



(19) KG (11) 2147 (13) C1  
(51) C07H 5/04 (2019.01)  
C07H 13/12 (2019.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И  
ИННОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики под ответ-  
ственность заявителя**

(21) 20180023.1

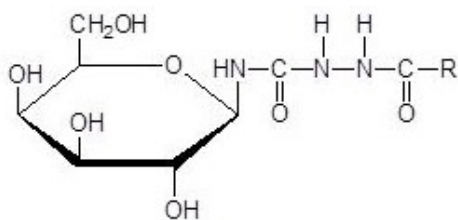
(22) 20.03.2018

(46) 31.05.2019, Бюл. № 5

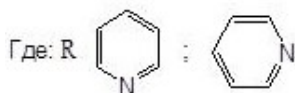
(76) Эрназарова Б. К.; Бакирова А. А.; Бечелова А. Т.; Дермугин В. С. (KG),  
Апрышко Г. Н. (RU)

**(54) N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никоти-ноил-семикарбазид и N-(β-D-галактопира-  
нозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазид, обладающие антиангиогенными свойствами**

(57) Изобретение относится к новому химическому соединению N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-  
никотиноил-семикарбазида и N-(β-D-га-лактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикар  
базида формулы I, обладающему антиангиогенными свойствами, которое может найти применение в  
медицине.



(I)

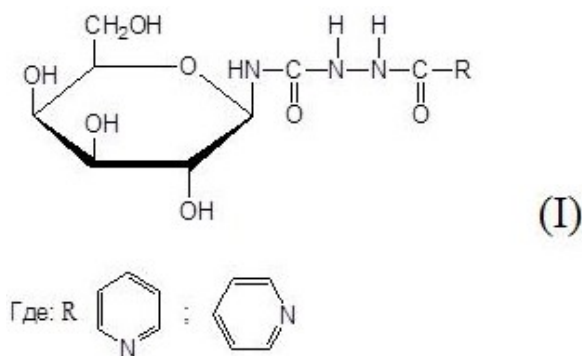


Задача изобретения - синтез нового соединения, обладающего антиангиогенными свойствами.

Поставленная задача решается синтезом и идентификацией структуры полученных соедине-  
ний и определением биологической активности N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никотиноил-семи-  
карбазида и N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида, которые являются со-  
единением формулы (I) и обладают антиангиогенными свойствами.

1 н. п. ф.

Изобретение относится к новому химическому соединению N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-  
никотиноил-семикарбазида и N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида  
формулы I, обладающему антиангиогенными свойствами, которое может найти применение в  
медицине.



Соединение (I), его свойства и способ получения в литературе не описаны.

Структурным аналогом предлагаемого соединения является N-(β-D-галактопиранозилкарбамоил) диэтилендиамин, проявляющий антигельминтную активность (Патент КР № 573, кл. C07H 5/04; C07D 295/00; A61K 31/70, 2003)

Наиболее близким к описываемому соединению по физиологической активности является изониазид, проявляющий высокую бактериостатическую активность.

Недостатком прототипа является недостаточная эффективность препарата по отношению к антиангиогенной активности.

Задача изобретения - синтез нового соединения, обладающего антиангиогенными свойствами.

Поставленная задача решается синтезом и идентификацией структуры полученных соединений и определением биологической активности N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никотиноил-семикарбазида и N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида, который является соединением формулы (I) и обладает антиангиогенными свойствами.

Соединение формулы (I) получают по реакции взаимодействия N-метил-N-(β-D-галактопиранозил)-N-нитрозомочевины с гидразид никотиновой кислотой и гидразид изоникотиновой кислотой в спиртовой среде при температуре 50-55 °С.

#### Синтез N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никотиноил-семикарбазида

В колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещают 0,5 гр. гидразид никотиновой кислоты, растворяют в 10 мл этилового спирта и охлаждают смесь до -2 °С, затем при перемешивании добавляют 1 г N-метил-N<sup>1</sup>-(β-D-галактопиранозил)-N-нитрозомочевины в течение 30 минут. Затем смесь при перемешивании нагревают на водяной бане при температуре 50-55 °С в течение часа и при этой температуре выпадают желтые кристаллы. Выпавшие кристаллы перекристаллизовывают из водного спирта, отфильтровывают и высушивают на воздухе.

