противоопухолевые препараты.

1.1. Аналоги азотистого иприта: циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, хлорметин, фосфамид, трофосфамид, преднимустин, бендамустин.

1.2. Алкилсульфонаты: бусульфан, тресульфан, манно-сульфан.

1.3. Этилденимины: тиотепа, триазихон, карбохон.

1.4. Производные нитрозомочевины: кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин.

1.5. Эпоксиды: этоглоцид.

1.6. Триазины: прокарбазин, темозоломид, дакарбазин.

1.7. Комплексные соединения платины: карбоплатин, оксалиплатин, цисплатин.

2. Антиметаболиты.

2.1. Аналоги фолиевой кислоты: метотрексат, ралтитрексид, пеметрексед, пралатрексат.

2.2. Аналоги пурина: меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин, флударабин, клофарабин.

2.3. Аналоги пиримидина: цитарабин, фторурацил, тега-фур, кармофур, гемцитабин, капецитабин, азациитидин, децитабин.

Алкалоиды растительного происхождения.

3.1. Алкалоиды борвинка и его аналоги: винбластин, винкристин, виндезин, винорельбин, винфлуинин.

3.2. Производные подофиллотоксина (ингибиторы топоизомеразы): этопозид, тенипозид.

3.3. Производные колхицина: демеколцин.

3.4. Таксоиды: паклитаксел, доцетаксел, кабазитаксел.

3.5. Другие препараты естественного происхождения: трабектедин.

4. Противоопухолевые антибиотики.

4.1. Актиномицины: актиномицин.

4.2. Антрациклины: доксорубицин, даунорубицин, эпиру-бицин, алкарубицин, зорубицин, идарубицин, митоксантрон, пирарубицин, валрубицин.

4.3. Прочие антибиотики: блеомицин, пликамицин, мито-мицин, ксабепилон.

5. Другие противоопухолевые препараты.

5.1. Моноклональные антитела: эдреколомаб, ритуксимаб, трастузумаб, алемтузумаб, гембузумаб, цетуксимаб, бева-цизумаб, панитумумаб, катумаксомаб, офатумумаб, ипилимумаб, брентуксимаб, пертузумаб, трастузумаб, обинутузумаб, ниволумаб, пембролизумаб, блинатумомаб, рамуцирумаб, нецитумумаб.

5.2. Препараты фотодинамической и радиационной тера-пии: порфимер натрия, метиламинолевулилат, аминолевулиновая кислота, темопрофин, эфапроксирал.

5.3. Ингибиторы протеинкиназы, тирозинкиназы: имати-ниб, гифитиниб, элротиниб, сунитиниб, сорафениб, дазатиниб, лапатиниб, нилотиниб, темсиролимус, эверолимус, пазопаниб, вандетаниб, афатиниб, бозутиниб, вемурафе-ниб, кризотиниб, акситиниб, руксолитиниб, радафорулимус, регарофениб, маситиниб, дабрафениб, понатиниб,

траметиниб, ленватиниб, нинтеданиб, цедираниб, палбо-циклиб, тивозаниб, кобиметиниб.

6. Гормоны и их производные.

5 6.1 Эстрогены: диэтилстилбэстрол, полиэстрадиола фосфат, этинилэстрадиол, фосфэстрол.

6.2. Прогестагены: мегестрол, медроксипрогестерон.

6.3. Аналоги рилизинг гормона: бусерелин, лейпрорелин, гозерелин, трипторелин.

7. Антагонисты гормонов и их аналоги.

10 7.1. Антиэстрогены: тамоксифен, торемифен, фулвестрант.

7.2. Антиандрогены: флутамид, нилутамид, бикалутамид, энзалутамид.

7.3. Прочие антагонисты гормонов и подобные препараты: аминоклутетимид, форместан, анэстрозол, летрозол, ворозол, экземестан, абареликс, дегареликс, абиратерон.

8. Иммуностимуляторы.

15 8.1. Колиниестимулирующие факторы: Филграстим, Мол-грамостим, Сарграмостим, Ленограстим, Анцестим, Пегфилграстим, Липегфилграстим.

8.2. Интерфероны: Интерферон альфа, Интерферон бета, Интерферон гамма, пегинтерферон альфа.

8.3. Интерлейкины: алдеслейкин, опрелвекин.

