



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 491/052 (2024.01); A61K 31/407 (2024.01); A61P 35/00 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023102962, 10.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.02.2023Дата регистрации:
25.04.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.02.2023

(45) Опубликовано: 25.04.2024 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УрФУ,
Центр интеллектуальной собственности,
Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Коротаев Владислав Юрьевич (RU),
Барков Алексей Юрьевич (RU),
Кочнев Иван Алексеевич (RU),
Улитко Мария Валерьевна (RU),
Зимницкий Николай Сергеевич (RU),
Сосновских Вячеслав Яковлевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

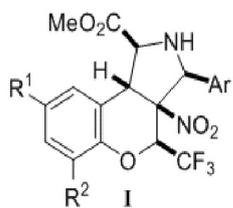
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2774705 C1, 21.06.2022. В. Ю.
Коротаев и др. "3-Нитро-2-(трифторметил)-
фенил-2Н-хромены в реакции с N-
метилазометин-илидом: стереоселективный
синтез 3a,4,4-тризамещенных хромено[3,4-
c]пирролидинов", Химия гетероциклических
соединений 2018, 54 (9), 852-858. Kochnev, I.A.
et al. "Green and Efficient Construction of
Chromeno[3,4-c]pyrrole Core (см. прод.)

(54) Метил-3-арил-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-c]пиррол-1-карбоксилаты, обладающие цитотоксической активностью в отношении к клеткам линии карциномы шейки матки человека HeLa, и способ их получения

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к новым метил-3-арил-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-c]пиррол-1-карбоксилатам общей формулы I, где: R¹ представляет собой H, алкокси C₁-C₆, Br, Cl; -R² представляет собой H, алкокси C₁-C₆, Br, Cl; -Ar представляет собой Ph, 4-MeOC₆H₄, 3,4-(MeO)₂C₆H₃, 2,3,4-(MeO)₃C₆H₂, бензо[d][1,3]диоксол-5-ил, которые проявляют цитотоксическую активность по отношению к клеткам линии карциномы шейки матки человека

HeLa, и способу их получения. Технический результат: предложен высокоэффективный регио- и стереоселективный способ получения метил-3-арил-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-c]пиррол-1-карбоксилатов, которые обладают цитотоксической активностью в отношении к клеткам линии карциномы шейки матки человека HeLa и являются потенциальными противоопухолевыми препаратами. 2 н.п. ф-лы, 1 ил., 2 табл., 10 пр.



(56) (продолжение):

via Barton-Zard Reaction from 3-Nitro-2H-chromenes and Ethyl Isocyanoacetate". *Molecules* 2022, 27, 8456.

R U 2 8 1 8 1 9 1 C 1

R U 2 8 1 8 1 9 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 491/052 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07D 491/052 (2024.01); A61K 31/407 (2024.01); A61P 35/00 (2024.01)(21)(22) Application: **2023102962, 10.02.2023**(24) Effective date for property rights:
10.02.2023Registration date:
25.04.2024

Priority:

(22) Date of filing: **10.02.2023**(45) Date of publication: **25.04.2024** Bull. № 12

Mail address:

**620002, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, UrFU, Tsentr
intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.**

(72) Inventor(s):

**Korotaev Vladislav Iurevich (RU),
Barkov Aleksei Iurevich (RU),
Kochnev Ivan Alekseevich (RU),
Ulitko Mariia Valerevna (RU),
Zimnitskii Nikolai Sergeevich (RU),
Sosnovskikh Viacheslav Iakovlevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Ural Federal
University named after the first President of
Russia B.N.Yeltsin (RU)**(54) **METHYL-3-ARYL-3A-NITRO-4-(TRIFLUOROMETHYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCHROMENO[3,4-C]PYRROLE-1-CARBOXYLATES, HAVING CYTOTOXIC ACTIVITY ON CELL LINE HUMAN CERVICAL CARCINOMA HELA, AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention relates to new methyl-3-aryl-3a-nitro-4-(trifluoromethyl)-1,2,3,3a,4,9b-hexahydrochromeno[3,4-c]pyrrole-1-carboxylateam of general formula I, where: R¹ is H, alkoxy C₁-C₆, Br, Cl; -R² is H, alkoxy C₁-C₆, Br, Cl; -Ar is Ph, 4-MeOC₆H₄, 3,4-(MeO)₂C₆H₃, 2,3,4-(MeO)₃C₆H₂, benzo[d][1,3]dioxol-5-yl, which exhibit cytotoxic activity with respect to human cervical carcinoma cells HeLa, and a method for production thereof.