Выход соединения: 0,7 г, (54,26 %), Тпл = 214-216 °С,

Rf = 0,25 (хлороформ - метанол (1:1)).

Брутто формула C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

Молярная масса: 342,30852 г/моль.

Соединение растворимо в воде, пиридине и малорастворимо в метаноле.

Элементный анализ:

Вычислено содержание: С - 45,61 %; Н - 5,30 %; N - 16,36 %.

Найдено содержание: С - 45,15 %; Н - 5,70 %; N - 17,00 %.

В ИК-спектре, N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никотиноил-семикарбазида, β-положения углеводного кольца проявляется в области 906 см<sup>-1</sup>. Широкая полоса ОН-группы углеводного кольца находится в районе 3000-3500 см<sup>-1</sup>, валентное колебание С=О (амид I) наблюдается в области 1601 см<sup>-1</sup>, полоса поглощения 1548 см<sup>-1</sup> относится к деформационным колебаниям N-H (амид II). А также валентные колебания изониазида находятся в районе 473, 545, 583, 626, 675, 705 см<sup>-1</sup>.

В ПМР-спектре (*Протонный магнитный резонанс*), N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-никотиноил-семикарбазид, группа сигналов в районе 4,2 м.д. принадлежит протонам, связанным с С<sub>6</sub>. Следующая группа пиков соответствует водородным атомам (С<sub>3</sub>) в виде уширенного синглета при 4,7 м.д. Протоны при С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub> и С<sub>4</sub> имеют близкое значение химического сдвига и образуют сложную группу сигналов в интервале 4,7-5. Протон при С<sub>1</sub> резонирует в виде синглета при 5,7 м.д., причем значение константы спин-спиновой взаимодействия свидетельствует о β-конфигурации агликона. Сигнал протона N-H группы наблюдается в области 8 м.д. Протоны изоникотиновой кислоты наблюдаются в виде уширенного синглета в районе 3,8-4,1 м.д.

### Синтез N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида

В колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещают 3,568 г гидразид изоникотиновой кислоты, растворяют в 30 мл этилового спирта и охлаждают смесь до - 2 °С, затем при перемешивании добавляют 7,136 г N-метил-N<sup>1</sup>-(β-D-галактопиранозил)-N-нитрозомочевины в течение 30 минут. Затем смесь при перемешивании нагревают в водяной бане при температуре 55-60 °С в течение часа и при этой температуре выпадают кристаллы. Выпавшие кристаллы перекристаллизовывают из водного этилового спирта, отфильтровывают и высушивают на воздухе.

Выход соединения - 5,377 г, (58,38 %), температура плавления - 212-213 °С.

Rf = 0,3 (хлороформ - этанол 1:1); Rf = 0,5 (этанол - хлороформ - ацетон 2:1:1).

Брутто формула C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

Молекулярная масса: 342,30852 г/моль.

Элементный анализ:

Вычислено содержание: С - 45,61 %; Н - 5,30 %; N - 16,36 %.

Найдено содержание: С - 44,90 %; Н - 5,59 %; N - 16,95 %.

В ПМР-спектре, в частности N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида, группа сигналов в районе 3,95 м.д. принадлежит протонам, связанным с С<sub>6</sub>. Следующая группа пиков соответствует водородным атомам (С<sub>5</sub>) в виде уширенного синглета при 4,37 м.д. Протоны при С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub> и С<sub>4</sub> имеют близкое значение химического сдвига и образуют сложную группу сигналов в интервале 4,6-4,9. Протон при С<sub>1</sub> резонирует в виде синглета при 5,4 м.д., причем значение константы спин-спинового взаимодействия свидетельствует о β-конфигурации агликона. Сигнал протона N-H группы наблюдается в виде дуплета в области 8,2 м.д. Протоны изоникотиновой кислоты наблюдаются в виде мультиплета в районе 3,5-3,8 м.д.

