



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116426** (13) **C2**
(51) МПК (2018.01)

C07D 417/04 (2006.01)

A61K 31/33 (2006.01)

A61P 35/00

C07D 513/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2017 01465</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.02.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.03.2018</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.07.2017, Бюл.№ 14</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.03.2018, Бюл.№ 5</p>	<p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олексійович (UA), Демченко Діана Анатоліївна (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ЧЕРНІГІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ Т.Г. ШЕВЧЕНКА, вул. Гетьмана Полуботка, 53, м. Чернігів, 14013 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: PubChem, код сполуки ChEMBL1316568, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16032892 PubChem, код сполуки MolPort - 003-135-360 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16832799 PubChem, код сполуки F2560-0158, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26842753 CN 106243130 A, 01.08.2016, формула винаходу, пп.1, 9,10 М. А. Ирадян и др.. «3,6-диарил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-<i>b</i>][1,3,4]тиадиазины», Химический журнал Армении, 65, №4, 2012, стор.511-512, абзац 1, спол. 1-23 О. Є. Ядловський та ін.. «Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацил-3Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-<i>b</i>][1,3,4]тиадиазину», Медична та клінічна хімія, 2015, т.17, №2, стор.34, рис., стор.36, табл.. UA а201610824 С2, 28.10.2016, стор.1, абз.1, формула винаходу А.М. Демченко и др.. «Синтез и свойства этил 6-арил-3-метил-6,7-дигидро-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-<i>b</i>]-[1,3,4]тиадиазин-7-карбоксилата», Журнал органічної та фармацевтичної хімії, 2007, т.5, №3(19), стор. 42, схема, спол. 5-6 JP 2011-37725 А, 24.02.2011, формула винаходу</p>
--	--

(54) **3-(4¹-МЕТОКСИФЕНІЛ)-6-(4²-ФЛУОРОФЕНІЛ)-5,7-ДІ-*R*-АЦИЛ-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИНИ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ, ЗОКРЕМА ЩОДО ЛІНІЙ КЛІТИН РАКУ КИШЕЧНИКУ**

(57) Реферат:

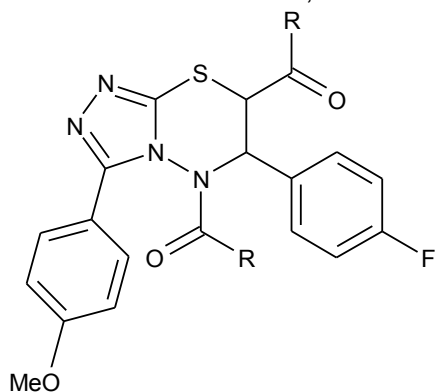
3-(4¹-Метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-*R*-ацил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазины, що мають протипухлинні властивості, зокрема щодо ліній раку кишечника. Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини. Заявлені сполуки можуть бути використані при

UA 116426 C2

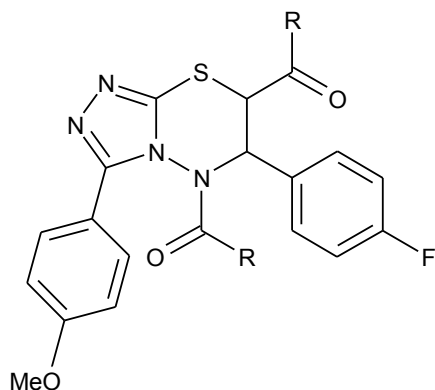
лікуванні раку товстого кишечника, а також лейкемії, меланоми, пухлин головного мозку, раку яєчників, дрібноклітинного раку легень, раку молочної залози, раку простати та раку нирок.

Визначення протипухлинної активності 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів, що мають протипухлинну активність проведено *in vitro* на 60 лініях ракових клітин при дії речовини в концентрації 10⁻⁵ моль/л за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності, виконаних в Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program.

