



(51) МПК  
*C07C 231/02* (2006.01)  
*C07C 233/56* (2006.01)  
*C07D 211/58* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C07C 231/02* (2006.01); *C07C 233/56* (2006.01); *C07D 211/58* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016128407, 13.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 13.07.2016

Дата регистрации:  
 06.06.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.07.2016

(43) Дата публикации заявки: 19.01.2018 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 06.06.2018 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-кт  
 Академика Семенова, д. 1, Федеральное  
 государственное бюджетное учреждение науки  
 Институт проблем химической физики  
 Российской академии наук (ИПХФ РАН),  
 директору ИПХФ РАН, академику С.М.  
 Алдошину

(72) Автор(ы):

Федоров Борис Сергеевич (RU),  
 Гончарова Светлана Александровна (RU),  
 Раевская Татьяна Анатольевна (RU),  
 Еремеев Анатолий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение науки Институт проблем  
 химической физики Российской академии  
 наук (ИПХФ РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: SU 582250, 30.11.1977. R.L. EHMAN  
 ET AL., Diradical Nitroxyl Spin Label Contrast  
 Agents for Magnetic Resonance Imaging. A  
 Comparison of Relaxation Effectiveness.  
 INVESTIGATIVE RADIOLOGY, 1986, 21(2),  
 pp.125-131. E. ARMELIN ET AL., Dimethyl  
 N,N'-oxalamidodiethanoate, ACTA  
 CRYSTALLOGRAPHICA, SECT. C:  
 CRYSTAL STRUCTURE COMMUN., 2001,  
 C57(8), (см. прод.)

(54) Производные щавелевой кислоты, их использование в качестве хемосенсибилизаторов в комбинированной противоопухолевой терапии с цитостатиками при лечении лейкозов и лекарственно-устойчивых лейкозов, способ получения производных щавелевой кислоты

(57) Реферат:

Изобретение относится к производным щавелевой кислоты общей формулы  $RC(O)-C(O)R$ , где  $R=CH_3CH(-NH)C(O)ONa$  и  $Ph-CH_2CH(-NH)C(O)ONa$ , которые могут найти применение при лечении лекарственно-резистентных опухолей. Изобретение относится также к указанным

производным щавелевой кислоты в качестве хемосенсибилизаторов в комбинированной терапии опухолей с фенотипом лекарственной устойчивости и средств повышения эффективности при проведении комбинированной терапии лейкоза P388, а также к способу их получения. 4 н.п. ф-лы, 2 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

pp.932-933. M. MULLIEZ, Novel method for intramolecular peptide synthesis for preparation of sarcosine using oxalic acid derivatives, TETRAHEDRON, 1984, 40(24), 5143-5151. D. RANGANATHAN ET AL., Oxalopeptides as core motifs for protein design, J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN., 1993, 1, pp.92-94. RU 2295517 C2, 20.03.2007.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07C 231/02* (2006.01)  
*C07C 233/56* (2006.01)  
*C07D 211/58* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07C 231/02 (2006.01); C07C 233/56 (2006.01); C07D 211/58 (2006.01)*(21)(22) Application: **2016128407, 13.07.2016**(24) Effective date for property rights:  
**13.07.2016**Registration date:  
**06.06.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **13.07.2016**(43) Application published: **19.01.2018** Bull. № 2(45) Date of publication: **06.06.2018** Bull. № 16

Mail address:

**142432, Moskovskaya obl., g. Chernogolovka, pr-kt  
Akademika Semenova, d. 1, Federalnoe  
gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki  
Institut problem khimicheskoy fiziki Rossijskoj  
akademii nauk (IPKHF RAN), direktoru IPKHF  
RAN, akademiku S.M. Aldoshinu**

(72) Inventor(s):

**Fedorov Boris Sergeevich (RU),  
Goncharova Svetlana Aleksandrovna (RU),  
Raevskaya Tatyana Anatolevna (RU),  
Eremeev Anatolij Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie nauki Institut problem  
khimicheskoy fiziki Rossijskoj akademii nauk  
(IPKHF RAN) (RU)**

**(54) DERIVATIVES OF OXALIC ACID, THEIR USE AS CHEMOSENSITIZERS IN COMBINED ANTI-TUMOR THERAPY WITH CYTOSTASTICS IN THE TREATMENT OF LEUKEMIA AND DRUG-RESISTANT LEUKEMIA, A METHOD FOR PRODUCTION DERIVATIVES OF OXALIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to oxalic acid derivatives of general formula  $RC(O)-C(O)R$ , where  $R=CH_3CH(-NH)C(O)ONa$  and  $Ph-CH_2CH(-NH)C(O)ONa$ , which can be used in the treatment of drug-resistant tumors.