EFFECT: disclosed is a highly efficient regio- and

stereoselective method of producing methyl-3-aryl-3a-nitro-4-(trifluoromethyl)-1,2,3,3a,4,9b-hexahydrochromeno[3,4-c]pyrrole-1-carboxylates, which have cytotoxic activity with respect to human cervical carcinoma cells HeLa and are potential anticancer drugs.

2 cl, 1 dwg, 2 tbl, 10 ex



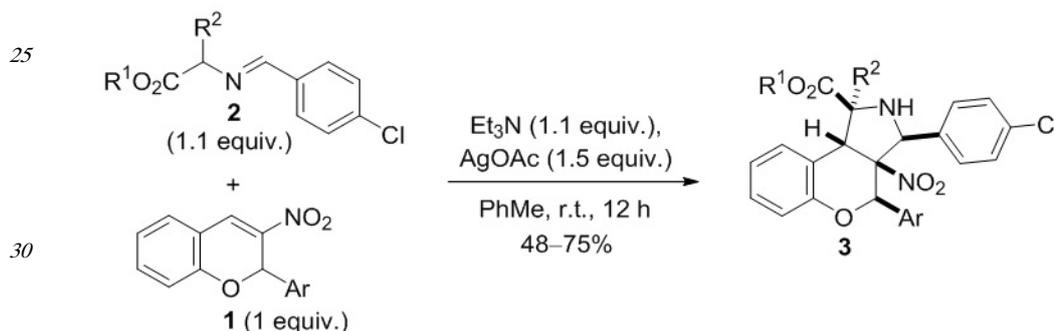
Область техники

Настоящее изобретение относится к области органического синтеза биологически активных соединений и касается ранее неизвестных метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилатов, обладающих цитотоксической активностью к клеткам линии карциномы шейки матки человека HeLa. Указанные соединения могут быть использованы в качестве противоопухолевых агентов, в частности, для лечения рака шейки матки человека.

Уровень техники

Сведения о способах получения, биологической активности и области применения 6-метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилатов общей формулы I в научно-технической и патентной литературе отсутствуют.

Ближайшими аналогами метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилатов общей формулы I являются 3,4-диарил-3а-нитро-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилаты (3), получаемые в виде индивидуальных эндо-стереоизомеров из соответствующих 2-арилзамещенных 3-нитро-2Н-хроменов (1) и азометинов (2) при комнатной температуре в толуоле в течение 12 ч в присутствии триэтиламина и ацетата серебра с выходами 48-75% [A. Virányi, G. Marth, A. Dancsó, G. Blaskó, L. Tóke, M. Nyerges. 3-Nitrochromene derivatives as 2pcomponents in 1,3-dipolar cycloadditions of azomethine ylides. // *Tetrahedron*, 2006, DOI: 10.1016/j.tet.2006.06.101]. Недостатками данного метода синтеза являются использование полутонного избытка ацетата серебра для повышения стереоселективности процесса циклоприсоединения и продолжительное время реакции.



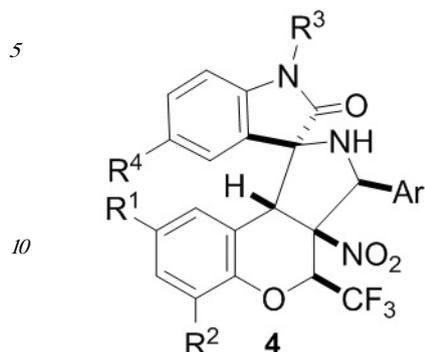
Ar = Ph, 2-ClC₆H₄, 4-ClC₆H₄, 4-MeOC₆H₄, 3-NO₂C₆H₄, 3,4-(MeO)₂C₆H₃;

R¹ = Me, Et; R² = H, Bn

Биологическая активность гексагидрохромено[3,4-с]пирролидинов (3) не изучалась. Введение электроноакцепторной CF₃-группы в положение 2 3-нитро-2Н-хромена не только активирует двойную связь, но и повышает стереоселективность их реакций с нуклеофилами и амбифилами. Кроме того, замена метильной группы на трифторметильную в биологически активной молекуле может привести к повышению фармакологических свойств за счет увеличения липофильности и метаболической стабильности [S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur. Fluorine in medicinal chemistry. // *Chem. Soc. Rev.*, 2008, DOI: 10.1039/B610213C. N. A. Meanwell. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. // *J. Med. Chem.*, 2011, DOI: 10.1021/jm1013693].

Ранее было показано, что 3-арил-4-(трифторметил)-4Н-спиро[хромено[3,4-с]пирролидин-1,3'-оксиндолы] (4) [В.Ю. Коротаев, А.Ю. Барков, И.Б. Кутяшев, М.В. Улитко, Н.С. Зимницкий, В.Я. Сосновских. 3-Арил-4-(трифторметил)-4Н-спиро[хромено[3,4-с]пирролидин-1,3'-оксиндолы], обладающие высокой цитотоксической активностью

в отношении к клеткам линии карциномы шейки матки человека HeLa, и способ их получения. // Патент RU 2774705 C1, 2022] обладают выраженной цитотоксической активностью к клеткам рака шейки матки человека HeLa.



