



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94833** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C07D 417/00
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

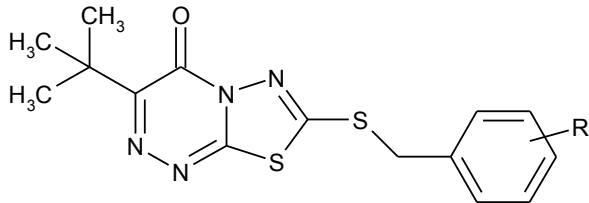
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| <p>(21) Номер заявки: u 2014 03356</p> <p>(22) Дата подання заявки: 02.04.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2014</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2014, Бюл.№ 23</p> | <p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олексійович (UA), Акименко Анна Олександрівна (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Кропив'янського, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)</p> <p>(74) Представник: Поприткіна Дурсунгазель Шамирадівна</p> |
|--|--|

(54) ЗАМІЩЕНІ 7-(БЕНЗИЛТІО)-3-ТРЕТ-БУТИЛ-4Н-[1,3,4]ТІАДІАЗОЛО[2,3-с][1,2,4]ТРИАЗИН-4-ОНИ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ

(57) Реферат:

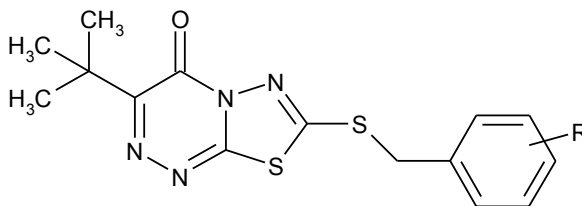
Заміщені 7-(бензилтіо)-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]триазин-4-они,



де R=3,4-(Cl)₂; 4-Cl,
що мають протипухлинну активність.

UA 94833 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 4H-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]триазин-4-ону загальної формули:



5 де R=3,4-(Cl)₂; 4-Cl,

що проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні дрібноклітинного раку легень.

Рак легень - це група злоякісних пухлин, що виникають з клітин, які вистилають бронхи або самі легені, і є серйозною медичною та соціальною проблемою та найбільш розповсюдженою причиною смертності від онкопатології в розвинених країнах світу. Для цих пухлин характерний швидкий ріст і раннє метастазування. Головною причиною розвитку раку легенів вважається тривале вдихання канцерогенів. Близько 90 % усіх випадків захворювань пов'язані з палінням та забрудненням атмосфери, що підтверджується високою частотою захворюваності в індустриальних районах з гірничодобувною та переробною промисловістю, порівняно з сільською місцевістю. До інших факторів ризику, що впливають на розвиток канцерогенезу легень відносять радіоактивне опромінення, застарілі хвороби легень (пневмонія, бронхіт, бронхоектатична хвороба, туберкульоз). Згідно даних міжнародної агенції з вивчення раку, кожного року в світі фіксується біля 1 млн. нових випадків раку легень, 60 % з яких гине від зазначеного захворювання [1].

20 На сучасному етапі для лікування пухлинної хвороби застосовують понад 40 протипухлинних препаратів, активних при різних формах злоякісних утворень. Широке застосування набули циклофосфан, метатрексат, вінкристин, адриабластин. Зазначені лікарські засоби мають необхідні лікувальні властивості, але проявляють значні побічні ефекти на систему кровотворення, ЦНС, репродуктивної, сечовидільної системи, тощо.

25 Відома сполука - похідне s-триазину (лікарський засіб алтретамін).

Алтретамін проявляє протипухлинну (цитостатичну) та імунодепресивну дію щодо раку яєчників, стійкого до алкілюючих та платиновмісних препаратів Він утворює ковалентні зв'язки з РНК і ДНК та перешкоджає включенню в ДНК тимідину, порушуючи життєдіяльність і блокуючи мітоз пухлинних клітин, сповільнює їх ріст і розвиток. Препарат швидко і достатньо повно всмоктується з ШКТ, легко проходить гістогематичні бар'єри, проникає в органи і тканини з високим вмістом ліпідів (головний мозок, підшкірна жирова клітковина, сальник) та інтенсивно деметилується в печінці до пентаметилмеламіну і тетраметилмеламіну. Виводиться він нирками протягом 24 годин у вигляді метаболітів [2].