EFFECT: invention also relates to indicated oxalic acid derivatives as chemosensitizers in combination therapy of tumors with a drug resistance phenotype and means of increasing the effectiveness in the combined therapy of leukemia P388, as well as the way they are obtained.

4 cl, 2 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области физиологически активных веществ и касается производных щавелевой кислоты, которые в комбинации с цитостатиками позволяют лечить резистентные опухоли, полученные в процессе проведения химиотерапии злокачественных новообразований. В настоящее время эта проблема является социально значимой проблемой. В этой связи синтез новых веществ, которые позволили бы лечить лекарственно-резистентные опухоли, является очень актуальным.

Задачей настоящего изобретения является расширение ассортимента средств воздействия на живой организм, конкретно синтез производных щавелевой кислоты формулы I  $RC(O)-C(O)R$ , где  $R = CH_3CH(-NH)C(O)ONa$  (1);  $Ph-CH_2CH(-NH)C(O)ONa$  (2), которые в сочетании с известными цитостатиками позволяют лечить лекарственно-резистентные опухоли. Если учесть, что в медицинской практике в настоящее время отсутствуют эффективные лекарственные средства для лечения лекарственно-резистентных опухолей, то синтез предлагаемых нами соединений является весьма актуальной задачей. Другой задачей изобретения является разработка способа получения предлагаемых соединений. Включение соединений, представленных выше, в комбинированную терапию злокачественных опухолей в сочетании с этопозидом позволяет повысить химиотерапевтическую чувствительность опухолей.

Поставленная задача достигается тем, что оксалилдихлорид обрабатывают метиловым эфиром аминокислоты с последующим отделением метилового эфира оксалилдиаминокислоты и обработкой водным раствором гидроксида натрия в среде метанола с получением соединений общей формулы I. Целевой продукт при этом выделяют путем фильтрования. Использование натриевых солей соединений 1 и 2 необходимо для того, чтобы вещество было хорошо растворимо в воде, что необходимо для введения производных щавелевой кислоты в виде водных растворов.

Существо изобретения характеризуется следующими примерами.

Метиловый эфир оксалилдиаланина (1)

К суспензии 8.35 г гидрохлорида метилового эфира DL-аланина в 150 мл хлороформа прибавляли 16.72 г триэтиламина. Затем реакционную смесь охлаждали до  $0^{\circ}C$  и по каплям прибавляли 2.6 мл оксалилдихлорида. Температуру реакционной смеси поднимали до комнатной и перемешивали еще 1.5 часа. Реакционную массу переносили в делительную воронку и добавляли 75 мл 2%-ного раствора  $NaHCO_3$ , хлороформенный слой отделяли, а водный экстрагировали хлороформом  $4 \times 50$  мл. Хлороформенные экстракты объединяли, просушивали над  $MgSO_4$ . Отгоняли при пониженном давлении хлороформ. Получено 4.54 г бесцветного кристаллического вещества (58%). Т.пл.  $125-126^{\circ}C$ . Найдено (%): C 45.95; H 6.07; N 11.09.  $C_{10}H_{16}N_2O_6$ . Вычислено (%): C 46.15; H 6.15; N 10.76. Спектр ЯМР<sup>1</sup>H (ДМСО-d<sub>6</sub>, м.д, J, Гц): 9.02 (д, 2H, NH,  $J_3^{H-H}=6.2$ ), 4.38 (м, 2H, CH), 3.64 (с, 6H, OCH<sub>3</sub>), 1.35 (д, 6H, CH<sub>3</sub>,  $J_3^{H-H}=7.3$ ).

Динатриевая соль оксалилдиаланина (1a)

К 50 мл нагретого до  $60^{\circ}C$  этанола при интенсивном перемешивании прибавляли 2 г (0,0077 моль) метилового эфира оксалилдиаланина. К полученному раствору прибавляли раствор 0.8 г гидроксида натрия в 25 мл этанола. После смешивания реагентов реакционную массу перемешивали в течение 1 часа при  $60^{\circ}C$  и охлаждали до комнатной температуры. Выпавший бесцветный осадок динатриевой соли оксалилдиаланина отфильтровывали и промывали 15 мл диэтилового эфира. Получено 2.05 г (0,0074 моль) бесцветных кристаллов (96%). Т.пл  $> 250^{\circ}C$ . Найдено (%): C 34.46, H 3.91, N 9.84, Na 16.49.  $C_8H_{10}N_2O_6Na_2$ . Вычислено (%): C 34.78, H 3.62, N 10.14, Na 16.67.

