



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89761** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**C07D 417/00**  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

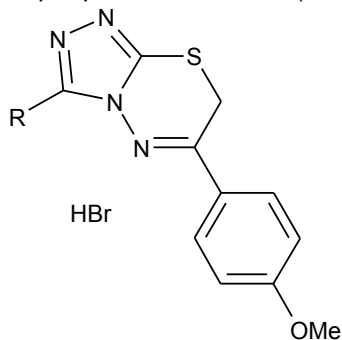
## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 14827</b>	(72) Винахідник(и): <b>Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олексійович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Гриневич Олександр Йосипович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>18.12.2013</b>	(73) Власник(и): <b>НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Кропив'янського, 2, м. Ніжин, 16602 (UA), ДЕРЖАВНА НАУКОВА УСТАНОВА "ДЕРЖАВНИЙ ЦЕНТР ІННОВАЦІЙНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ", вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.04.2014</b>	(74) Представник: <b>Поприткіна Дурсунгазель Шамирадівна</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2014, Бюл.№ 8</b>	

**(54) ГІДРОБРОМІДИ 3-АЛКІЛ-6-(4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-7Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-В][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИНУ АКТИВНІСТЬ**

(57) Реферат:

Гідроброміди 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-в][1,3,4]тіадіазину:

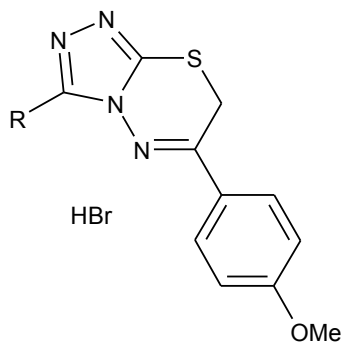


де R=H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>, CF<sub>3</sub>,  
що мають протипухлинну активність.

UA 89761 U



Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 1H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину загальної формули:



5 де R=H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>, CF<sub>3</sub>,  
що проявляють протипухлинну активність та можуть бути використані при лікуванні пухлини  
молочної залози.

Щорічно у світі реєструється близько 6 мільйонів нових випадків захворювання злоякісними  
пухлинами. Найбільш висока захворюваність серед чоловіків відзначена у Франції (361 чоловік  
10 на 100 000 населення), серед жінок у Бразилії (відповідно 283,4 - на 100 000) [1]. Частково це  
пояснюється старінням населення. Більшість ракових пухлин розвивається у осіб старше 50  
років, а кожен другий онкологічно хворий старше 60 років. Найбільш часто уражаються  
передміхурова залоза та легені у чоловіків і молочна залоза у жінок.

На сучасному етапі для лікування пухлинної хвороби широке застосування набули  
15 циклофосфан, метатрексат, вінкристин, адриабластин. Дані лікарські засоби проявляють  
необхідні лікувальні властивості, але мають значні побічні ефекти на систему кровотворення  
(лейкопенія, анемія, тромбоцитопенія), ЦНС (почуття втоми, головокружіння, головний біль,  
афазія, сонливість, судоми), репродуктивної системи (порушення оогенезу та сперматогенезу,  
олігоспермія, порушення менструального циклу, зниження лібідо, імпотенція), сечовидільної  
20 системи (гематурія, цистит, виражені порушення функції нирок), алергічні та дерматологічні  
реакції тощо.

Відомий лікарський засіб анастрозол (похідне 1,2,4-триазолу [2]), який проявляє активність  
проти естрогензалежних пухлин молочної залози у жінок. Він є селективним нестероїдним  
інгібітором ферменту ароматази, який призводить до зниженню рівня естрадіолу в  
25 периферичних тканинах. Відомо [3], що захворювання на пухлини молочної залози в світі  
становлять понад 20 % від загальної кількості онкологічних захворювань.