где: R¹ представляет собой H, алкил C₁-C₆, алкокси C₁-C₆, Br, Cl, NO₂;

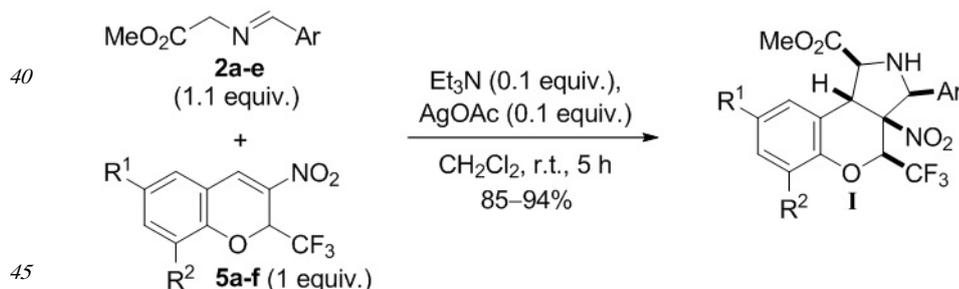
15 -R² представляет собой H, алкил C₁-C₆, алкокси C₁-C₆, Br, Cl, NO₂;

-R³ представляет собой H, алкил C₁-C₆, Bn;

-R⁴ представляет собой H, алкил C₁-C₆, алкокси C₁-C₆, Br, Cl;

20 -Ar представляет собой Ph, 2-ClC₆H₄, 4-ClC₆H₄, 2-BrC₆H₄, 4-FC₆H₄, 4-MeC₆H₄, 3-F₃CC₆H₄, 4-MeOC₆H₄,

Задача изобретения: исходя из 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хроменов (5) и азометинов (2) синтезировать новую группу соединений, обладающих
25 противоопухолевой активностью, в мягких условиях, используя каталитические количества соли серебра. Поставленная задача решается тем, что для получения новых метил-3-арил-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилатов общей формулы I смесь соответствующего нитрохромена (5) (1 эквивалент), азометина (2) (1.1 эквивалент), триэтиламина (0.1 эквивалент) и AgOAc (0.1 эквивалент) перемешивают при комнатной температуре в сухом дихлорметане в течение 5 ч. Затем растворитель упаривают, а остаток очищают колоночной
30 хроматографией на силикагеле (элюент - EtOAc-гексан (1:3)). Исходные 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромены (5a-f) получают согласно методике, описанной в литературе [V. Y. Korotaev, I. B. Kutuyashev, V. Y. Sosnovskikh. Synthesis of 3-substituted 2-trifluoro(trichloro) methyl-2H-chromenes by reaction of salicylaldehydes with activated trihalomethyl alkenes. // Heteroatom Chemistry, 2005, DOI: 10.1002/hc.20146]. Выходы соединений общей формулы I представлены в таблице 1.



Анализ целевых соединений проводят с использованием ЯМР-спектроскопии [Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на спектрометрах Bruker DRX-400 и Bruker Avance

500 (рабочие частоты 400 и 500 МГц соответственно) в CDCl_3 , внутренний стандарт ТМС. Спектры ЯМР ^{13}C (126 МГц) зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance 500 в CDCl_3 , внутренний стандарт - сигнал растворителя (77.0 м. д.). Спектры ЯМР ^{19}F зарегистрированы на спектрометрах Bruker DRX-400 и Bruker Avance 500 (рабочие частоты 376 и 471 МГц соответственно) в CDCl_3 , внутренний стандарт C_6F_6] и масс-спектрометрии высокого разрешения [Масс-спектры высокого разрешения записаны на спектрометре Bruker maXis Impact HD]. Рентгеноструктурное исследование выполнено на дифрактометре Xcalibur 3 (Mo-K α излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование, длина волны = 0.7107 нм).

На фиг. 1 представлена молекулярная структура метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3а-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 30% вероятностью.

Пример 1.

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3а-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Смесь 123 мг (0.5 ммоль) 3-нитро-2-(трифторметил)-2Н-хромена (5а), 97 мг (0.55 ммоль) азометина (2а), 5 мг (0.05 ммоль) триэтиламина и 8.3 мг (0.05 ммоль) AgOAc перемешивают при комнатной температуре в 2 мл сухого дихлорметана в течение 5 ч. Затем растворитель упаривают при пониженном давлении, а остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент - EtOAc -гексан (1:3)). Получают метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3а-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилат в виде бежевого порошка. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 125-127°C.

Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.13 (д.д, J = 11.3, 7.5 Гц, 1H), 4.02 (с, 3H), 4.09 (д.д, J = 7.5, 3.1 Гц, 1H), 4.57 (д, J = 3.1 Гц, 1H), 4.83 (д, J = 11.3 Гц, 1H), 5.11 (к, J = 7.0 Гц, 1H), 7.07 (д.д, J = 8.2, 1.0 Гц, 1H), 7.18 (д.д.д, J = 8.2, 7.6, 1.0 Гц, 1H), 7.23-7.32 (м, 3H), 7.43-7.47 (м, 3H), 7.52 (д, J = 7.7 Гц, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.6, 53.1, 68.4, 70.2, 72.3 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.8$ Гц), 93.6, 117.6, 123.3 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.9$ Гц), 124.0, 124.4, 126.5 (2C), 129.09, 129.14, 129.2 (2C), 130.0, 132.6, 149.0, 171.9.

Спектр ЯМР ^{19}F (471 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.6 (д, J = 7.0 Гц).

Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z: 423.1160 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, m/z: 423.1162.

Пример 2

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3-(4-метоксифенил)-3а-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-2Н-хромена (5а) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 163-165°C, белый порошок.

Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.07 (д.д, J = 11.2, 7.6 Гц, 1H), 3.83 (с, 3H), 4.02 (с, 3H), 4.07 (д.д, J = 7.6, 3.0 Гц, 1H), 4.54 (д, J = 3.0 Гц, 1H), 4.79 (д, J = 11.2 Гц, 1H),

5.07 (к, J = 7.0 Гц, 1H), 6.95 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.06 (д.д, J = 8.1, 1.0 Гц, 1H), 7.15 (т.д, J = 7.6, 1.0 Гц, 1H), 7.22 (д, J = 8.7 Hz, 2H), 7.28 (т.д, J = 8.1, 1.0 Гц, 1H), 7.51 (д.д, J = 7.6, 1.0 Гц, 1H).

5 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.5, 53.1, 55.3, 68.4, 70.0, 72.4 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.4$ Гц), 93.5, 114.6 (2С), 117.5, 123.4 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.7$ Гц), 124.0, 124.4 (2С), 127.7 (2С), 129.1 (2С), 149.0, 160.9, 172.0.

Спектр ЯМР ^{19}F (471 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.7 (д, J = 7.0 Гц).

10 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z: 453.1272 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$.
Вычислено, m/z: 453.1268.

Пример 3

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3-(3,4-диметоксифенил)-3a-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

15 Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5a) и азометина (2c) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 150-152°C, белый порошок.

20 Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.07 (д.д, J = 10.8, 7.5 Гц, 1H), 3.83 (с, 6H), 4.03 (с, 3H), 4.07 (д.д, J = 7.5, 3.0 Гц, 1H), 4.55 (д, J = 3.0 Гц, 1H), 4.78 (д, J = 10.8 Гц, 1H), 5.10 (к, J = 7.0 Гц, 1H), 6.76 (д, J = 1.8 Гц, 1H), 6.87 (д.д, J = 8.3, 1.8 Гц, 1H), 6.91 (д, J = 8.3 Гц, 1H), 7.06 (д.д, J = 8.2, 1.0 Гц, 1H), 7.17 (т.д, J = 7.6, 1.0 Гц, 1H), 7.28 (т.д, J = 8.2, 1.0 Гц, 1H), 7.51 (д.д, J = 7.6, 1.0 Гц, 1H).

25 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.4, 53.1, 55.9, 56.1, 68.3, 70.3, 72.4 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.5$ Гц), 93.4, 109.3, 111.5, 117.6, 119.3, 123.4 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.9$ Гц), 124.0, 124.4, 124.9, 129.08, 129.11, 149.0, 149.6, 150.4, 172.0.

Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.9 (д, J = 7.0 Гц).

30 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z: 483.1374 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$.
Вычислено, m/z: 483.1374.

Пример 4

35 Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3a-нитро-3-(3,4,5-триметоксифенил)-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5a) и азометина (2d) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 115-117°C, белый порошок.

40 Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.01 (д.д, J = 10.4, 7.2 Гц, 1H), 3.88 (с, 3H), 3.89 (с, 6H), 4.03 (с, 3H), 4.07 (д.д, J = 7.2, 3.1 Гц, 1H), 4.56 (д, J = 3.1 Гц, 1H), 4.75 (д, J = 10.4 Гц, 1H), 5.13 (к, J = 7.0 Гц, 1H), 6.50 (с, 2H), 7.07 (д.д, J = 8.2, 1.2 Гц, 1H), 7.18 (т.д, J = 7.7, 1.2 Гц, 1H), 7.29 (т.д, J = 8.2, 1.0 Гц, 1H), 7.51 (д.д, J = 7.7, 1.0 Гц, 1H).