Так, сполука DAM0010508 щодо ліній клітин раку кишечника HCT-15 затримує ріст пухлини вище стандарту на 87,36 %, а клітин HCC-2998 - на 67,85 %. Відносно лінії COLO 205 відмічається знищення ракової пухлини на 65,85 %. Для клітин меланоми, лейкемії, дрібноклітинного раку легень, пухлин кори головного мозку, яєчників, простати, молочної залози та нирок затримка росту клітин вище стандарту на 94,15-16,71 %. Сполука DAM0010509 щодо ліній клітин раку кишечника HCT-116 затримує ріст пухлини вище стандарту на 70,38 %, а клітин HCC-2998 - на 19,67 %.



Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 5H-[1,2,4]триазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазину загальної формули:



де R=CH₃, CH₂CH₃,

5 що проявляють протипухлинну активність та можуть бути використані при лікуванні пухлин кишечника.

Злоякісні пухлини товстого кишечника та прямої кишки у людини виникають в епітеліальних клітинах, які вистеляють внутрішню поверхню товстої та прямої кишок. Це одна з найпоширеніших злоякісних пухлин, що займає 3 місце після раку легень, простати або раку
10 молочної залози в залежності від статі хворого. В Україні захворюваність становить \approx 37 нових випадків на 100 тис. населення на рік. В Європі захворюваність у чоловіків складає від 60,3 (Чехія) до 17,4 (Греція) випадків на 100 тис. населення на рік, а в жінок від 35 (Угорщина) до 14 (Греція) відповідно [1].

Рак кишечника може виникати як спадкова, спорадична або фамільна форма, кожна з яких
15 має певні особливості. При спадковій формі спостерігається у хворих молодого віку, у родичів яких було діагностовано рак кишечника. Спорадичний колоректальний рак діагностується за відсутності даних в сімейному анамнезі, часто уражає пацієнтів старших 60 років та являє собою ізольовану пухлину товстої або прямої кишок. Фамільна форма діагностується, якщо пацієнт має члена родини першого ступеня спорідненості віком менше 50 років з діагнозом коло
20 ректального раку. Вважається, що ризик розвитку раку кишечника в такому разі зростає в два рази.

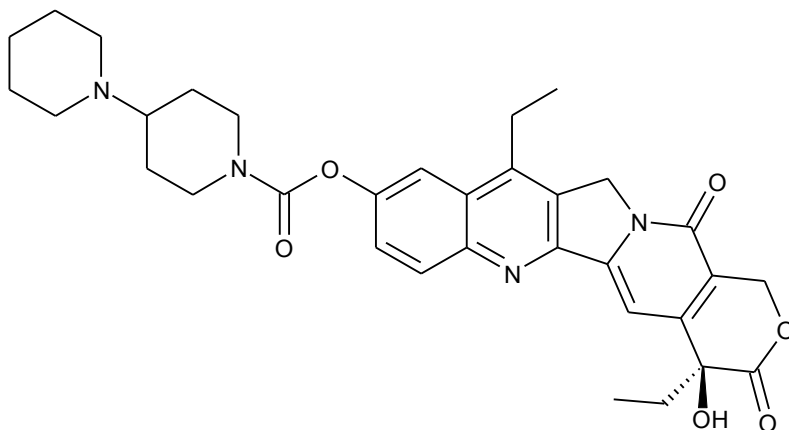
Злоякісні пухлини кишечника найчастіше виникають в результаті мутацій в генах сигнального шляху Wnt. Ці мутації можуть бути спадковими або спорадичними, та найчастіше
25 виникають в генах клітин інтерстиціальних крипт [2-3]. Одним з таких генів є ген APC, що кодує однойменний протеїн APC. Останній супресує акумуляцію протеїну β -катеніну, який є одним з центральних компонентів Wnt. Мутований APC не виконує свою функцію, що призводить до акумуляції β -катеніну та міграції останнього до ядра клітини. В ядрі відбувається зв'язування β -катеніну з ДНК та активація транскрипції генів, що за нормальних умов регулюють відновлення та диференціацію стовбурових клітин. Однак, в зазначених умовах відбувається розвиток раку.
30 Також описані мутації в інших генах-супресорах β -катеніну: AXIN1, AXIN2, TCF7L2, NKD1 [4].