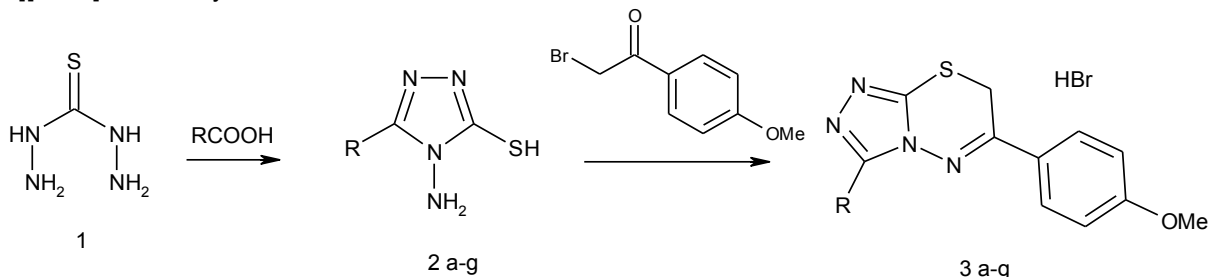
При застосуванні анастрозолу може розвиватися анемія, тромбофлебіт та лейкопенія, що є  
показаннями для відміни препарату.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють  
30 протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин раку молочної залози, зокрема  
клітин MDA-MB-468.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові хімічні речовини синтезовані гідроброміди 3-  
алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину.

Заявлені гідроброміди 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин  
35 одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька  
стадій (схема 1).

Схема 1. Синтез гідробромідів 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-  
b][1,3,4]тіадіазину.



40 де 3a R=H; 3b R=CH<sub>3</sub>; 3c R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 3d R=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; 3e R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; 3f R=C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>; 3g R=CF<sub>3</sub>.

Дослідження мітотичної активності проведено методом флуоресцентного зафарбування (барвник - сульфородамін Б) (табл. 1).

Для визначення протипухлинної активності похідних 1H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину проведено in vitro на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстої кишки, ЦНС, меланоми, яєчників, нирок, простати, молочної залози) при дії речовини в концентрації  $10^{-5}$  моль/л за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності нових потенційних біологічно активних сполук, виконаних в Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program. Результат проведених досліджень виражали у відсотках росту клітин раку порівняно з контролем. В якості еталону для порівняння використовували 5-фторурацил та адриаміцин.

Таблиця 1

Протипухлинна активність гідробромідів 3-алкіл-6-(4-метокси-феніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину in vitro на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації  $10^{-5}$  моль/л

Лінії ракових клітин	Сполуки						
	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g
Лейкемія							
CCRF-CEM	90,97	99,20	-	64,82	69,44	12,49	60,77
HL-60(TB)	-	85,83	46,93	55,20	27,90	7,13	60,75
K-562	109,18	108,09	20,53	16,06	-	12,75	16,29
MOLT-4	92,82	103,14	50,33	19,89	64,99	-	19,06
RPMI-8226	105,99	110,47	68,67	88,64	99,24	45,35	86,34
SR	85,31	68,03	29,11	24,51	54,91	26,47	28,27
Дрібноклітинний рак легень							
A549/ATCC	94,22	90,34	49,88	68,67	67,22	30,09	60,62
EKVX	87,61	92,21	78,15	-	74,90	45,54	-
HOP-62	97,65	95,18	42,83	61,26	73,46	34,62	66,67
HOP-92	109,07	-	-	64,29	98,87	-	76,47
NCI-H226	95,69	97,84	78,24	77,45	83,71	67,42	90,26
NCI-H23	106,43	110,63	71,33	64,42	81,91	44,23	76,58
NCI-H322M	96,23	99,77	95,89	-	96,55	59,24	96,31
NCI-H460	108,92	111,44	54,88	89,91	89,64	12,91	94,61
NCI-H522	106,91	-	-	59,15	85,24	-0,85	52,83
Рак товстої кишки							
COLO 205	117,74	111,53	49,96	61,02	91,43	-	81,03
HCC-2998	97,59	109,85	52,77	60,96	61,25	40,60	67,68
HCT-116	106,46	99,30	45,53	65,97	58,07	16,10	73,31
HCT-15	101,36	105,47	45,36	43,19	-	22,44	46,34
HT29	107,48	106,46	46,90	54,19	47,70	6,79	69,67
KM12	102,22	101,79	36,02	60,06	57,13	28,76	45,45
SW-620	107,50	108,91	43,64	40,15	32,79	18,25	38,02
Рак кори головного мозку							
SF-268	106,01	107,92	49,58	86,47	82,04	51,34	83,63
SF-295	100,52	115,19	64,89	-	76,33	4,79	-
SF-539	104,86	99,21	44,73	65,46	69,09	5,83	65,33
SNB-19	98,77	102,23	51,83	-	82,55	43,59	-
SNB-75	90,66	91,35	-	45,72	66,04	13,16	62,68
U251	95,74	95,61	54,54	68,94	64,69	38,41	58,31
Меланома							
LOX IMVI	99,68	100,99	68,24	59,85	58,72	44,57	65,39
MALME-3M	95,40	100,48	109,02	-	85,34	48,54	91,57
M14	103,00	99,31	46,09	55,11	43,34	-1,10	58,63
MDA-MB-435	97,95	96,25	-13,02	-0,35	-7,41	-2,71	-12,56
SK-MEL-2	128,42	137,89	-	62,81	98,22	-	63,37
SK-MEL-28	102,34	105,53	43,09	81,34	68,56	51,54	86,81
SK-MEL-5	101,46	102,54	27,35	72,16	80,99	-0,14	80,05

