



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89528** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C07D 417/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2013 13198</p> <p>(22) Дата подання заявки: 13.11.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2014</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2014, Бюл.№ 8</p>	<p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олексійович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Гриневич Олександр Йосипович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): 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)</p>
---	---

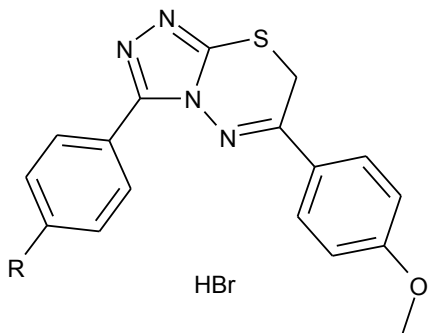
(54) ГІДРОБРОМІДИ 3-АРИЛ-6-(4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-7Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-Ь][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ

(57) Реферат:

Гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][1,3,4]тіадіазину загальної формули, де R: Н; ОСН₃, що мають протипухлинну активність.

UA 89528 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину загальної формули:



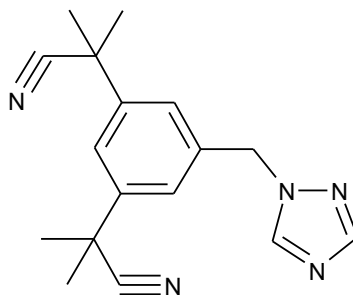
5

де R=H, CH₃O,

що проявляють протипухлинну активність та можуть бути використані при лікуванні пухлини молочної залози, лейкемії, дрібноклітинного раку легень, раку яєчників та раку нирок.

10 На сучасному етапі для лікування пухлинної хвороби застосовують понад 40 протипухлинних препаратів, активних при різних формах злоякісних утворень, які призводять до зменшення пухлини і, відповідно, до клінічної ремісії. Протипухлинні препарати з різними механізмами дії застосовують у схемах лікування. При цьому виражений клінічний ефект складає від 20 % до 80 %. В окремих випадках ремісія відбувається до 2 років, а понад 10 % хворих мають ремісію понад 3 роки. Широке застосування набули циклофосфан, метатрексат, 15 вінкрисдин, адриабластин. Зазначені лікарські засоби мають необхідні лікувальні властивості, але проявляють значні побічні ефекти на систему кровотворення, (викликаючи лейкопенію, анемію, тромбоцитопенію), ЦНС (почуття втоми, головокружіння, головний біль, афазія, сонливість, судоми), репродуктивної системи (порушення оогенезу та сперматогенезу, 20 олігоспермія, порушення менструального циклу, зниження лібідо, імпотенція), сечовидільної системи (гематурія, цистит, виражені порушення функції нирок), алергічні та дерматологічні реакції, тощо.

Відома також сполука - похідне 1,2,4-триазолу (лікарський засіб анастрозол) формули:



25

Анастрозол [1] проявляє активність проти естрогензалежних пухлин молочної залози у жінок. Він є селективним нестероїдним інгібітором ферменту ароматази, який призводить до 30 зниженню рівня естрадіолу в периферичних тканинах. Відомо [2], що захворювання на пухлини молочної залози в світі становлять понад 20 % від загальної кількості онкологічних захворювань.