Лікування КРР може бути хірургічним, хіміотерапевтичним, променевим або паліативним [5]. Хіміотерапія може проводитись до операції (неoad'ювантна) або після (ад'ювантна). Показаннями до проведення хіміотерапії є наявність метастазів коло ректального раку, що не можуть бути видалені хірургічним шляхом або з метою зменшення маси пухлини.

35 Основними хімічними препаратами, що застосовуються для лікування КРР є фторурацил та його похідне капецитабін.

Під час лікування пухлин кишечника хіміотерапією виникають побічні ефекти, серед яких найпоширенішими є розвиток стоматиту, діареї, запорів, блювоти, підвищеної сонливості, астенії, стомлюваності і долонно-підшовового синдрому.

40 Відома також сполука, похідне конденсованих гетероциклів (лікарський засіб іринотекан) формули:



Іринотекан, що продається під торговою маркою Camptosar, використовується для лікування раку кишечника і дрібноклітинного раку легень. Для лікування раку кишечника використовується або самостійно, або з фторурацилом [6].

5 Іринотекан зв'язується з комплексом топоізомерази I-ДНК. Вважають, що цитотоксичність іринотекану обумовлена пошкодженням подвоєною нитки ДНК, що утворюється в процесі її синтезу. При цьому ферменти, що беруть участь в реплікації, взаємодіють з потрійним комплексом, сформованим іринотеканом, топоізомеразою I і ДНК.

10 При застосуванні іринотекану часто можуть виникати такі побічні ефекти, як пронос, блювота, пригнічення роботи кісткового мозку, згущення крові, запалення кишечника, випадання волосся, задуха і лихоманка та алергічні реакції.

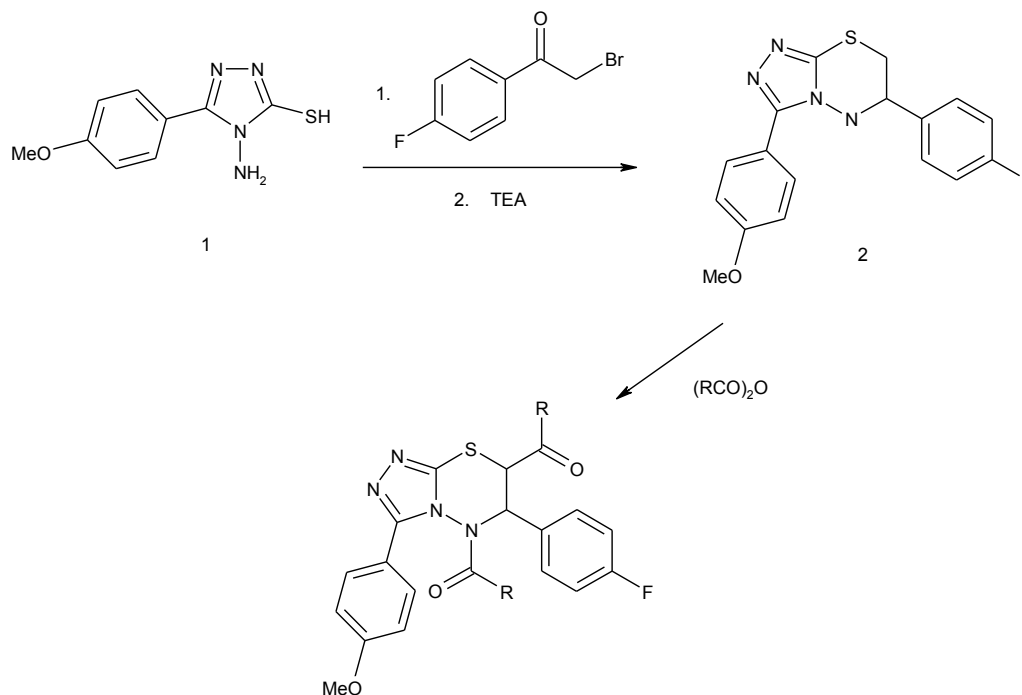
Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано із створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів.