## Метилловый эфир оксалилдифенилаланина (2)

К раствору 5,215 г гидрохлорида L-фенилаланина в 50 мл хлороформа при охлаждении до 0°C и перемешивании прибавляли 6,7 мл триэтиламина и по каплям 2,2 мл оксалилдихлорида. После смешения реагентов реакцию массу перемешивали при 55°C в течение 2 часов. Охладив до нормальных условий, перенесли реакцию массу в делительную воронку. После промывки 2% раствором NaHCO<sub>3</sub> 2×30 мл хлороформенный раствор высушивали над сульфатом магния MgSO<sub>4</sub> и отгоняли CHCl<sub>3</sub> при пониженном давлении, в остатке получили 3,6 г (0,0088 моль) бесцветного кристаллического вещества - метилового эфира оксалилдифенилаланина (72%), т.пл. 157°C. Найдено (%): С 64.52, Н 5.31; N 6.60. С<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>. Вычислено (%): С 64.07; Н 5.83; N 6.80. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (ДМСО-d<sub>6</sub>, м.д, J, Гц): 8.93 (д, 2H, NH, J<sub>3</sub><sup>H-H</sup>=8.3); 7.24 (м, 1H, о-СН-аром); 7.20 (м, 1H, п-СН-аром); 7.15 (м, 1H, м-СН-аром.); 4.54 (д.д.д., 1H, СН, J<sub>3</sub><sup>H-H</sup>=9.4, 8.3, 5.2); 3.63 (с, 3H, ОСН<sub>3</sub>); 3.12 (д.д. 2H, СН<sub>2</sub>, J<sub>3</sub><sup>H-H</sup>=13.9, 5.2); 3.07 (д.д., 1H, СН<sub>2</sub>, J<sub>3</sub><sup>H-H</sup>=13.9, 9.4).

## Динариевая соль оксалилдифенилаланина (2а)

Суспендировали 3,9 г (0,0095 моль) метилового эфира оксалилдифенилаланина в 40 мл Н<sub>2</sub>O. Добавили при перемешивании растертый NaOH 0,95 г (0,0236 моль) и, нагрев реакцию массу до 60°C, перемешивали до полного растворения твердой фазы. По окончании гомогенизации перемешивали еще 1 час, затем, охладив до нормальных условий, выливали водный раствор в 100 мл изопропанола. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали 5 мл серного эфира и высушивали. Получили 3,49 г (0,008 моль) белого кристаллического вещества. Выход 85%.

## Биологические испытания

Изучение противоопухолевой активности проводилось на исходном штамме лейкоза Р388 мышей. Это асцитный лимфолейкоз, перевивка которого осуществляется путем внутрибрюшинного введения 10<sup>6</sup> клеток/мышь мышам-гибридам линии ВDF1. Лекарственно-устойчивые опухоли были получены *in vivo* на мышах этой же линии путем постепенного увеличения дозы лекарственных препаратов на каждой генерации. Перевивка этих штаммов осуществлялась таким же числом клеток. В работе использовали следующие лекарственно-резистентные опухоли:

Р388/руб - штамм Р388, устойчивый к рубомицину, обладает генотипом и фенотипом МЛУ;

Р388/цф - штамм Р388, устойчивый к циклофосфану, обладает фенотипом ЛУ;

Р388/сPt - штамм Р388, устойчивый к цисплатину, обладает фенотипом ЛУ;

СПЖ - средняя продолжительность жизни животных в сутках;

ILS (%) - увеличение средней продолжительности жизни животных (количественная оценка чувствительности к терапии):

$$ILS (\%) = [(СПЖ_{\text{опыт}} - СПЖ_{\text{контр}}) : СПЖ_{\text{контр}}] \times 100,$$

где СПЖ<sub>опыт</sub> и СПЖ<sub>контр</sub> - средняя продолжительность жизни в опытной и контрольной группах, соответственно;

ЛУ - лекарственная устойчивость;

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость.

Дозы традиционных противоопухолевых препаратов в наших экспериментах были значительно снижены по сравнению с их терапевтическими дозами: доза циклофосфана (Цф) - в 5 раз, цисплатина (сPt) - в 6,8 раза, этопозида - в 6 раз, адриамицина (ADR) - в

4 раза.

Синтезированные нами соединения вводились животным в дозах, составляющих 1/3 от их LD<sub>50</sub> (доза, вызывающая гибель 50% животных), в стерильной дистиллированной воде.