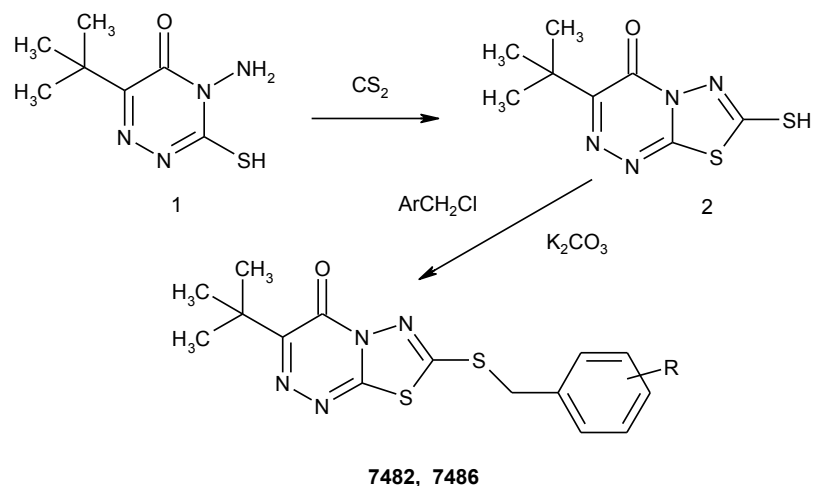
35 При застосуванні алтретаміну можуть розвиватися судомні напади, периферична нейропатія, лейкопенія, тромбоцитопенія, анемія, нудота, стоматит, виразки в порожнині рота і на губах, біль у животі, діарея, порушення функції печінки, порушення функції нирок, хворобливе і утруднене сечовипускання, аменорея, азооспермія, грипоподібний синдром, лихоманка, алергічні реакції. При тривалому застосуванні можливий розвиток вторинних злоякісних пухлин.

40 Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано зі створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин дрібноклітинного раку легень, зокрема клітин HOP-92 та NCI-H522.

45 Поставлена задача вирішується тим, що в якості нових хімічних речовин синтезовані заміщені 7-(бензилтіо)-3-трет-бутил-4H-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]триазин-4-они.

Заявлені заміщені 7-(бензилтіо)-3-трет-бутил-4H-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]триазин-4-они одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій (схема 1).



де 7482 R=3,4-(Cl)₂; 7486 4-Cl

Схема 1. Синтез заміщених 7-(бензилтіо)-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-онів.

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

Таблиця 1

Протипухлинна активність сполук 7482 та 7486 in vitro на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10⁻⁵ моль/л

| Лінії ракових клітин | Сполуки | |
|-----------------------------------|---------|--------|
| | 7482 | 7486 |
| Лейкемія | | |
| CCRF-CEM | 44,15 | 71,88 |
| HL-60(TB) | 68,06 | 74,76 |
| K-562 | 58,79 | 73,03 |
| MOLT-4 | 36,40 | 52,09 |
| RPMI-8226 | 37,65 | 61,40 |
| SR | 67,94 | 35,36 |
| Дрібноклітинний рак легень | | |
| A549/ATCC | 79,55 | 91,97 |
| EKVX | 72,27 | - |
| HOP-62 | 92,68 | 94,93 |
| HOP-92 | 38,88 | 78,12 |
| NCI-H226 | 43,21 | 60,32 |
| NCI-H23 | 61,89 | 75,72 |
| NCI-H322M | 66,02 | - |
| NCI-H460 | 55,22 | 101,25 |
| NCI-H522 | 37,55 | 65,25 |
| Рак товстого кишечника | | |
| COLO 205 | 55,43 | 74,87 |
| HCC-2998 | 64,40 | 84,71 |
| HCT-116 | 63,56 | 83,14 |
| HCT-15 | 68,18 | 89,12 |
| HT29 | 65,94 | 84,26 |
| KM12 | 87,67 | 87,05 |
| SW-620 | 48,08 | 93,35 |
| Рак кори головного мозку | | |
| SF-268 | 66,99 | 94,59 |
| SF-295 | 66,57 | - |
| SF-539 | 27,67 | 69,48 |
| SNB-19 | 69,10 | - |