20 8.4. Прочие иммуностимуляторы: вакцина для лечения рака мочевого пузыря БЦЖ, лентинан, рохинимекс, пидотимод, тимопентин, иммуноцианин, тазонермин, мифамуртид, гла-тирамера ацетат, плериксафор, криданомод.

9. Иммунодепрессанты.

25 9.1. Селективные иммунодепрессанты: мирномаб, мико-феноловая кислота, сиролimus, лефлуномид, алефацепт, эверолимус, гусперимус, эфализумаб, абетимус, натализумаб, абатацепт, экулизумаб, белимумаб, финголимод, белатацепт, тофацитиниб, терифлуномид, апремиласт, бегеломаб.

9.2. Ингибиторы фактора некроза опухолей альфа: этанероцепт, инфликсимаб, афелимомаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, голимумаб.

30 9.3. Ингибиторы интерлейкина: даклизумаб, базиликсимаб, анакинра, рилонацепт, устекинумаб, меполизумаб, тоцилизумаб, канакиумаб, бродалумаб.

9.4. Ингибиторы кальциневрина: циклоспорин, такролимус.

9.5. Прочие иммунодепрессанты: азатиоприн, талидомид, метотрексат, леналидомид, помалидомид, преднизолон.

35 10. Радиотерапевтические противоопухолевые препараты.

10.1. Препараты для паллиативного лечения костных метастазов: стронций-89 хлорид, самария - 153 лексидронам, рения-186 этидроновая кислота.

10.2. Прочие лечебные радиофармацевтические препараты: йод-131, иттрий-90, радия хлорид - 223.

40 Алкилирующие агенты чаще всего включаются в схемы химиотерапии злокачественных солидных опухолей и гемобластозов. Большинство отечественных и зарубежных исследователей считают их наиболее перспективной группой химиопрепаратов (Sherer C., Snape T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives // European Journal of Medicinal Chemistry. - 2015. - Vol. 97. - P. 552-560; Kharb R. Updates on Receptors Targeted by Heterocyclic Scaffolds: New Horizon in Anticancer Drug Development // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. - 2021. - Vol. 21, - № 11. - P. 1338-1349; Martins P., Jesus J., Santos S., Raposo L.R., Roma C. Heterocyclic Anticancer Compounds:

Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box // *Molecules*. - 2015. - Vol. 20, - № 9. - P. 16852-16891).

Среди алкилирующих агентов наибольшее распространение получили препараты платины, являющиеся основой стандартных комбинированных схем лечения большинства опухолей, а также гетероциклические соединения.

Замещенные 1,3,5-триазины являются перспективными гетероциклическими соединениями, которые используются в современной медицинской химии при разработке активных фармацевтических субстанций лекарственных средств, используемых в терапии онкологических заболеваний (Singla P., Luxami V., Paul K. Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2015. - Vol. 102. - P. 39-57; Cascioferro S., Parrino B., Spanò V., Carbone A., Montalbano A., Barraja P., Diana P., Cirrincione G. 1,3,5-Triazines: A promising scaffold for anticancer drugs development // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2017. - Vol. 142. - P. 523-549).

Некоторые производные 1,3,5-триазина, такие как алтретамин

(N²,N²,N⁴,N⁴,N⁶,N⁶-гексаметил-1,3,5-триазин-2,4,6-триамин) (Фиг.1(1)), являются алкилирующими агентами и проявляют противоопухолевый эффект, обусловленный действием их метаболитов, мишенью для которых является молекула ДНК (Singla P., Luxami V., Paul K. Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2015. - Vol. 102. - P. 39-57.; Cascioferro S., Parrino B., Span V., et al. 1,3,5-Triazines: A promising scaffold for anticancer drugs development // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2017. - Vol. 142. - P. 523-549). Стоит отметить, что цитотоксическая активность алтретрамина проявляется только под действием микросом печени и NADPH системы при образовании цитотоксических метаболитов (Pratt W.B., Ruddon R.W., Ensminger W.D., Maybaum J. *The anticancer drugs*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, - 1994.). Данное обстоятельство привело к значительному ограничению использования алтретрамина в качестве противоопухолевого средства вследствие плохо контролируемой токсичности. В настоящее время он используется лишь во второй линии терапии резистентных к препаратам платины опухолей яичника.