45 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.3, 53.1, 56.4 (2С), 60.9, 68.3, 70.5, 72.5 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.6$ Гц), 93.3, 103.8 (2С), 117.6, 123.3 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.8$ Гц), 124.0, 124.5, 128.2, 129.1, 129.2, 149.0, 153.8 (3С), 172.0.

Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.9 (д, $J = 7.0$ Гц).

Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 513.1472 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8$.
Вычислено, m/z : 513.1479.

5 Пример 5

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

10 Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5а) и азометина (2е) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 168-170°C, белый порошок.

15 Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 2.97 (д,д, $J = 10.7, 7.6$ Гц, 1H), 4.01 (с, 3H), 4.05 (д,д, $J = 7.6, 3.0$ Гц, 1H), 4.55 (д, $J = 3.0$ Гц, 1H), 4.75 (д, $J = 10.7$ Гц, 1H), 5.11 (к, $J = 7.0$ Гц, 1H), 6.01 (д, $J = 1.4$ Гц, 1H), 6.02 (д, $J = 1.4$ Гц, 1H), 6.76-6.82 (м, 2H), 6.85 (д, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.05 (д,д, $J = 8.2, 1.1$ Гц, 1H), 7.17 (т,д, $J = 7.7, 1.1$ Гц, 1H), 7.27 (т,д, $J = 8.2, 1.1$ Гц, 1H), 7.50 (д, $J = 7.7, 1.1$ Гц, 1H).

20 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.3, 53.1, 68.2, 70.0, 72.3 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.4$ Гц), 93.3, 101.6, 106.6, 108.8, 117.6, 120.5, 123.4 (к, $^1J_{\text{CF}} = 289.0$ Гц), 124.0, 124.4, 126.3, 129.09, 129.13, 148.5, 148.99, 149.02, 171.9.

Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.7 (д, $J = 7.0$ Гц).

25 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 467.1064 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$
Вычислено, m/z : 467.1061.

Пример 6

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3-(4-метоксифенил)-3а-нитро-4-(трифторметил)-8-хлор-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

30 Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-6-хлор-2H-хромена (5b) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в табл. 1.

Т. пл. 191-193°C, белый порошок.

35 Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.06 (д,д $J = 11.0, 7.7$ Гц, 1H), 3.83 (с, 3H), 4.01-4.05 (м, 4H), 4.50 (д, $J = 3.3$ Гц, 1H), 4.74 (д, $J = 11.0$ Гц, 1H), 5.07 (к, $J = 6.9$ Гц, 1H), 6.95 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.01 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H), 7.20 (д $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.24 (д,д, $J = 8.7, 2.3$ Гц, 1H), 7.49 (д, $J = 2.3$ Гц, 1H).

40 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.3, 53.3, 55.3, 68.1, 70.1, 72.5 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.7$ Гц), 93.1, 114.7 (2С), 119.1, 123.2 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.9$ Гц), 124.1, 125.8, 127.7 (2С), 128.7, 129.4, 129.5, 147.7, 161.0, 171.6.

Спектр ЯМР ^{19}F (471 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.8 (д, $J = 6.9$ Гц).

45 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 487.0879 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_6$.
Вычислено, m/z : 487.0878.

Пример 7

Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-8-бром-3-(4-метоксифенил)-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 6-бром-2-(трифторметил)-2H-хромена (5c) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 191-192°C, белый порошок.

5 Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.06 (уш. с, 1H), 3.83 (s, 3H), 4.01-4.05 (м, 4H), 4.50 (д, $J = 3.3$ Гц, 1H), 4.73 (с, 1H), 5.07 (к, $J = 6.9$ Гц, 1H), 6.94 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.97 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H), 7.20 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.38 (д.д, $J = 8.8, 2.2$ Гц, 1H), 7.63 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H).

10 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.2, 53.3, 55.3, 68.1, 70.1, 72.4 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.7$ Гц), 93.0, 114.6 (2C), 116.8, 119.4, 123.2 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.9$ Гц), 124.0, 126.2, 127.7 (2C), 131.7, 132.3, 148.2, 160.9, 171.6.

Спектр ЯМР ^{19}F (471 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 96.8 (д, $J = 6.9$ Гц).

15 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 531.0374 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{O}_6$.
Вычислено, m/z : 531.0373.

Пример 8

20 Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-6,8-дибром-3-(4-метоксифенил)-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 6,8-дибром-3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5d) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 189-191°C, белый порошок.