В спектрах ЯМР <sup>13</sup>С (ядерно-магнитный резонанс) N-(β-D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазид аномерных атомов углерода обнаруживается в области δ = 576.43-81.34 м.д., что также свидетельствует в пользу β-конфигурации гликозидной связи. Сигналы в области δ = 60.97 м.д. и 568.67 м.д. говорят о том, что глюкозидный остаток в рассматриваемых соединениях находится в пиранозной форме. Химические сдвиги атомов углерода никотиновой кислоты находятся в поле С<sub>2</sub> (152,1 м.д.); С<sub>3</sub> (127,9 м.д.); С<sub>4</sub> (136,4 м.д.); С<sub>5</sub> (124,28 м.д.); С<sub>6</sub> (147,5 м.д.). Сигналы атомов углерода С=О находятся в области 168,24 и 159,15 м.д.

Опыты на цитостатическую активность проводили на базе лаборатории экспериментальной диагностики биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации). Цитостатическую активность исследовали *in vitro* на 5 клеточных линиях опухолей человека: аденокарцинома простаты PC-3; карцинома толстой кишки HCT-116; Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat; аденокарцинома молочной железы MCF-7; карцинома легкого A549.

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium* - среда для культур клеток и тканей), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 mM HEPES (Sigma, США), 2 mM L-глутамина (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), аминокислоты и витамины (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3-4 дня. Для открепления с пластика адгезионных культур использовали раствор Версена.

Для постановки МТТ-теста клетки раскапывали в 198 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA).

Через сутки в каждую лунку добавляли исследуемые соединения в концентрации 100 мкМ, и инкубировали с клетками в течение 72 ч в 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Каждое соединение ставили в триплете. Соединения растворяли в диметилсульфоксиде, при этом концентрация диметилсульфоксида в лунке не превышала 1 %. В качестве контроля использовали лунки с клетками с 1 % диметилсульфоксидом в полной ростовой среде.

Через 72 ч в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ[3-(4-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолий бромид (маточный раствор 5 мг/мл, конечная концентрация 1 мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub>.

После образования формаза надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида. Далее планшеты помещали на 5-7 минут в термостат при температуре 37 °С и затем встряхивали на шейкере для равномерного растворения кристаллов формаза, после чего интенсивность окрашивания среды измеряли фотометрическим анализаторе иммунофермент-

ных реакций «MultiskanEX» при  $\lambda=540$  н. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Определяли процент ингибирования роста клеток (И, %) по формуле:

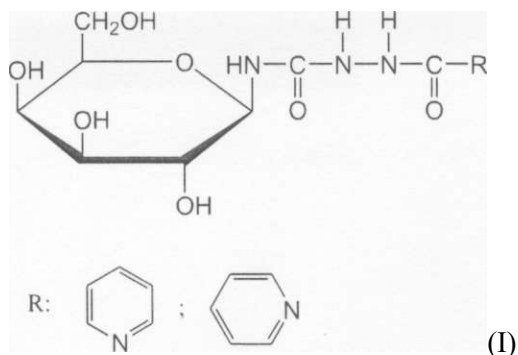
$$И = (1 - (O_o / O_k)) * 100 \%,$$

где  $O_k$  - оптическая плотность в контрольных лунках;  $O_o$  - оптическая плотность в опытных лунках. Каждый эксперимент повторяли 3 раза.

При первичной оценке цитостатической активности на клетках 5 злокачественных опухолей человека (аденокарцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарцинома молочной железы MCF-карцинома легкого A549) протестированных соединений показало низкую цитостатическую активность и высокое проявление противоопухолевой активности, обусловленное антиангиогенными свойствами.

### Формула изобретения

N-( $\beta$ -D-галактопиранозил-1)-2-никоти-ноил-семикарбазида и N-( $\beta$ -D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида формулы:



обладающие антиангиогенными свойствами.

Выпущено отделом подготовки официальных изданий