Значительное цитотоксическое действие проявляют 2,4,6-замещенные производные 1,3,5-триазина, содержащие в качестве заместителей азиридиновые циклы.

Алкилирующий агент третамин (триэтиленмеламин, ТЕМ) (Фиг.1(2)) некоторое время использовался в лечении ретинобластомы, однако вследствие выраженной токсичности в настоящее время его использование ограничено (Wong J. R., Morton L. M., Tucker M. A., Abramson D. H., Seddon J. M., Sampson J. N., Kleinerman R. A. Risk of Subsequent Malignant Neoplasms in Long-Term Hereditary Retinoblastoma Survivors After Chemotherapy and Radiotherapy // *Journal of Clinical Oncology*. - 2014. - Vol. 32, № 29. - P. 3284-3290).

Прокарбазин и дакарбазин применяются во второй линии терапии гемобластозов.

Дакарбазин использовался в лечении больных с диссеминированной меланомой до появления таргетных препаратов. Показаниями для темозоломида являются опухоли центральной нервной системы, а также меланома при наличии резистентности к другим вариантам лечения. Широкому внедрению трех указанных препаратов препятствует выраженная токсичность. В 1996 г. в РФ было получено вещество [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанол (Фиг.1 (3)) с противоопухолевой активностью, принадлежащее к группе алкилирующих агентов класса этилениминов (Bespalov V. G., Kireeva G. S., Belyaeva O. A., Senchik K. Y., Stukov A. N., Maydin M. A., Semenov A. L., Gafton G. I., Guseynov K. D., Belyaev A. M. Experimental Study of Antitumour Activity and Effects on Leukocyte Count of Intraperitoneal Administration and Hyperthermic Intraperitoneal Chemoperfusion (HIPEC) with Dioxadet in a Rat Model of

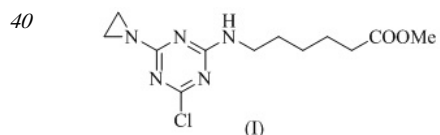
Ovarian Cancer // Journal of Chemotherapy. - 2016. - Vol. 28, № 3. P. 203-209).

Противоопухолевое действие [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола (диоксадэт) было выявлено в экспериментах по ингибированию роста опухоли *in vitro* на моделях клеточных линий глиобластомы (Voeikov R., Abakumova T., Grinenko N., Melnikov P., Besspalov V., Stukov A., Chekhonin V., Klyachko N., Nukolova N. Dioxadet-loaded nanogels as a potential formulation for glioblastoma treatment // Journal of Pharmaceutical Investigation. - 2017. - Vol. 47, - № 1. - P. 75-83). В период до 2000 года, когда не требовалось разрешение МЗ РФ на проведение пилотных клинических исследований, это вещество было использовано при лечении нескольких десятков больных, однако в связи с отсутствием данных доклинических исследований, в дальнейшем не проводилось многоцентровых исследований, и вещество так и не было зарегистрировано в качестве лекарственного препарата. В настоящее время оно используется лишь в экспериментах (M.L. Gershanovich, V.A. Filov, D.G. Kotova, A.N. Stukov, I.N. Sokolov, B.A. Ivin, Multicenter clinical trial of the antitumor drug Dioxadet (phase II) // Vopr. Onkol. - 1998. - Vol. 44. - P. 216-220). (патент RU 2065734 C1, опублик. 20 августа 1996 г., А.Е. Borisov, M.L. Gershanovich, V.P. Zemlianoĭ, S.L. Nepomniashchaia, A.N. Stukov, V.A. Filov, The use of dioxadet in chemoembolization of the hepatic artery in primary and metastatic cancer of the liver // Vopr. Onkol. - 1998. - Vol. 44. - P. 714-717; A.M. Granov, A.I. Gorelov, M.L. Gershanovich, M.I. Karelin, A. V Vorob'ev, V.A. Filov, A.N. Stukov, Results of endovascular interventions (embolization and chemoembolization) in the treatment of operable and extensive kidney cancer // Vopr. Onkol. 1998. - Vol. 44. - P. 711-714). Полученные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о выраженной токсичности [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола (диоксадэт). Также существенным ограничением диоксадэта является миелосупрессия. Все это свидетельствует о необходимости применения специальных методов для снижения потенциального вреда при применении этого вещества, а также о необходимости поиска веществ с меньшими токсическими эффектами.