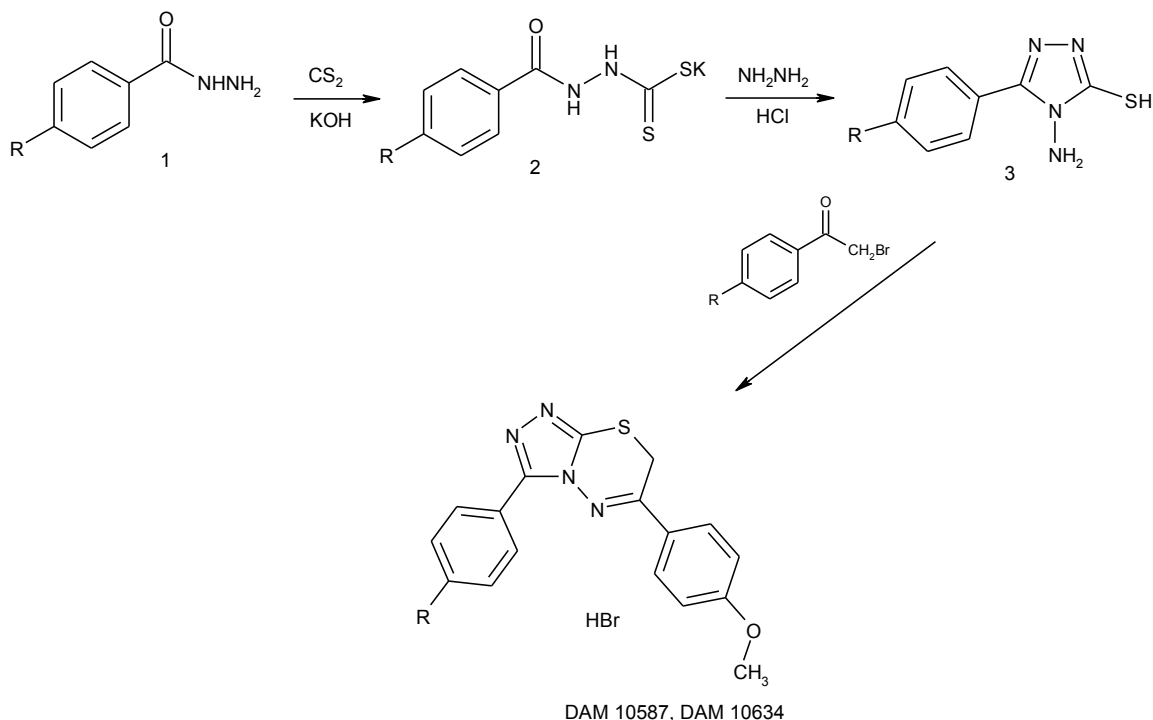
При застосуванні анастрозолу може розвиватися анемія, тромбофлебіт та лейкопенія, що є показаннями для відміни препарату.

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

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

40 Поставлена задача вирішується тим, що як нові хімічні речовини синтезовані гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину (DAM10587 та DAM10634).

Заявлені гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій за схемою:



5

де R: H (DAM10587); CH₃O (DAM10634).

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

10

Таблиця 1

Протипухлинна активність сполук DAM10587 та DAM10634 *in vitro* на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10⁻⁵ моль/л

Лінії ракових клітин	Сполука DAM10587	Сполука DAM10634
Рак молочної залози		
MCF7	24,66	17,79
MDA-MB-231/ATCC	16,16	46,46
HS 578T	32,64	20,68
BT-549	43,57	-
T-47D	-	44,45
MDA-MB-468	-5,87	-26,56
Лейкемія		
CCRF-CEM	13,42	16,31
HL-60(TB)	24,58	-33,65
K-562	14,21	9,24
MOLT-4	43,26	24,52
RPMI-8226	17,17	24,90
SR	-	8,42

Продовження таблиці 1

Лінії ракових клітин	Сполука DAM10587	Сполука DAM10634
Дрібноклітинний рак легень		
A549/ATCC	25,81	22,13
EKVX	38,88	53,75
HOP-62	36,57	29,60
HOP-92	-	55,63
NCI-H226	63,66	51,60
NCI-H23	41,79	-
NCI-H322M	56,18	76,03
NCI-H460	8,61	12,15
NCI-H522	-14,76	-32,13

Лінії ракових клітин	Сполука DAM10587	Сполука DAM10634
Рак товстої кишки		
COLO 205	-	-26,93
HCC-2998	8,65	-
HCT-116	9,50	-
HCT-15	23,74	-
HT29	0,26	2,78
KM12	6,16	11,09
SW-620	20,86	22,43
Рак кори головного мозку		
SF-268	33,96	36,23
SF-295	3,53	18,50
SF-539	5,27	-36,38
SNB-19	42,98	43,87
SNB-75	15,41	11,11
U251	28,99	21,99
Меланома		
LOX IMVI	42,89	-
MALME-3M	73,21	88,46
M14	14,15	-
MDA-MB-435	-26,52	-18,33
SK-MEL-28	46,42	58,09
SK-MEL-5	12,08	5,78
UACC-257	83,68	68,50
UACC-62	45,82	49,28
Рак яєчників		
IGROV1	33,37	29,40
OVCAR-3	-62,19	-46,72
OVCAR-4	44,88	42,67
OVCAR-5	39,45	42,44
OVCAR-8	30,94	30,41
NCI/ADR-RES	1,92	-
SK-OV-3	-	5,35
Рак нирок		
786-0	32,81	-
A498	3,11	42,61
ACHN	43,00	-
CAKI-1	37,44	39,33
RFX 393	-9,71	-33,64
SN12C	37,61	40,91
TK-10	41,69	25,00
UO-31	43,11	83,30

Лінії ракових клітин	Сполука DAM10587	Сполука DAM10634
Рак простати		
PC-3	16,40	30,25
DU-145	3,36	15,21

Для визначення протипухлинної активності похідних 7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину сполук DAM10587 та DAM10634 проведено *in vitro* дослідження 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. Як еталон для порівняння використовували 5-фторурацил та адриаміцин.