15 В основу винаходу поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст ракових клітин товстого кишечника, молочної залози, лейкемії, раку легень, меланоми, раку яєчників, раку нирок та раку простати.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові хімічні речовини синтезовані 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазини (DAM0010508 та DAM0010509).

20 Заявлені сполуки отримували за загальною схемою 1 кип'ятінням в відповідному ангідриді 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 2. Останній було синтезовано при конденсації 4-аміно-5-(4-метоксифеніл)-4H-[1,2,4]триазол-3-тіолу 1 [7] з 4-флуорофенацил-бромідом та подальшою обробкою проміжних гідробромідів триетиламіном.

25 Схema 1. Синтез 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів (DAM0010508 та DAM0010509).



де DAM0010508 R=CH₃, DAM0010509 R=CH₃CH₂.

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

5 Приклади конкретного виконання.

4-Аміно-5-(4-метоксифеніл)-4H-[1,2,4]триазол-3-тіол 1 було одержано за методом [7] з гідразиду 4-метоксибензойної кислоти, CS₂ та гідазину.

10 Приклад 1. Синтез 5,7-діацетил-3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину (DAM0010508): суміш 2.22 г 4-аміно-5-(4-метоксифеніл)-4H-[1,2,4]триазол-3-тіолу 1 та 2.17 г α-бромо-4-флуороацетофенону кип'ятили в 60 мл етанолу протягом 4 годин з оберненим холодильником. Після охолодження в реакційну суміш додавали 1 мл триетиламіну, а через 15 хвилин виливали в 200 мл води. Отриманий осад 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 2 відфільтровували, висушували та використовували без додаткового очищення та ідентифікації.

15 1.70 г (0.005 моля) 3-(4¹-Метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 2 кип'ятили в 10 мл оцтового ангідриду протягом 3 годин з оберненим холодильником. Реакційну суміш охолоджували і виливали в воду. Продукт відфільтровували та перекристалізували із ізопропанолу. Вихід 1.76 г (83 %). T_{пл.} -155-157 °C. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. ч. (DMCO): 2.34 (с, 3H, CH₃), 2.65 (с, 3H, CH₃), 3.87 (с, 3H, OCH₃), 7.13 та 8.43 (д-д, 4H, C₆H₄), 7.22 та 7.76 (д-д, 4H, C₆H₄). Знайдено, %: N-13.1; S-7.64. C₂₁H₁₇N₄O₃S. Вирахувано, %: N-13.2; S-7.55.

25 Приклад 2. Синтез 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-дипропіоніл-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину (DAM0010509) здійснено аналогічно прикладу 1 з 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 2 та ангідриду пропанової кислоти. Вихід 77 %. T_{пл.}=150-152 °C (з пропанолу-2). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. ч. (DMSO-d₆): 1.12 (т, 3H, CH₃), 1.23 (т, 3H, CH₃), 2.64 (к, 2H, CH₂), 3.12 (к, 2H, CH₂), 3.87 (с, 3H, OCH₃), 7.12 та 8.42 (д-д, 4H, C₆H₄), 7.21 та 7.75 (д-д, 4H, C₆H₄). Знайдено, %: N-12.3; S-7.16. C₂₃H₂₁N₄O₃S. Вирахувано, %: N-12.4; S-7.09.

30 Приклад 3. Для визначення протипухлинної активності 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів (DAM0010508 та DAM0010509) дослідження проведено in vitro 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 [8] оцінки мітотичної активності нових потенційних біологічно активних сполук методом флуоресцентного зафарбування (барвник - сульфородамін Б), виконаних у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program. Результат

35 проведених досліджень виражали у відсотках росту клітин раку у порівнянні з контролем - 5-

флуорурацилом. Наведені у таблиці значення показують на скільки досліджувані сполуки є більш ефективними у пригніченні росту ракових клітин у порівнянні з контролем.