Таким образом, перспективным направлением является разработка и получение алкилирующих агентов на основе 1,3,5-триазина с азиридиновыми циклами в качестве заместителей, обладающих высокой противоопухолевой активностью и меньшей токсичностью, чем известные противоопухолевые лекарственные средства.

Задачей настоящего исследования являлось создание нового малотоксичного химического соединения, обладающего выраженным цитотоксическим действием, которое может быть использовано в качестве активного компонента при создании противоопухолевых лекарственных средств.

Поставленная задача решается новым химическим соединением, а именно, метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноат формулы (I), обладающим выраженным цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеточным линиям человека (T98G, A549, PANC-1, SK-HEP-1, PA-1).



Заявленное изобретение - метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноат - относится к производным шестичленного азотсодержащего гетероцикла - 1,3,5-триазина. Соединение (I) содержит в качестве заместителей сложноэфирную группу - метил 6-аминогексаноат - во втором положении гетерокольца, азиридиновый цикл - в четвертом положении, и атом хлора - в шестом положении

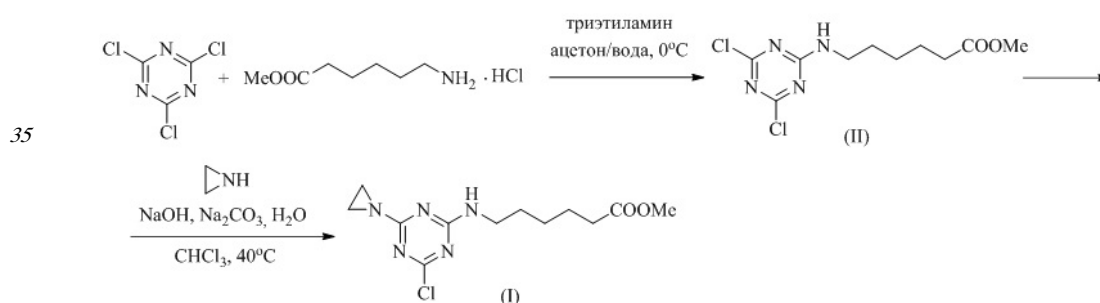
гетероцикла. Цитотоксическое действие соединения обусловлено наличием в молекуле вещества (I) азиридинового цикла. Таким образом, заявленное соединение (I) относится к алкилирующим агентам класса этилениминов. Наличие сложноэфирной группы в молекуле способствует увеличению липофильности соединения (I), что приводит к повышению его биодоступности за счет прохождения через билипидный слой клетки. Кроме того, последующая модификация введенной в 1,3,5-триазиновый цикл сложноэфирной группы - метил 6-аминогексаноата - в дальнейшем позволит получить линкерную группу для связывания вещества (I) с молекулами адресной доставки.

Синтез заявленного соединения (I) осуществлялся с применением стандартных методик, ранее описанных в литературе. Так, для получения моно-, ди- и тризамещенных 1,3,5-триазинов наиболее доступным реагентом является 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазин. Атомы хлора в 2-, 4- и 6-положениях 1,3,5-триазинового цикла 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазина обладают различной реакционной способностью по отношению к нуклеофилам. Изменение температурного режима реакции позволяет последовательно вводить различные заместители в триазиновый цикл (Blotny G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis // Tetrahedron. - 2006. - Vol. 62, № 41. - P. 9507-9522).

Введение азиридиновых циклов в 1,3,5-триазиновое кольцо можно осуществить, действуя азиридином на хлорзамещенные 1,3,5-триазины (patent 2,653,934 patented 29 Sept. 1953 (US); patent 2,520,619 patented 29 Aug. 1950 (US)).

Способ получения метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата заключается во взаимодействии 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазина с метил 6-аминогексаноатом гидрохлоридом в смеси ацетон-вода в соотношении 1:1 с получением промежуточного продукта метил 6-[(4,6-дихлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата формулы (II). Соединение (II) после выделения и очистки методом колоночной хроматографии вводили в реакцию с азиридином в гетерофазной системе хлороформ-вода в соотношении 1:1 в присутствии гидроксида натрия и карбоната натрия для получения заявленного метил 6-[(4,6-ди(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата (I). Очистку соединения (I) осуществляли методом колоночной хроматографии.