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 -5,87 % та -26,56 % для сполук DAM10587 і DAM10634 відповідно). Крім того, сполука DAM10587 є ефективною відносно клітин дрібноклітинного раку легень NCI-H522 (значення складає -14,76 %), клітин меланоми MDA-MB-435 (-26,52 %), клітин раку яєчників OVCAR-3 (-62,19 %) та клітин раку нирок RFX 393 (-9,71 %). Сполука DAM 10634 є ефективною відносно клітин лейкемії HL-60(TB) (значення складає -33,65 %), клітин дрібноклітинного раку легень NCI-H522 (-32,13 %), клітин раку товстої кишки COLO 205 (-26,93 %) клітин раку кори головного мозку SF-539 (-36,38 %), клітин меланоми MDA-MB-435 (-18,33 %), клітин раку яєчників OVCAR-3 (-46,72 %) та клітин раку нирок RFX 393 (-33,64 %). Від'ємні значення свідчать не лише про пригнічення росту і поділу клітин, а й про їх знищення.

Приклади конкретного виконання.

4-Аміно-5-арил-4H-[1,2,4]триазол-3-тіоли 3 було одержано за методом [3] взаємодією гідразиду бензойної кислоти або 4-метоксибензойної кислоти 1 з CS₂ в лужному середовищі та подальшою циклізацією проміжної солі 2 з гідразинном.

Приклад 1. Синтез гідроброміду 6-(4-метоксифеніл)-3-феніл-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину (DAM10587). До розчину 1,92 г (0,01 моль) 4-аміно-5-феніл-4H-[1,2,4]триазол-3-тіолу 3 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 діетиловим етером. Перекристалізували з етанолу. Вихід - 3,34 г (83 %), T_{пл}=206-208 °C. Знайдено, %: N 13.8, C₁₇H₁₅BrN₄O₂S. Розраховано, %: N 13.9. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 3.85 (с, 3H, OCH₃), 4.44 (с, 2H, CH₂), 7.15 та 8.05 (д-д, 4H, C₆H₄-пара), 7.58-8.02 (м, 5H, Ph).

Синтез гідроброміду 3,6-ди(4-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину (DAM10634) одержано аналогічно сполуки DAM10587 із 2,22 г (0,01 моль) 4-аміно-5-(4-метоксифеніл)-4H-[1,2,4]триазол-3-тіолу 3 та 2,29 г (0,01 моль) 4-метоксифенацилброміду. Вихід - 3,68 г (85 %), T_{пл}=221-223 °C. Знайдено, %: N 13.0, C₁₈H₁₇BrN₄O₂S. Розраховано %: N 12.8. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 3.84 (с, 6H, 2OCH₃), 4.42 (с, 2H, CH₂), 7.14 та 7.98 (д-д, 4H, C₆H₄-пара), 7.16 та 8.04 (д-д, 4H, C₆H₄-пара).

Приклад 2. Для визначення протипухлинної активності похідних 7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 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^{-5} моль/л та визначали мітотичну активність сполук за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності нових потенційних біологічно активних сполук [4]. Визначення проводили високочутливим флуориметричним 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 (середня $OD_{\text{тест}}$ - середня OD_{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 (середнє $OD_{\text{тест}}$ - середнє OD_{tzero}) < 0, тоді $PG=100 \times (\text{середнє } OD_{\text{тест}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}}) / \text{середнє } OD_{\text{tzero}}$,

де: середнє OD_{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_{ctrl} = середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів після 48 год. без будь-якої дії на клітини сполуки, що тестується.

10 Джерела інформації:

1. M. Baum, J. Cuzick, J. Forbes, J. Houghton, A. Howell (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.

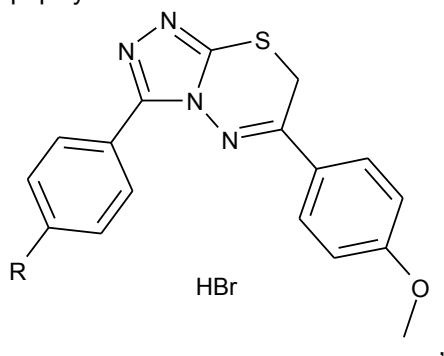
15 2. "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. 2008. Retrieved 2011-02-26. (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma, which are common but rarely fatal).

3. Синтезы гетероциклических соединений. - Ереван, 1964, Вып. 6. - С. 42.

20 4. Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25 Гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину загальної формули



де R: H; OCH₃,
що мають протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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