

Invenția se referă la chimia farmaceutică, în special la un compus nou clorură de 3-(2-((3S,10R,13S)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-oxoetil)-1-vinil-1H-imidazol-3-ium din clasa steroizilor ca remediu activ contra cancerului de prostată.

Cancerul de prostată (CP) este cea mai comună formă de cancer la bărbați în țările dezvoltate. Se știe că reducerea nivelului de androgeni la pacienții cu CP determină regresia tumorii. Calea androgenică rămâne ținta principală a terapiei CP, aceasta joacă un rol principal în formarea și progresia acestei forme de cancer [P.J. Saylor. The androgen receptor remains front and centre. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2013, 10(3), p. 126-128]. Terapia care vizează reducerea conținutului de testosteron din sânge permite încetinirea semnificativă a procesului de dezvoltare a tumorii și ameliorarea semnificativă a stării pacientului. Pentru aceasta, se utilizează o serie de medicamente care blochează sinteza androgenilor în testicule sau cortexul suprarenalelor sau se recurge la intervenția chirurgicală.

Etapă cea mai importantă a sintezei androgenilor este transformarea pregnenolonului în 17α -OH-pregnenolon, apoi în dehidroepiandrosteron (DHEA), secretat de testicule și de cortexul suprarenalelor. Ambele reacții au loc cu implicarea enzimei CYP17A1 din familia citocromului P450, care combină funcțiile de 17α -hidroxilază și de 17,20-liază. S-a demonstrat că inhibarea citocromului CYP17A1 cu doze mari de ketoconazol, un medicament antifungic cunoscut, crește eficacitatea terapiei standard pentru cancerul de prostată rezistent la tratament hormonal. Cu toate acestea, medicamentul a fost foarte toxic și nu a putut fi utilizat pe scară largă [1].

Până în prezent, a fost sintetizată o multitudine de derivați heterociclici ai androstanului și pregnanului, de exemplu, un derivat imidazolic cu proprietăți citotoxice, care este cel mai apropiat de invenția revendicată, dar nu manifestă activitate contra celulelor tumorale ale cancerului de prostată [2].

În 2011 a fost aprobat un nou inhibitor al CYP17A1 - medicamentul abirateronă, eficientă în tratarea cancerului de prostată rezistent la tratament hormonal, în special în reducerea nivelului de testosteron din sânge [3]. Abiraterona, reieșind din structura sa steroidică și nivelul de activitate antitumorală, poate fi considerată analogul proxim pentru invenția revendicată.

Dezavantajul abirateronei rezultă din faptul că una dintre problemele legate de utilizarea inhibitorilor CYP17A1 este suprimarea sintezei glucocorticoizilor, inclusiv a cortizolului: CYP17A1 este implicat atât în conversia progesteronului în androgeni, manifestându-și activitatea de liază, cât și în sinteza mineralo- și glucocorticoizilor, manifestându-și funcția de hidroxilază. Inhibarea nespecifică a CYP17A1 cu abirateronă determină o scădere atât a funcției de liază, cât și a funcției de hidroxilază. Din acest motiv, pacienților care iau abirateronă li se administrează terapie de înlocuire a cortizolului, în special prednison. Acest lucru conduce la efecte nedorite, în particular, la sindromul de exces de mineralocorticoizi. Pentru a evita aceste efecte secundare, este necesară dezvoltarea inhibitorilor cu o selectivitate înaltă pentru activitatea de 17,20-liază, care să nu afecteze activitatea de hidroxilază a CYP17A1. În RM este înregistrat un singur medicament care conține acetat de abirateronă, care inhibă selectiv activitatea enzimei 17α -hidroxilază / C17,20-liază (CYP17), având denumirea comercială Birato 250 (MSN Laboratories Pvt. Limited, India), cu prețul de 1584,09 euro pentru 120 de tablete de 250 mg substanță activă.

Problema rezolvată de invenție constă în extinderea gamei de preparate din clasa steroizilor cu activitate antitumorală împotriva cancerului de prostată cu acțiuni de inhibiție a CYP17A1.

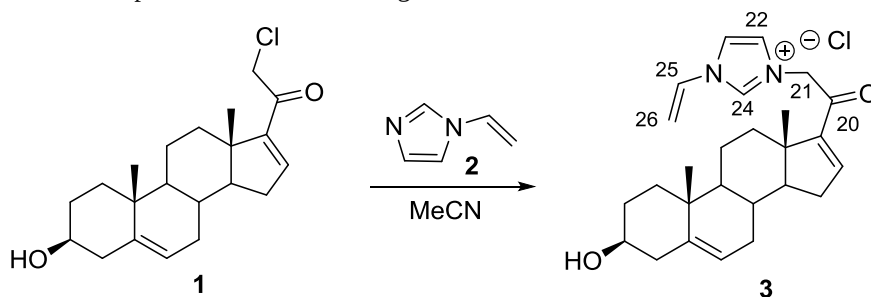
Esența invenției constă în aceea că se revendică un compus nou din clasa steroizilor, care poate fi utilizat în calitate de compus activ contra cancerului de prostată. Concentrația activă este de $1,57 \pm 0,24 \mu\text{M}$.