Продовження таблиці 1

Лінії ракових клітин	Сполуки						
	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g
UACC-257	103,06	102,85	67,04	98,52	86,31	71,97	83,63
UACC-62	103,32	102,85	50,51	73,46	73,59	46,77	67,24
Рак яєчників							
IGROV1	101,65	101,41	80,84	-	80,55	42,20	75,32
OVCAR-3	111,32	112,41	34,49	81,27	75,70	-11,98	75,79
OVCAR-4	101,54	103,65	53,96	79,35	84,99	51,27	83,69
OVCAR-5	102,79	110,37	77,87	79,26	92,64	57,03	82,13
OVCAR-8	100,21	89,94	72,12	92,40	88,36	31,72	84,02
NCI/ADR-RES	105,02	106,13	20,12	13,31	29,64	2,43	25,32
SK-OV-3	104,23	109,67	-	67,31	82,61	-	80,28
Рак нирок							
786-0	100,46	97,31	78,02	79,35	86,41	33,60	85,66
A498	87,40	101,18	48,97	37,81	49,40	-1,24	10,40
ACHN	109,65	100,21	58,58	81,69	85,73	45,24	84,80
CAKI-1	89,67	108,33	35,23	59,58	56,48	20,80	61,42
RFX 393	104,05	105,12	33,73	82,19	84,29	1,46	89,26
SN12C	99,15	98,16	78,43	82,49	79,94	41,38	76,07
TK-10	103,75	109,96	38,63	75,90	90,87	29,99	80,05
UO-31	89,43	78,24	69,97	-	78,96	40,01	66,22
Рак простати							
PC-3	96,76	95,75	84,33	78,43	78,81	25,82	83,73
DU-145	114,20	114,68	74,30	110,63	92,29	16,17	94,00
Рак молочної залози							
MCF7	94,63	95,47	15,51	47,09	48,16	22,04	52,95
MDA-MB-231/ATCC	109,69	103,56	55,33	76,52	71,09	44,68	74,19
HS 578T	109,74	106,95	48,03	67,25	78,06	23,99	63,93
BT-549	96,41	103,10	-	69,29	68,19	26,08	73,02
T-47D	99,26	89,91	-	67,02	00,75	-	78,22
MDA-MB-468	102,99	101,90	-0,91	20,51	30,74	-19,00	39,55