| | | |
|---------------------|-------|--------|
| SNB-75 | 71,58 | 87,65 |
| U251 | 46,61 | 85,55 |
| Меланома | | |
| LOX IMVI | 67,82 | 74,75 |
| MALME-3M | 48,61 | - |
| M14 | 82,12 | 94,01 |
| MDA-MB-435 | 58,60 | 82,51 |
| SK-MEL-2 | | 75,24 |
| SK-MEL-28 | 76,38 | 95,72 |
| SK-MEL-5 | 80,62 | 74,97 |
| UACC-257 | 53,91 | 91,04 |
| UACC-62 | 81,66 | 90,56 |
| Рак яєчників | | |
| IGROV1 | 82,82 | - |
| OVCAR-3 | 76,36 | 86,75 |
| OVCAR-4 | 56,83 | 76,14 |
| OVCAR-5 | 82,84 | 80,69 |
| OVCAR-8 | 38,84 | 90,61 |
| NCI/ADR-RES | 55,31 | 73,55 |
| SK-OV-3 | 68,88 | 71,35 |
| Рак нирок | | |
| 786-0 | 76,93 | 94,34 |
| A498 | 47,56 | 61,84 |
| ACHN | 89,57 | 97,82 |
| CAKI-1 | 48,71 | 79,97 |
| RFX 393 | 65,14 | 78,65 |
| SN12C | 80,94 | 93,12 |
| TK-10 | 87,79 | 93,20 |
| UO-31 | 62,98 | |
| Рак простати | | |
| PC-3 | 62,51 | 75,85 |
| DU-145 | 95,34 | 104,27 |
| Рак молочної залози | | |
| MCF7 | 50,09 | 74,76 |
| MDA-MB-231/ATCC | 68,84 | 79,08 |
| HS 578T | 92,05 | 93,92 |
| BT-549 | 49,39 | 66,90 |
| T-47D | 50,97 | 53,33 |
| MDA-MB-468 | 58,39 | 71,84 |

Для визначення протипухлинної активності похідних 4H-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-ону 7482 та 7486 проведено *in vitro* дослідження на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстого кишечника, 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.

В умовах експерименту заявлені сполуки в концентрації 10^{-5} моль/л виявили здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл. 1). Сполука 7482 проявила високу ефективність відносно клітин раку дрібноклітинного раку легень HOP-92 та NCI-H522 (значення складає 38,88 та 37,55 відповідно). Крім того, сполука 7482 є ефективною відносно клітин лейкемії MOLT-4 і RPMI-8226 (значення складає 36,40 та 37,65 відповідно), клітин раку яєчників OVCAR-8 (38,84) та клітин раку кори головного мозку SF-539 (27,67). Також слід відмітити, що сполука 7482 є високоефективною відносно клітин лейкемії SR (значення складає 35,36).

Приклади конкретного виконання

7-Меркапто-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-он 2 був одержаний за методом [3] із 4-аміно-6-трет-бутил-3-меркапто-1,2,4-тріазин-5(4Н)-ону 1 з сірковуглецем у лужному середовищі.

5 Приклад 1. Синтез 7-[(3,4-дихлоробензил)тіо]-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]-тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-он 7482. До розчину 2.42 г. (0.01 моль) 7-меркапто-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-ону 2 в 40 мл сухого ДМФА додавали 2.76 г (0.02 моля) калій карбонату. Потім додавали 2.14 г (0.01 моль) 3,4-дихлоробензилхлориду. Нагрівали при перемішуванні на водяній бані 2 години. Охолоджували і виливали в 100 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою. Перекристалізовували з етанолу. Вихід - 3.25 г (81 %), $T_{пл}=119-21$ °С. Знайдено, %: N 13.7, Cl 17.6, C, $5H_{14}Cl_2N_4OS_2$. Обчислено, %: N 13.9, Cl 17.7. ЯМР 1H (δ, м.ч.): 1.40 (с, 9H, C(CH₃)₃), 4.61 (с, 2H, CH₂), 7.52-7.83 (м, 3H, C₆H₃).