5 Визначення проводили високочутливим флуорометричним 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 до контролю.

10 В умовах експерименту заявлені 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини (DAM0010508 та DAM0010509) в концентрації 10⁻⁵ моль/л виявили здатність пригнічувати ріст ракових клітин кишечника: COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM 12 та SW-620. Крім того було відмічено, що досліджувані сполуки також в певній мірі пригнічують ріст клітин практично всього спектр онкологічних захворювань людини (табл. 1).

Таблиця 1

Противухлинна активність 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів (DAM0010508 та DAM0010509) *in vitro* на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10⁻⁵ моль/л

Лінії ракових клітин	Сполука DAM001-0508	Сполука DAM0010509	
Рак кишечника	COLO 205	-65,84	101,23
	HCC-2998	32,15	80,33
	HCT-116	17,53	29,62
	HCT-15	12,64	39,21
	HT29	24,80	58,25
	KM12	20,46	31,50
	SW-620	-	50,11
Лейкемія	CCRF-CEM	5,85	17,76
	HL-60(TB)	8,89	97,78
	K-562	17,59	32,70
	MOLT-4	6,75	20,96
	RPMI-8226	20,80	38,38
SR	9,63	28,18	
Дрібноклітинний рак легень	A549/ATCC	33,21	56,99
	EKVX	-	63,00
	HOP-62	68,56	139,73
	HOP-92	63,99	96,31
	NCI-H226	55,60	78,13
	NCI-H23	29,02	56,14
	NCI-H322M	68,60	95,60
	NCI-H460	-	68,63
NCI-H522	76,93	87,13	
Рак головного мозку	SF-268	51,39	55,92
	SF-295	-	112,02
	SF-539	75,05	104,60
	SNB-19	-	103,09
	SNB-75	65,49	67,96
	U251	57,25	73,79
Меланома	LOX IMVI	19,55	34,90
	MALME-3M	83,29	87,23
	M14	40,95	77,23
	MDA-MB-435	17,06	48,35
	SK-MEL-2	61,19	106,79
	SK-MEL-28	48,29	85,57
	SK-MEL-5	45,19	77,66
	UACC-257	81,14	97,49
UACC-62	61,69	77,36	
Рак яєчників	IGROV1	46,23	60,15
	OVCAR-3	40,66	72,58
	OVCAR-4	63,08	68,49
	OVCAR-5	26,29	109,89
	OVCAR-8	38,58	43,41
	NCI/ADR-RES	42,96	72,44
SK-OV-3	74,15	99,62	

Продовження таблиці

Рак нирок	786-0	36,85	71,14
	A498	75,81	96,74
	ACHN	31,86	74,37
	CAKI-1	76,96	101,06
	RFX 393	60,75	89,98
	SN12C	43,89	66,39
	TK-10	103,94	134,21
	UO-31	32,98	55,61
Рак простати	PC-3	22,54	36,40
	DU-145	67,66	77,93
Рак молочної залози	MCF7	28,82	55,08
	MDA-MB-231/ATCC	14,44	33,62
	HS 578T	80,14	121,05
	BT-549	34,82	73,38
	T-47D	16,75	67,43
	MDA-MB-468	78,68	88,61

Відповідно до наведеної таблиці 1, досліджувані 3-(4¹-метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]гіадіазини (DAM0010508 та DAM0010509), відносно клітин раку товстого кишечника, лейкемії, меланоми, дрібноклітинного раку легенів, пухлин головного мозку, яєчників, простати, молочної залози та нирок виявили переважно більш високу протипухлинну активність, ніж препарат порівняння - 5-флуороурацил.