Синтез проводится в соответствии со схемой:



40 Приводим варианты синтеза предлагаемого соединения и пример исследования цитотоксичности и острой токсичности.

Методика синтеза метил 6-[(4,6-дихлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата (II). К раствору 2.0 г (10.8 ммоль) 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазина в 30 мл ацетона при охлаждении до 0°C добавили раствор 2.0 г (11.0 ммоль) метил 6-аминогексаноата гидрохлорида в 30 мл воды. К реакционной массе при перемешивании добавляли по каплям триэтиламин до pH 8 и перемешивали в течение 2 ч. По окончании времени выдержки реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя хлороформ в качестве

элюента.

Выход 2.8 г (88%). Температура плавления (Т.пл.). 65-66°C. Найдено, %: С, 40.91; Н, 4.69; Cl, 23.88; N, 19.14; O, 11.01. $C_{10}H_{14}Cl_2N_4O_2$. Вычислено, %: С, 40.97; Н, 4.81; Cl, 24.19; N, 19.11; O, 10.92. Спектр 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ , м.д.: 6.28 (с, 1H, NH), 3.69 (с, 3H, CH_3), 3.50 (д, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 2.35 (т, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.73 - 1.58 (м, 4H, 2 CH_2), 1.45 - 1.41 (м, 2H, CH_2). Спектр ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$) δ , м.д.: 173.95 (C=O), 170.99 ($C_{\text{Триазин}}$), 169.75 ($C_{\text{Триазин}}$), 165.84 ($C_{\text{Триазин}}$), 51.63 (O CH_3), 41.25 (CH_2), 33.73 (CH_2), 28.64 (CH_2), 26.07 (CH_2), 24.31 (CH_2).

Методика синтеза метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата (I). К раствору 0.4 г (10 ммоль) гидроксида натрия и 2.22 г (21 ммоль) карбоната натрия в 50 мл воды добавляли 1.94 г (9.5 ммоль) бромэтанамина гидробромида. Реакционную массу перемешивали при 47°C в течение 2 ч. К полученному раствору азиридина добавляли раствор метил 6-[(4,6-дихлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноата 2.76 г (9.4 ммоль) в хлороформе (50 мл) и перемешивали при 40°C в течение 16 ч. По окончании времени выдержки реакционную массу упаривали при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя хлороформ в качестве элюента.

Выход 0.85 г (30%). Т.пл. 85-87°C. ESI⁺-MS, m/z : 322.1035 [$M + Na$]⁺ (вычислено для $C_{12}H_{18}ClN_5O_2$: 322.1041). Спектр 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ , м.д.: 7.28 (с, 1H, NH), 3.65 (с, 3H, CH_3), 3.42 (д, $J=5.1$ Hz, 2H, CH_2), 2.36 (уш. с, 4H, 2 CH_2), 2.30 (т, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.76-1.53 (м, 4H), 1.43 - 1.29 (м, 2H, CH_2). Спектр ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$) δ , м.д.: 176.07 (C=O), 174.05 ($C_{\text{Триазин}}$), 169.62 ($C_{\text{Триазин}}$), 166.43 ($C_{\text{Триазин}}$), 51.60 (O CH_3), 40.93 (CH_2), 40.79 (CH_2), 28.88 (CH_2 азиридин), 27.43 (CH_2 азиридин), 27.21 (CH_2), 26.21 (CH_2), 24.48 (CH_2).

Изучение цитотоксичности метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноатом (I) и референсного соединения [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола проводили с помощью МТТ-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клетках линии аденокарциномы базального эпителия лёгких человека A549 и клетках линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 согласно методике, опубликованной в работе (Mosmann, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays (англ.) // Journal of Immunological Methods. - 1983. - Vol. 65, no. 1-2. - P. 55-63.). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при +37 °C в увлажнённой атмосфере, содержащей воздух и 5% CO_2 в питательной среде DMEM, содержащей 10 % термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 50 Ед·мл⁻¹ пенициллина и 50 мкг·мл⁻¹ стрептомицина.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи в CO_2 -инкубаторе для прикрепления клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили 5000 клеток в 200 мкл среды DMEM). Подсчёт числа клеток проводилось на анализаторе жизнеспособности клеток BioRad TC10 (Bio-Rad Laboratories, США). После чего в лунки добавляли среду DMEM, содержащую тестируемые соединения. Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 ч в CO_2 -инкубаторе при +37°C. По окончании инкубационного периода питательную среду DMEM удаляли путём инвертирования планшета. Далее в лунки вносили 100 мкл среды