10 Приклад 2. Синтез 7-[(4-хлоробензил)тіо]-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло-[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-ону 7486 був одержаний аналогічно прикладу 1 із 2.42 г. (0.01 моль) 7-меркапто-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-ону 2 та 1.61 г (0.01 моль) 4-хлоробензилхлориду. Вихід - 2.85 г (78 %), $T_{пл}=143-5$ °С. Знайдено, %: N 15.1, Cl 9.49, C, $15H_{15}ClN_4OS_2$. Обчислено, %: N 15.3, Cl 9.66. ЯМР 1H (δ, м.ч.): 1.39 (с, 9H, C(CH₃)₃), 4.61 (с, 2H, CH₂), 7.42 та 7.56 (д-д, 4H, C₆H₄).

Визначення цитотоксичного ефекту *in vitro*. Основною метою досліджень *in vitro* є оцінка прямого цитотоксичного ефекту потенційних протипухлинних сполук та виявлення можливої диференційної чутливості пухлинних клітин людини різного генезу до сполук, що вивчаються. Експеримент *in vitro* проводили на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстого кишечника, ЦНС, меланоми, яєчників, нирок, простати, молочної залози), при цьому сполуки використовували в концентрації 10^{-5} моль/л та визначали мітотичну активність сполук за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності нових потенційних біологічно активних сполук [4]. 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 сполуки, що тестується. Зазначений відсоток обчислюється за однією із наступних формул:

якщо (середня $OD_{тест}$ - середня OD_{tzero}) > 0, тоді

$$PG = 100 \times (\text{середнє } OD_{тест} - \text{середнє } OD_{tzero}) / (\text{середнє } OD_{ctrl} - \text{середнє } OD_{tzero});$$

якщо (середнє $OD_{тест}$ - середнє OD_{tzero}) < 0, тоді

35 $PG = 100 \times (\text{середнє } OD_{тест} - \text{середнє } OD_{tzero}) / \text{середнє } OD_{tzero},$

де: середнє OD_{tzero} - середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів безпосередньо перед дією на клітини сполуки, що тестується;

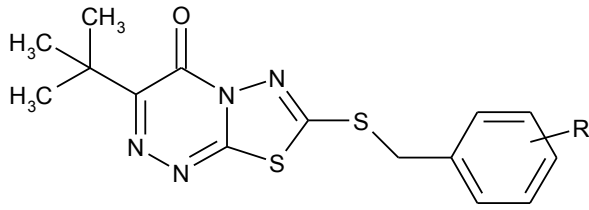
середнє $OD_{тест}$ - середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів після 48 год. опромінення клітини тестованої сполуки; середнє OD_{ctrl} - середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів після 48 год. без будь-якої дії на клітини сполуки, що тестується.

Джерела інформації:

1. В.А. Нидюлин, Б.В. Эрдниева. Об эпидемиологии рака легких// Медицинский вестник Башкортостана: обзорная статья. - Башкирский государственный медицинский университет, 45 2009. - Т. 4. - № 1. - С. 66-71.
2. Damia G, D'Incalci M. Clinical pharmacokinetics of altretamine// Clinical pharmacokinetics. - 1995. - Vol. 28. - P. 439-448.
3. Domow A., Marx P. Zur Darstellung von [1.2.4]Thiadiazolo[2.3-c]-as-triazinen.-1964. - P.2640-2653.
4. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55 Заміщені 7-(бензилтіо)-3-трет-бутил-4Н-[1,3,4]тіадіазоло[2,3-с][1,2,4]тріазин-4-они,



де R=3,4-(Cl)₂; 4-Cl,
що мають протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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