25 Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.07 (д.д, $J = 10.8, 7.7$ Гц, 1H), 3.80 (с, 3H), 4.00 (д.д, $J = 7.7, 3.2$ Гц, 1H), 4.03 (с, 3H), 4.53 (д, $J = 3.2$ Гц, 1H), 4.72 (д, $J = 10.8$ Гц, 1H), 5.18 (к, $J = 6.8$ Гц, 1H), 6.96 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.22 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.61 (д, $J = 1.9$ Гц, 1H), 7.67 (д, $J = 1.9$ Гц, 1H).

30 Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.5, 53.5, 55.3, 68.1, 70.3, 73.1 (к, $^2J_{\text{CF}} = 32.2$ Гц), 93.2, 112.9, 114.8 (2C), 116.9, 122.9 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.5$ Гц), 123.8, 127.5, 127.7 (2C), 130.9, 135.3, 145.5, 161.1, 171.3.

Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 97.0 (д, $J = 6.8$ Гц).

35 Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 608.9475 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$.
Вычислено, m/z : 608.9478.

Пример 9

40 Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-8-метокси-3-(4-метоксифенил)-3a-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3a,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 6-метокси-3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5e) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

Т. пл. 125-127°C, белый порошок.

45 Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 3.07 (д.д, $J = 11.3, 7.8$ Гц, 1H), 3.82 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 4.02 (с, 3H), 4.07 (д.д, $J = 7.8, 3.2$ Гц, 1H), 4.49 (д, $J = 3.2$ Гц, 1H), 4.78 (д, $J = 11.3$ Гц, 1H), 5.03 (к, $J = 7.0$ Гц, 1H), 6.83 (д.д, $J = 9.0, 2.8$ Гц, 1H), 6.95 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.98 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H), 7.01 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H), 7.21 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H).

Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 45.9, 53.1, 55.3, 55.7, 68.3, 70.1, 72.6 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.4$ Гц), 93.8, 113.1, 114.6 (2С), 115.2, 118.4, 123.4 (к, $^1J_{\text{CF}} = 289.2$ Гц), 124.4, 124.8, 127.7 (2С), 142.8, 156.2, 160.9, 171.9.

5 Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 97.0 (д, $J = 7.0$ Гц).

Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 483.1374 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$.
Вычислено, m/z : 483.1374.

Пример 10

10 Получение метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3-(4-метоксифенил)-3а-нитро-4-(трифторметил)-6-этокси-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата.

Данное соединение получают из 3-нитро-2-(трифторметил)-8-этокси-2Н-хромена (5f) и азометина (2b) по способу, аналогичному способу примера 1. Выход приведен в таблице 1.

15 Т. пл. 123-125°C, белый порошок.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 1.48 (т, $J = 7.0$ Гц, 3H), 3.06 (д,д, $J = 10.9$, 7.6 Гц, 1H), 3.83 (с, 3H), 4.01 (с, 3H), 4.05 (д,д, $J = 7.6$, 3.2 Гц, 1H), 4.17 (д, $J = 7.0$ Гц, 2H), 4.52 (д, $J = 3.2$ Гц, 1H), 4.81 (д $J = 10.9$ Гц, 1H), 5.19 (к, $J = 7.0$ Гц, 1H), 6.82-6.89 (м, 1H),
20 6.94 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.06-7.10 (м, 2H), 7.25 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H).

Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 14.7, 45.7, 53.1, 55.3, 64.7, 68.4, 70.2, 72.7 (к, $^2J_{\text{CF}} = 31.5$ Гц), 94.0, 112.3, 114.6 (2С), 120.1, 123.3 (к, $^1J_{\text{CF}} = 288.8$ Гц), 124.3, 124.4, 125.3, 127.8 (2С), 139.1, 148.1, 160.9, 172.0.

25 Спектр ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 97.1 (д, $J = 7.0$ Гц).

Масс-спектр высокого разрешения: Найдено, m/z : 519.1347 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_7$.
Вычислено, m/z : 519.1350.

30 Относительная конфигурация метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилатов общей формулы I однозначно подтверждена методом рентгеноструктурного анализа, выполненного для метил-(1S*,3S*,3aS*,4S*,9bR*)-3а-нитро-4-(трифторметил)-3-фенил-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата (пример 1). Структура соединения расшифрована прямым методом с использованием комплекса программ SHELX-97
35 [G.M. Sheldrick. A short history of SHELX. // Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances, 2008, DOI: 10.1107/S0108767307043930]. Все неводородные атомы уточнены в анизотропном приближении независимо, атомы водорода помещены в геометрически рассчитанные позиции и включены в уточнение в модели «наездника» с зависимыми тепловыми параметрами. Полный набор рентгеноструктурных данных депонирован
40 в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 2213944).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Список условных сокращений:

МТТ-тест - метод оценки цитотоксической активности, основанный на восстановлении желтой соли тетразолия (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами живых клеток
45 до кристаллов формазана, растворимых в ДМСО

IC_{50} (индекс цитотоксичности) - концентрация вещества, при которой наблюдается гибель 50% клеток, мкмоль/л

OP_0 - оптическая плотность раствора формазана опытной группы

ОП_к - оптическая плотность раствора формазана контрольной группы

Клеточные линии:

Клеточная линия HeLa - клетки карциномы шейки матки человека

Клеточная линия HDF- клетки дермальных фибробластов человека

5 Изучение цитотоксической активности *in vitro* заявляемых соединений общей формулы I.

проведено на линиях клеток рака шейки матки человека HeLa, полученных из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) и дермальных фибробластов человека (HDF), выделенных в Институте медицинских клеточных технологий (Екатеринбург, Россия).

Клетки засевают в 96-луночные планшеты в посевной дозе 2×10^5 клеток/мл и культивируют при 37°C в течение 24 ч в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с 1% глутамина в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (50 мг/л) в увлажненной атмосфере 5% CO₂, после чего в лунки добавляют исследуемые соединения формулы I в различных концентрациях. Клетки инкубируют с соединениями формулы I в течение 72 ч, после чего проводят оценку жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста. Опыты проведены в трех повторностях с отрицательным (культуральная среда), положительным (раствор цитотоксического препарата Камптотедин в концентрации 3 ммоль/л) контролями и контролем растворителя (ДМСО).

Оценку результатов МТТ-теста проводят на планшетном фотометре Tecan Infinite M200 PRO путем сравнения оптической плотности раствора формазана при длине волны 570 нм в опытных и контрольных лунках и рассчитывают индекс цитотоксичности (IC) по формуле:

$$IC = \left(1 - \frac{OP_o}{OP_k}\right) \times 100\%.$$

На основании полученных данных определялся индекс цитотоксичности для каждой концентрации исследуемых веществ. С помощью пробит-регрессии производился расчет показателя IC₅₀.

Для проведения статистического анализа использовались программы Microsoft Excell и Statistika 2009. Рассчитывались параметры среднего арифметического значения и стандартной ошибки. За достоверные принимали различия средних величин по критерию Манна-Уитни при $p < 0.05$.

Соединением сравнения является цитотоксический агент Камптотедин (Sigma-Aldrich, USA). Камптотедин и его производные (например, Топотекан) применяют в медицинской практике для лечения рака толстой кишки и яичников, рецидивирующего или персистирующего рака шейки матки, мелкоклеточного рака легкого и часто используют для систематического скрининга противоопухолевых препаратов.

Для изучения цитотоксической активности было проведено определение IC₅₀ для ряда репрезентативных образцов соединений общей формулы I (примеры 2, 5, 6, 9, 10) по отношению к клеточным линиям HeLa и HDF. Результаты испытаний представлены в таблице 2.

Таким образом, нами впервые получены метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9b-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилаты, которые проявили цитотоксическую активность в отношении к клеткам рака шейки матки человека HeLa, и предложен эффективный способ их получения.

Преимуществами данного способа синтеза являются:

1. Доступность исходных реагентов.

2. Высокая диастереоселективность реакции, которая достигается при использовании каталитических количеств ацетата серебра (10 мол% относительно исходного 3-нитро-2-(трифторметил)-2H-хромена (5)).

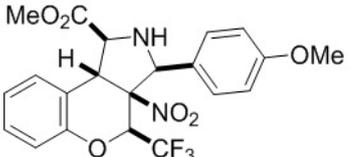
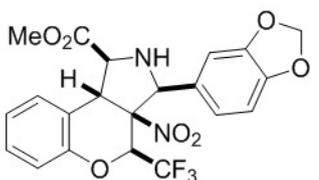
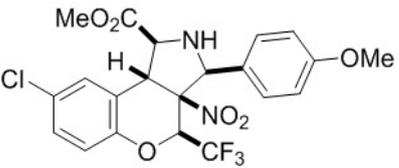
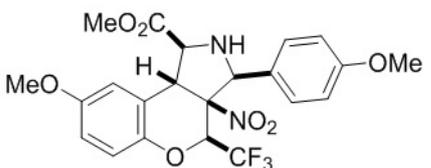
3. Использование дихлорметана в качестве растворителя, что позволяет провести реакцию в течение 5 ч.