5 Лечение лейкоза Р-388

Таблица 1. Соединение 2 (с.2)

Штамм/ препарат	Доза (мг/кг)	Режим введения (сутки после перевивки опухоли)	% выжив- ших	СПЖ (в сутках)	ILS (%)
Р388					
с. 2	400	1-7	0	12,3	28
сPt	0,6	1 - 7	0	25,8	169
цф	20	1,6	0	25,2	163
ADR	1,0	1, 7	0	23,5	145
этопозид	2,5	1, 5, 9	17	35,8	273
с.2 + сPt	400 + 0,6	(1-7) + (1-7)	0	36,3	278
с.2 + цф	400 + 20	(1-7) + 1,6	17	35,8	273
с.2 + ADR	400 + 1,0	(1-7) + 1, 7	0	18,8	96
с.2+этопозид	400 + 2,5	(1-7) + 1,5,9	50	49,0	410
с.2 + Mit C	400 + 1,0	(1-7) + 1,6	0	20,0	108
контроль	-----	-----	0	9,6	----

Данные таблицы 1 показывают, что на штамме лейкоза Р388 соединение 2 не обладает активностью в монотерапии, но повышает эффективность ряда известных цитостатиков, применяемых в уменьшенных дозах. Так, соединение 2 увеличивало эффективность цисплатина и циклофосфана на 110%, этопозид - на 137%. В последнем случае увеличивалось и число выживших животных от 17% до 50%.

Лечение лекарственно-резистентных штаммов лейкоза Р-388

30 Таблица 2. Соединение 2 (с.2)

Штамм/ препарат	Доза (мг/кг)	Режим введения (сутки после перевивки)	% выжив- ших	СПЖ (в сутках)	ILS (%)
Р388/сPt					
с 2	400	1-7	0	10	0
Этопозид	2,5	1,5,9	17	34,8	200
с. 2+этопозид	400+2,5	(1-7)+ 1,5,9	50	44,7	285
контроль	-----	-----	0	11,6	-----
Р388/цф					
с. 2	400	1-7	0	14,2	7
ADR	1,0	1, 7	0	25,2	89
с. 2 + ADR	400+1,0	(1-7) + 1, 7	17	33,2	150
контроль	-----	-----	0	13,3	-----

45 По данным таблицы 2, на лекарственно-устойчивых опухолях соединение 2 собственной эффективностью не обладало, но при комбинированном применении с известными цитостатиками, применяемыми в значительно сниженных дозах, проявляло хемосенсибилизирующие свойства. Так, на штамме Р388/сPt при совместном применении

2 с этопозидом 50% животных выживало, а показатель ILS остальных животных составлял 285%. На Р388/цф наш модулятор при комбинации с адриамицином увеличивал эффективность последнего на 61%.

5 Следует особо отметить, что во всех экспериментах по комбинированной терапии нашими соединениями-модуляторами и традиционными противоопухолевыми цитостатиками последние применялись в дозах, значительно меньших, чем их терапевтические дозы. Это очень важно, т.к. высокая токсичность этих препаратов общеизвестна, поэтому возможность применения их в уменьшенных дозах, а значит, и с меньшей токсичностью, но с высоким эффектом, позволит увеличить

10 продолжительность лечения больных с большим положительным выходом.

Таким образом, получены новые, ранее неизвестные, оксалилпроизводные щавелевой кислоты в сочетании с аланином и дифенилаланином, которые в комбинированной терапии с традиционными противоопухолевыми препаратами существенно повышают их терапевтический эффект на штамме лейкоза Р388 мышей, а также на лекарственно-

15 резистентных штаммах лейкоза Р-388.

#### (57) Формула изобретения

1. Производные щавелевой кислоты общей формулы I  $RC(O)-C(O)R$ , где  $R=CH_3CH(-NH)C(O)ONa$  (1),  $Ph-CH_2CH(-NH)C(O)ONa$  (2).

20 2. Производные щавелевой кислоты по п.1 в качестве хемосенсибилизаторов в комбинированной терапии опухолей с фенотипом лекарственной устойчивости.

3. Производные щавелевой кислоты по п.1 в качестве средств повышения эффективности при проведении комбинированной терапии лейкоза Р388.

4. Способ получения производных щавелевой кислоты по п.1 путем воздействия на

25 гидрохлорид метилового эфира соответствующей аминокислоты оксалилдихлоридом с последующим отделением метиловых эфиров оксалилдиаминокислот, их обработкой гидроксидом натрия в среде спирта и выделением целевых продуктов.

30

35

40

45