В умовах експерименту заявлені сполуки у концентрації  $10^{-5}$  моль/л виявили здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (таблиця 1.). Високу ефективність зазначені сполуки проявили відносно клітин раку молочної залози MDA-MB-468 (значення складає -0,91 та -19,00 для сполуки 3c і 3f відповідно). Крім того сполука 3f є ефективною відносно клітин дрібноклітинного раку легень NCI-H522 (значення складає -0,85), клітин раку яєчників OVCAR-3 (-11,98) та клітин раку нирок A498 (-1,24) клітин меланоми MDA-MB-435 (-2,71). Також слід відмітити, що сполуки 3c та 3g є високоефективними відносно клітин меланоми MDA-MB-435 (значення складає -13,02 та -12,56 відповідно). Від'ємні значення свідчать не лише про пригнічення росту і поділу клітин, а й про їх знищення.

Приклади конкретного виконання.

4-Аміно-5-алкіл-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолі 2b-g було одержано за методом [4] взаємодією тіокарбонітриду 1 з відповідною кислотою, 4-аміно-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіол 2a отримано за методом [5] взаємодією тіокарбонітриду з формамідом.

Приклад 1. Синтез гідроброміду 6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3a. До розчину 1,16 г (0,01 моль) 4-аміно-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіолу 2a в 40 мл сухого етилацетату додавали 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду. Нагрівали при перемішуванні на водяній бані 2 години. Охолоджували і осад, що утворився, відфільтровували, промивали ефіром. Перекристалізували з етанолу (Фізико-хімічні та спектральні характеристики синтезованих сполук представлені в таблицях 2 та 3).

Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-метил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3b одержаний аналогічно сполуці 3a з 1,30 г (0,01 моля) 4-аміно-5-метил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2b та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду.

Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-етил-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3с одержаний аналогічно сполуці 3а з 1,44 г (0,01 моля) 4-аміно-5-етил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2с та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацил-броміду.

5 Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-пропіл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]-тіадіазину одержаний аналогічно сполуці 3а з 1,58 г (0,01 моля) 4-аміно-5-пропіл-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2d та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду.

Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-бутил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3е одержаний аналогічно сполуці 3а з 1,72 г (0,01 моля) 4-аміно-5-бутил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2е та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацил-броміду.

10 Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-пентил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]-тіадіазину 3f одержаний аналогічно сполуці 3а з 1,86 г (0,01 моля) 4-аміно-5-пентил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2f та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду.

15 Гідробромід 6-(4-метоксифеніл)-3-трифторметил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3g одержаний аналогічно сполуці 3а з 1,84 г (0,01 моля) 4-аміно-5-трифторметил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіолу 2g та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду.

Таблиця 2

Виходи, температури топлення та дані елементного аналізу 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів

Сполука	Вихід %	Т. топ. °С	Знайдено, N, %	Брутто-формула	Вирахувано, N, %
3а	79	142-4	17,0	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	17,1
3b	81	205-7	16,6	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	16,4
3с	83	236-8	15,7	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	15,8
3d	79	212-3	15,1	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	15,2
3е	78	193-5	14,8	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	14,6
3f	68	185-7	14,0	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	14,1
3g	72	162-4	14,5	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> OS·HBr	14,2

Таблиця 3

Спектри ЯМР <sup>1</sup>H 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів

Сполука	OCH <sub>3</sub> с	SCH <sub>2</sub> с	R	Ароматичні протони
3а	3,85	4,40	9,12 с (1H, 3-CH)	7,10 і 7,95 д - д (4H)
3b	3,87	4,47	2,59 с (3H, CH <sub>3</sub> )	7,13 і 8,06 д - д (4H)
3с	3,87	4,46	1,33 т (3H, CH <sub>3</sub> ) 2,97 к (2H, CH <sub>2</sub> )	7,12 і 8,06 д - д (4H)
3d	3,89	4,46	1,06 т (3H, CH <sub>3</sub> ) 1,87 м (2H, CH <sub>2</sub> ) 3,01 т (2H, CH <sub>2</sub> )	7,07 і 8,02 д - д (4H)
3е	3,86	4,36	0,94 т (3H, CH <sub>3</sub> ) 1,42 м (2H, CH <sub>2</sub> ) 1,74 м (2H, CH <sub>2</sub> ) 2,92 т (2H, CH <sub>2</sub> )	7,08-7,98 м (4H)
3f	3,89	4,32	0,94 т (3H, CH <sub>3</sub> ) 1,41 м (2H, CH <sub>2</sub> ) 1,42 к (2H, CH <sub>2</sub> ) 1,81 к (2H, CH <sub>2</sub> ) 2,94 т (2H, CH <sub>2</sub> )	7,03 і 7,98 д - д (4H)
3g	3,88	4,48		7,11 і 7,98д - д (4H)