DMEM и 20 мкл МТТ-реагента ($5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$) и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе при $+37^\circ\text{C}$. После удаления надосадочной жидкости кристаллы формазана растворяли в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл/лунку ДМСО и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRadxMarx (Bio-Rad Laboratories, США) при длине волны 540 нм и 690 нм. В результате взаимодействия МТТ с НАД(Ф)Н-зависимыми клеточными оксидоредуктазами образуется окрашенный продукт - формазан, с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Для коррекции фона из значений оптической плотности при 540 нм вычитали значения оптической плотности при 690 нм для соответствующих лунок. Данные нормировали в процентах по отношению к клеткам, инкубированным без тестируемых соединений.

Соединение (I) и [5-((4,6-бис(азириндин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанол вызывают выраженное дозозависимое снижение выживаемости клеток линий A549 и PANC-1, но подавление роста значительно более выражено у синтезированного нами соединения (I) (Фиг 2, 3).

Таким образом, метил 6-[(4-(азириндин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино] гексаноатом (I) проявляет цитотоксическое действие в отношении клеточных линий аденокарциномы альвеолярного базального эпителия человека A549 и карциномы поджелудочной железы PANC-1, значительно более выраженное по сравнению с референсным соединением [5-((4,6-бис(азириндин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанолом. Для Соединения (I) и [5-((4,6-бис(азириндин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола величина IC_{50} составила 12.4 мкМ и 13.9 мкМ для клеточной линии A549; величина IC_{50} составила 3.1 и 4.1 мкМ для клеточной линии PANC-1. Также вещество (I) проявляет значительно более выраженную цитотоксическую активность по сравнению с цисплатином для исследуемых клеточных линий (таблица 1).

| Вещество | Наименование клеточной линии | |
|--|------------------------------|-------------------|
| | A549 | PANC-1 |
| Соединение (I) | 12.4 | 3.1 |
| [5-((4,6-бис(азириндин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола | 13.9 | 4.1 |
| Цисплатин | 19.0 ¹ | 14.6 ² |

¹ - Drug: Cisplatin - Cancerrxgene - Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, (n.d.). <https://www.cancerrxgene.org/compound/Cisplatin/1005/by-tissue?>

² - M. Beer, N. Kuppalu, M. Stefanini, H. Becker, I. Schulz, S. Manoli, J. Schuette, C. Schmees, A. Casazza, M. Stelzle, A. Arcangeli, A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts // Sci. Rep. - 2017. - Vol. 7. - P. 1-12.

Оценка острой токсичности проводилась на крысах-самках породы Вистар с массой тела 200 - 250 грамм, полученных из питомника «Рапполово». Для исследования использовались: исследуемое Соединение (I), которое вводилось внутривентриально в виде раствора с интервалом дозы 0,5 мг/кг; соединение [5-((4,6-бис(азириндин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола (Диоксадет) с тем же режимом введения; а также коммерческий препарат Цисплатин-Тева с концентрацией

0,5 мг в 1 мл во флаконах по 20 мл, также используемый с интервалом дозы 0,5 мг/кг внутривенно.

В результате проведенного исследования мы выяснили, что синтезированное Соединение (I), превосходит препараты сравнения по показателям максимально переносимой дозы ((МПД), максимальная доза, не приводящая к гибели животного по причинам, не связанным с канцерогенностью) и ЛД₅₀ (средняя доза вещества, вызывающая гибель животных испытываемой группы (Таблица 2)).

10

| Исследуемое вещество | МПД | LD ₅₀ |
|----------------------|-----------|------------------|
| Соединение (I) | 6 мг/кг | 22 мг/кг |
| Диоксидет | 1,5 мг/кг | 10 мг/кг |
| Цисплатин-Тева | 4 мг/кг | 16,5 мг/кг |

15 Таким образом, полученное соединение при сравнении с референтными соединениями обладает улучшенными цитотоксическими свойствами, что показано в ММТ-тесте, а также обладает меньшей системной токсичностью. Кроме того, у этого соединения есть функциональные группы, позволяющие ковалентно связывать его с молекулами адресной доставки к компонентам опухоли (антитела, альтернативные каркасные белки) и создавать современные препараты для лечения онкологических заболеваний.