Avantajele invenției constau în aceea că compusul clorură de 3-(2-((3S,10R,13S)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-oxoetil)-1-vinil-1H-imidazol-3-ium sintetizat mai ușor din reagenți accesibili decât un derivat de pregnan cu un inel imidazolic la C-21 [2]. Totodată, compusul se caracterizează printr-o activitate sporită antitumorală împotriva cancerului de prostată.

Rezultatul invenției constă în manifestarea activității antitumorale împotriva cancerului de prostată a compusului din invenție în concentrație de $1,57 \pm 0,24 \mu\text{M}$.

Exemple de realizare a invenției

Sinteza compusului revendicat decurge conform schemei de realizare:



2-Clor-1-((3S,10R,13S)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)etan-1-onă 1 a fost obținută conform metodei descrise anterior (Girdhar N. K., & Ishar

M. P. S. Facile C21 functionalization through a novel functional group transfer reaction in 16 α ,17 α -epoxy-3 β -hydroxypregn-5-en-20-one and its applications. *Chem. Commun.*, 2002, 18, p. 2102–2103).

1-Vinil-1H-imidazolul 2 a fost procurat de la firma Aldrich.

Amestecul reactant format din 70 mg (20,0 mmol) 2-cloretan-1-ona 1 și 1-vinil-1H-imidazol 2 18 mg (20,0 mmol) în 30 mL acetonitril, se refluxează timp de 10 ore (control CSS), apoi se răcește și se supune cristalizării timp de 24 ore. Substanța cristalină clorură de 3-(2-((3S,10R,13S)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-oxoetil)-1-vinil-1H-imidazol-3-ium (3) se filtrează, se spală pe filtru cu un amestec format din hexan-benzen (1:1), apoi se usucă la temperatura camerei.

Randamentul reacției este de 65 mg (74%). Punctul de topire >250°C (descomp).

Structura compusului (3) este confirmată pe baza analizei elementelor.

Pentru C₂₆H₃₅ClN₂O₂, M=443,02:

Calculat, (%): C, 76,62; H, 8,66; N, 6,87.

Determinat, (%): C, 76,77; H, 8,61; N, 6,95.

Obținerea compusului revendicat (3) este confirmată prin metoda RMN. În spectrul 1H RMN apar trei singlete într-un câmp slab la δ 9,22 ppm, 8,02 ppm și 7,62 ppm, corespunzătoare protonilor fragmentului imidazolic. De asemenea, sunt prezente trei dublet-de-dublete la 7,29 ppm (dd, J = 15,4 Hz; 8,6 Hz; 1H; H-25); 5,93 ppm (dd, J = 15,4 Hz; 2,4 Hz; 1H; H-26) și 5,46 ppm (dd, J = 8,6 Hz; 2,4 Hz; 1H; H-26), care aparțin celor trei protoni vinilici. În spectrul DEPT-135 în câmp slab apar patru semnale caracteristice pentru atomii de carbon metinici și un semnal la 108,9 ppm, caracteristic pentru atomul de carbon metilenic.

Spectrul RMN 1H (500 MHz, MeOH-d₄): δ 9,22 (s, 1H, H-24); 8,02 (s, 1H, H-22); 7,62 (s, 1H, H-23); 7,29 (dd, J = 15,4 Hz; 8,6 Hz; 1H, H-25); 7,17 (s, 1H, H-16); 5,93 (dd, J = 15,4 Hz; 2,4 Hz; 1H, H-26); 5,69 (d, J = 17,7 Hz; 1H, H-21); 5,52 (d, J = 17,7 Hz; 1H, H-21); 5,46 (dd, J = 8,6 Hz; 2,4 Hz; 1H, H-26); 5,35 (m, 1H, H-6); 3,38 (hpt, J = 5,3 Hz; 1H, H-3); 2,46 (ddd, J = 18,1 Hz; 5,9 Hz; 2,9 Hz; H-15); 2,29 (dm, J = 12,1 Hz; 1H, H-4); 2,27 – 2,14 (m, 4H, H-15',4',7,7'); 2,04 (bd, J = 16,3 Hz; 1H, H-7); 1,83 (bdt, J = 13,2 Hz; 3,8 Hz; 1H, H-12); 1,80-1,73 (m, J = 11,7 Hz; 1H, H-2); 1,71 (td, J = 10,7; 4,5 Hz; 1H, H-14); 1,68-1,57 (m, 4H, H-1,9,8,11); 1,52 – 1,43 (m, 3H; H-1'2, 11,11'); 1,38 (td, J = 13,2 Hz; 12,1 Hz; 7,0 Hz; 1H, H-12'); 1,04 (s, 3H; H-18); 0,94 (s, 4H, H-19).