20 Приклад 2. Для визначення протипухлинної активності 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів дослідження проводили *in vitro* на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстої кишки, ЦНС, меланоми, яєчників, нирок, простати, молочної залози), при цьому сполуки використовували в концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л та визначали мітотичну активність сполук за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності нових потенційних

біологічно активних сполук [6]. Визначення проводили високочутливим флюорометричним методом, кількісно оцінюючи інтенсивність кольору флуоресцентного випромінювання (барвник - сульфородамін Б) через 48 год. опромінення клітини зі сполукою, що тестується. Результат проведених досліджень виражали у відсотках росту клітин раку, порівняно до контролю.

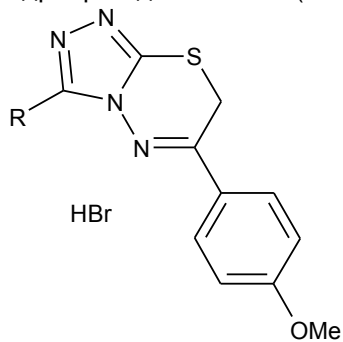
Використана система відбору та вивчення сполук з потенційною протипухлинною активністю *in vitro* основана на визначенні відсотку росту клітин пухлини (PG) під впливом тестованої сполуки, який обчислюється за однією із наступних формул: якщо  $(\text{середня } OD_{\text{тест}} - \text{середня } OD_{\text{tzero}}) > 0$ , тоді  $PG=100 \times (\text{середнє } OD_{\text{тест}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}}) / (\text{середнє } OD_{\text{ctrl}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}})$ ; якщо  $(\text{середнє } OD_{\text{тест}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}}) < 0$ , тоді  $PG=100 \times (\text{середнє } OD_{\text{тест}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}}) / \text{середнє } OD_{\text{tzero}}$  де: середнє  $OD_{\text{tzero}}$  = середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів безпосередньо перед дією на клітини сполуки, що тестується; середнє  $OD_{\text{тест}}$  = середня величина оптичних вимірювань густини SRB - похідних кольорів після 48 год. опромінення клітини тестованої сполуки; середнє  $OD_{\text{ctrl}}$  = середня величина оптичних вимірювань густини SRB- похідних кольорів після 48 год. без будь-якої дії на клітини сполуки, що тестується.

Джерела інформації:

1. Craig A. Almeida, Sheila A. Barry Cancer: Basic Science and Clinical Aspects. - John Wiley and Sons, 2009. – 405 с.
2. Baum M., Cuzick J., Forbes J., Houghton J., Howell A. (The ATAC Trialists Group): Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early stage breast cancer. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003, 98:1802-1810.
3. "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. 2008. Retrieved 2011-02-26. (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma, which are common but rarely fatal).
4. Hou N., Xu L.J. Synthesis and bacteriostatic activity of new thiosemicarbazone derivatives-aminomercaptotriazole Schiff bases // *Yaoxue Xuebao*. - 1992. - 27, № 10. - P. 738-742
5. Синтезы гетероциклических соединений. - Ереван, 1964, Вып. 6. - С. 42.
6. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Гідроброміди 3-алкіл-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину:



де R=H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>, CF<sub>3</sub>, що мають протипухлинну активність.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601