20 Для лучшего понимания приводим описание чертежей.

Фиг. 1 - Замещенные 1,3,5-триазины с противоопухолевой активностью, где:

1 - алтретамин;

2 - третамин;

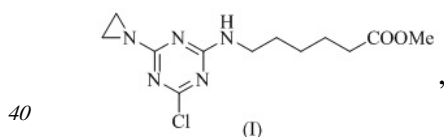
25 3-[5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанол.

Фиг. 2 - цитотоксический эффект метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноатом (I) и референтного соединения [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола в отношении клеточной линии A549.

30 Фиг. 3 - цитотоксический эффект метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноатом (I) и референтного соединения [5-((4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]-метанола в отношении клеточной линии PANC-1.

35 (57) Формула изобретения

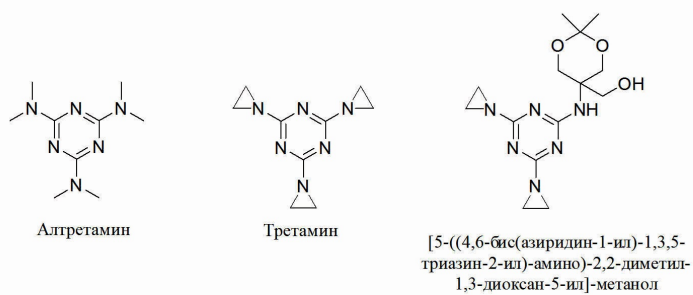
Метил 6-[(4-(азиридин-1-ил)-6-хлоро-1,3,5-триазин-2-ил)амино]гексаноат формулы (I)



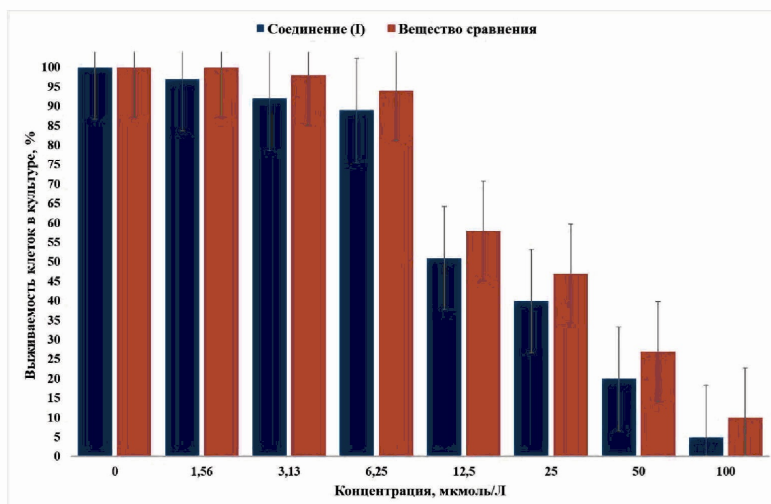
обладающий выраженным цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеткам человека.

45

1

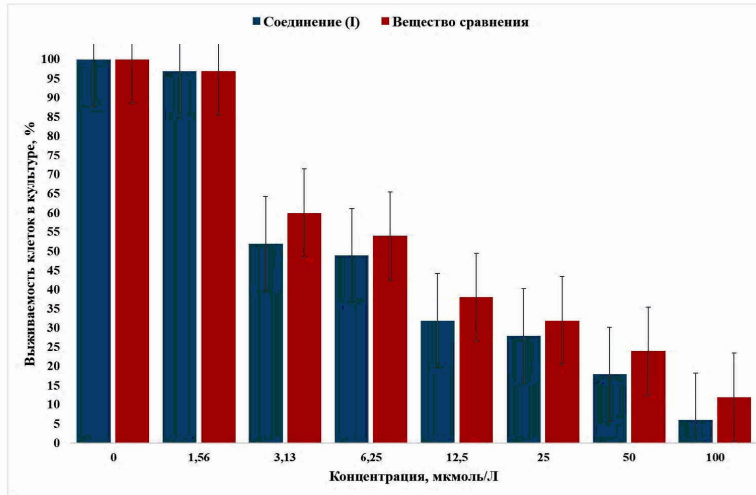


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг.3