Spectrul RMN 13C (126 MHz, MeOH-d₄): δ 187,9 (C-20); 151,4 (C-17); 148,1 (C-16); 141,3 (C-5); 136,5 (C-24); 128,4 (C-25); 124,6 (C-22); 120,6 (C-6); 118,7 (C-23); 108,9 (C-26); 71,1 (C-3); 56,1 (C-14); 54,8 (C-21); 50,7 (C-9); 46,6 (C-13); 41,6 (C-4); 37,0 (C-1); 36,5 (C-10); 34,3 (C-12); 32,6 (C-2); 31,2 (C-7); 30,9 (C-15); 30,1 (C-8); 20,4 (C-11); 18,4 (C-19); 14,9 (C-18).

Testul CYP17A1

Pentru a determina constantele de legare a ligandului (valori K_{dapp}) ale CYP17A1, s-a efectuat o titrare spectrofotometrică folosind un spectrofotometru cu fascicul dublu UV-Vis NIR Cary 5000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) în cuvete din cristal de cuarț de 1 cm. Soluțiile stoc de steroizi au fost pregătite la o concentrație de 10 mM în DMSO. Titarea a fost repetată de cel puțin trei ori, iar K_{dapp} a fost calculat conform descrierii anterioare [Guryev O.L.; Gilep A.A.; Usanov S.A.; Estabrook R.W. Interaction of apo-cytochrome b5 with cytochromes P450A4 and P45017A: Relevance of heme transfer reactions. *Biochemistry*, 2001, 40, p. 5018–5031].

Activitatea CYP17A1 a fost măsurată în sistemul reconstituit la 37°C în tampon Hepes de 25 mM (pH 7,2) conform metodei cunoscute [Pechurskaya T.A.; Lukashevich O.P.; Gilep A.A.; Usanov S.A. Engineering, expression, and purification of “soluble” human cytochrome P45017a and its functional characterization. *Biochemistry*, 2008, 73, p. 806–811]. Alicvotile de proteine recombinante concentrate au fost amestecate și pre-incubate timp de 5 min la temperatura camerei. Progesteronul au fost adăugate la amestecul de reacție la o concentrație finală de 50 μ M. Compușii selectați au fost adăugați la amestecul de reacție la o concentrație finală de 50 μ M. Pentru a măsura activitatea, concentrațiile finale de CYP17A1 și CPR au fost de 1,0 și, respectiv, 2,0 μ M. Pentru analiza activității de 17,20-liază, s-a utilizat 1,0 μ M de citocrom b5. După 10 min de pre-incubare la 37°C, reacția a fost începută prin adăugarea NADPH la o concentrație finală de 0,25 mM. Au fost prelevate alicote (0,5 mL) din amestecul de incubare după 30 de min de reacție. Steroizii au fost extrasi cu 5 mL de clorură de metilen. Stratul organic a fost îndepărtat cu grijă, iar peletul format - uscat sub flux de argon. La pelet s-au adăugat 100 μ L de metanol, iar steroizii au fost analizați pe un sistem HPLC computerizat.

Pentru efectuarea experienței ca prim pas în analiza interacțiunii compușilor cu situl activ CYP17A1, a fost efectuată titrarea spectrofotometrică a compușilor selectați. Progesteronul cu K_{dapp} <1 μ M a fost utilizat ca control pozitiv pentru ligandul asemănător substratului (tipul I). Abiraterona cu un K_{dapp} <1 μ M a fost utilizată în calitate de control pozitiv pentru ligandul asemănător inhibitorului (tipul II). DMSO sau etanolul au fost utilizați ca control negativ. Nu s-au observat răspunsuri spectrale de tip I sau de tip II pentru controalele negative. Analiza legării compusului revendicat cu CYP17A1 uman a arătat că se observă numai răspunsul de tip I (asemănător substratului). Amplitudinea răspunsului spectral demonstrează un răspuns dependent de doză. Compusul 3 are afinitate micromolară într-un interval de 1...2 pM (K_{dapp} = 1,57 $\pm$ 0,24 μ M).