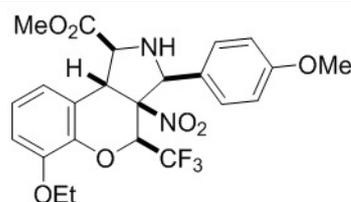
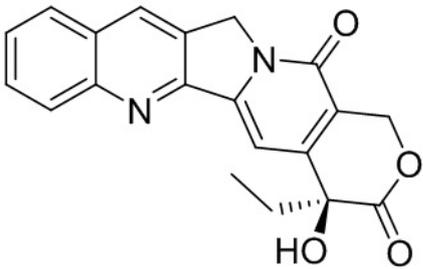
Протестированные соединения общей формулы I (примеры 2, 5, 6, 9, 10) проявили цитотоксическую активность в отношении к клеточной линии HeLa. Соединения формулы I (примеры 2, 9) наряду с высокой цитотоксической активностью по отношению к клеткам HeLa проявили низкую цитотоксическую активность относительно клеток дермальных фибробластов человека и являются потенциальными противоопухолевыми препаратами.

Таблица 1. Синтез соединений общей формулы I (примеры 1-10).

№	Хромен 1	Азаметин 2	R ¹	R ²	Ar	Выход (%)
1	5a	2a	H	H	Ph	90
2	5a	2b	H	H	4-MeOC ₆ H ₄	92
3	5a	2c	H	H	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	92
4	5a	2d	H	H	2,3,4-(MeO) ₃ C ₆ H ₂	85
5	5a	2e	H	H	бензо[d][1,3]диоксол-5-ил	87
6	5b	2b	Cl	H	4-MeOC ₆ H ₄	90
7	5c	2b	Br	H	4-MeOC ₆ H ₄	94
8	5d	2b	Br	Br	4-MeOC ₆ H ₄	93
9	5e	2b	MeO	H	4-MeOC ₆ H ₄	89
10	5f	2b	H	EtO	4-MeOC ₆ H ₄	87

Таблица 2. Значения концентраций соединений общей формулы I, при которых наблюдается гибель 50% клеток (IC₅₀, мкмоль/л) в сравнении с Камптотецином в отношении клеток карциномы шейки матки человека HeLa и здоровых дермальных фибробластов человека (HDF)

Соединение	IC ₅₀ (HeLa)	IC ₅₀ (HDF)
	0.55 ± 0.01	.*
	108 ± 15.8	185 ± 14.2
	50.22 ± 3.40	1750.00 ± 120.0
	12.17 ± 1.37	213.00 ± 51.25

5		4.19 ± 0.05	0.74 ± 0.05
10	 <p style="text-align: center;">Камптотецин</p>	1.66 ± 0.97	323.27 ± 28.92
15	*Соединение не токсично в диапазоне концентраций 10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴ М.		

(57) Формула изобретения

1. Метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9б-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилат I

20



25

где R¹ представляет собой H, алкокси C₁-C₆, Br, Cl;

R² представляет собой H, алкокси C₁-C₆, Br, Cl;

Ar представляет собой Ph, 4-MeOC₆H₄, 3,4-(MeO)₂C₆H₃, 2,3,4-(MeO)₃C₆H₂, бензо[d]

30

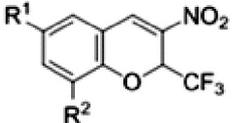
[1,3]диоксол-5-ил,

обладающий цитотоксической активностью по отношению к клеткам линии карциномы шейки матки человека HeLa.

2. Способ получения метил-3-арил-3а-нитро-4-(трифторметил)-1,2,3,3а,4,9б-гексагидрохромено[3,4-с]пиррол-1-карбоксилата общей формулы I по п. 1,

35

закрывающийся в том, что смесь соответствующего 3-нитро-2-(трифторметил)-2Н-

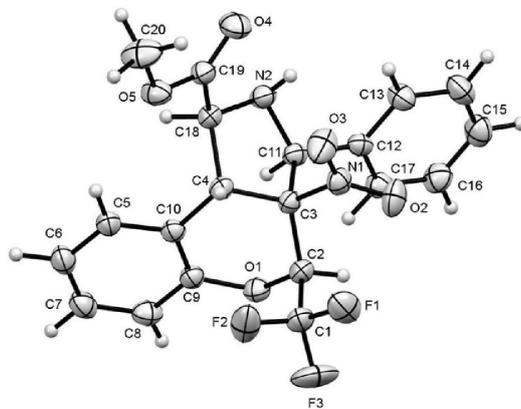
хромена (5) формулы  1 эквивалент, азометина (2) формулы

40

 1.1 эквивалент, Et₃N 0.1 эквивалент и AgOAc 0.1 эквивалент

перемешивают в сухом дихлорметане в течение 5 ч при комнатной температуре, по завершении реакции растворитель упаривают, остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюент: EtOAc-гексан (1:3).

45



Фиг. 1