Так, сполука DAM0010508 щодо ліній клітин раку кишечника затримує ріст пухлин вище стандарту на 87,36 (HCT-15) - 67,85 (HCC-2998) %. Відносно лінії COLO 205 відмічається знищення ракової пухлини на 65,85 %. Для клітин лейкемії затримка росту клітин вище стандарту на 94,15-79,20 %, дрібноклітинного раку легенів - на 70,98-31,40 %, клітин раку головного мозку - на 48,61-24,95 %, клітин меланоми на 82,94-16,71 %, клітин раку яєчників - на 73,7146-25,85 %, клітин раку нирок ACHN на 68,14 %, клітин раку простати PC-3 на 77,46 %. Відносно клітин раку молочної залози заявлена сполука зупиняє ріст і поділ клітин на 85,56-19,86 %. Сполука DAM0010509 щодо ліній клітин раку кишечника затримує ріст пухлин вище стандарту на 70,38 (HCT-116) - 19,67 (HCC-2998) %. Для лейкемії затримка росту клітин вище стандарту до 82,24 %, дрібноклітинного раку легенів - на 70,98-31,40 %, клітин раку головного мозку A549/ATCC на 43,01 %, клітин меланоми LOX IMVI на 65,10 %, клітин раку яєчників OVCAR-8 на 56,59 %, клітин раку нирок UO-31 на 44,39 %, клітин раку простати PC-3 на 63,60 %. Відносно клітин раку молочної залози MDA-MB-231/ATCC заявлена сполука зупиняє ріст і поділ клітин на 66,38 %.

Таким чином, запропоновані нові біологічно активні сполуки, які можуть бути потенційними протипухлинними засобами, зокрема щодо лікування раку кишечника.

Джерела інформації:

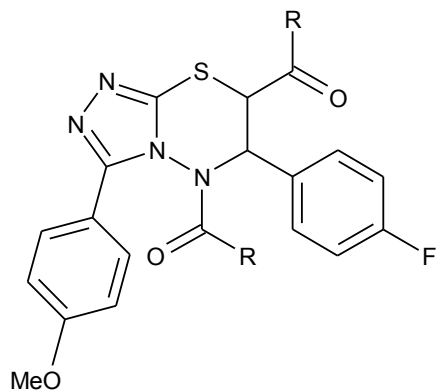
1. С.М. Ткач, А.Ю. Иоффе (червень). Колоректальний рак: поширеність, головні чинники ризику та сучасні підходи до профілактики // Український терапевтичний журнал. 2005. - № 2. - С. 83-88.
2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis // Nature. 2004. - Vol. 363 (6429). - P. 558-561.
3. Srikumar Chakravarthi, Baba Krishnan, Malathy Madhavan (1999). Apoptosis and expression of p53 in colorectal neoplasms // Indian J Med Res. 1999. - Vol. 86(7). - P. 95-102.
4. Markowitz SD, Bertagnolli MM (December 2009). Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. N. // Engl. J. Med. 2009. - Vol. 361 (25). - P. 2449-2460.
5. Stein A, Atanackovic, D, Bokemeyer, C Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer // European journal of cancer. 2011. - Vol. 47. - P. 312-314.
6. "Irinotecan Hydrochloride". The American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved. 8 December 2016.
7. Chhabria, Mahesh T.; Suhagia, Bhanubhai N.; Brahmksatriya, Pathik S.; Raval, Priyasha M. Synthesis and antihyperlipidemic activity of some novel 4-(substitutedamino)-5-substituted-3-mercapto-(4H)-l, 2,4-triazoles // Arznei-mittel-Forschung Drug Research, 2011. - Vol. 61, № 8. -P. 452-457.

8. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical // Medical. 2004. - Vol. 1. - P. 450.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

3-(4¹-Метоксифеніл)-6-(4²-флуорофеніл)-5,7-ді-R-ацил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини:



де R=CH₃, CH₂CH₃,

що мають протипухлинні властивості, зокрема щодо ліній клітин раку кишечника.

10

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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