



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109814** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
C07D 513/04 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

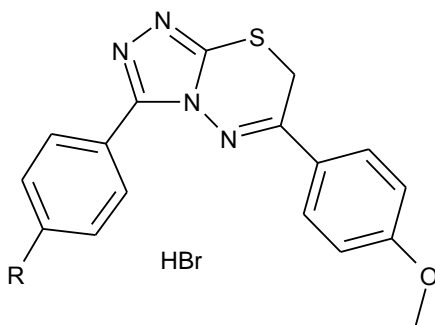
(21) Номер заявки:	а 2013 13197	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	13.11.2013	WO 2008/011045 A2, 24.01.2008 WO 2009/089027 A1, 16.07.2009
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	12.10.2015	El Dawy; Omar; Ismail; Hazzaa, Potential Broad Spectrum Anthelmintics IV: Desing, Synthesis, and Antiparasitic Screening of Certain 3,6-Disubstituted-(7H)-s-triazolo-[3,4-b][1,3,4]thiadiazine Derivatives, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1983, vol. 72, № 1 p. 45 – 50
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.05.2015, Бюл.№ 10	Skoumbourdis, Amanda P.; Huang, Ruili; Southall, Noel; Leister, William; Guo, Vicky; Cho, Ming-Hsuang; Inglese, James; Nirenberg, Marshall; Austin, Christopher P.; Xia, Menghang; Thomas, Craig J., Identification of a potent new chemotype for the selective inhibition of PDE4, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2008, vol. 18, № 4 p. 1297 – 1303
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.10.2015, Бюл.№ 19	Eweiss, N. F.; Bahajaj, A. A., Synthesis of Heterocycles. Part VII [1]. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some 7H-s-Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine and s-Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole Derivatives, Journal of Heterocyclic Chemistry, 1987, vol. 24, p. 1173 – 1182
(72) Винахідник(и):	Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олександрович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Гриневич Олександр Йосипович (UA)	Shaaban, Mohamed R; Fuchigami, Toshio, Electrolytic partial fluorination of organic compounds. Part 56: Highly regioselective anodic mono- and difluorination of s-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine derivatives, Tetrahedron Letters, 2002, vol. 43, № 2 p. 273 – 276
(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)	Ibrahim, Yehia A.; Al-Awadi, Nouria A.; John, Elizabeth, Pyrolytic desulfurization ring contraction of condensed thiadiazines as a general route towards pyrazoloazines and pyrazoloazoles with a bridgehead (ring junction) nitrogen atom, Tetrahedron, 2008, vol. 64, № 45 p. 10365 – 10374
(74) Представник:	Поприткіна Дурсунгазель Шамирадівна	

(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:**

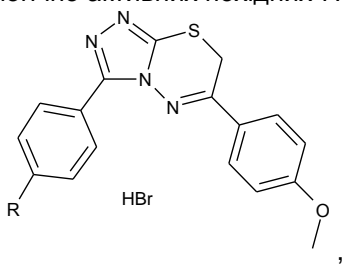
Гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][1,3,4]тіадіазину, що мають протипухлинну активність. Патент на винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][1,3,4]тіадіазину, що проявляють протипухлинну активність та можуть бути використані при лікуванні пухлини молочної залози. Визначення протипухлинної активності похідних 7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][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. Високу

UA 109814 C2

ефективність зазначені сполуки проявили відносно клітин раку молочної залози MDA-MB-468 (значення складає -5,87 % та -26,56 % для сполук, де арил є C_6H_5 (DAM10587), і $C_6H_4OCH_3$ -пара (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 DAM10634 є ефективною відносно клітин лейкемії HL-60 (ТВ) (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.



Винахід 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:

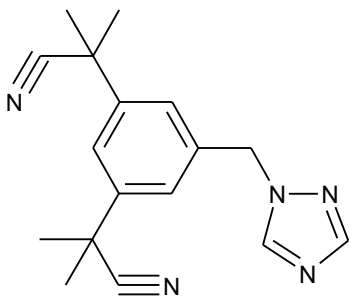


де R=H, CH₃O,

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

На сучасному етапі для лікування пухлинної хвороби застосовують понад 40 протипухлинних препаратів, активних при різних формах злякисних 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, вінкристин, 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, олігоспермія, порушення менструального циклу, зниження лібідо, імпотенція), сечовидільної системи (гематурія, цистит, виражені порушення функції нирок), алергічні та дерматологічні реакції, тощо.

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



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

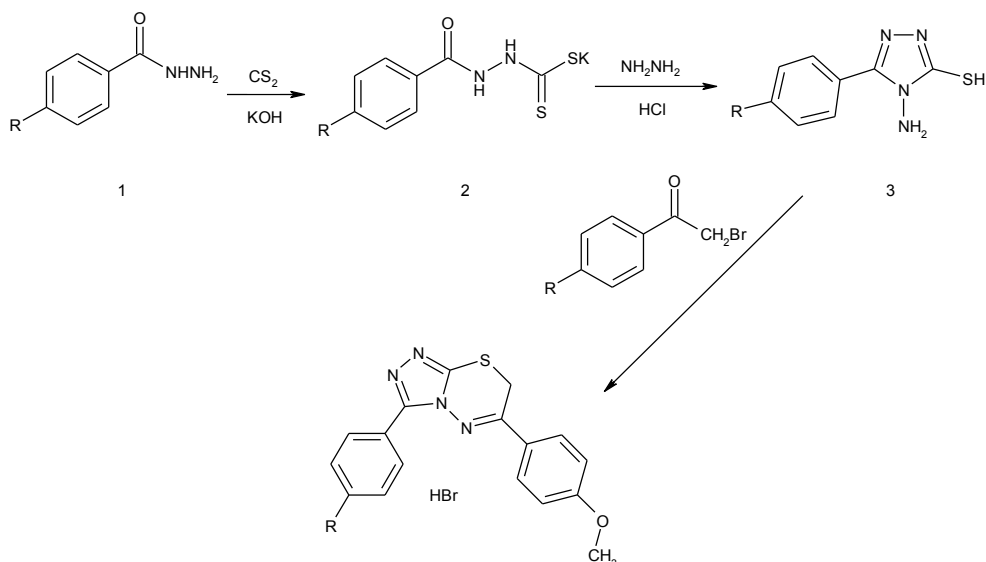
При застосуванні анастрозолу може розвиватися анемія, тромбоемболія та лейкопенія, що є показаннями для відміни препарату.

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

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

35 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 DAM 10634).

Заявлені гідроброміди 3-арил-6-(4-метоксифеніл)-7H-[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:



де R: H (DAM10587); CH₃O (DAM10634).

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

5

Таблиця

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
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
Рак товстої кишки		
COLO 205	-	-26,93
HCC-2998	8,65	-
HCT-116	9,50	-

Продовження таблиці

HCT-15	23,74	-
HT29	0,26	2,78
KM 12	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
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). 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 DAM10634 є ефективною відносно клітин лейкемії HL-60 (ТВ) (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-4Н-[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 гіdraзином.

Приклад 1

Синтез гідроброміду 6-(4-метоксифеніл)-3-феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину (DAM10587). До розчину 1,92 г (0,01 моль) 4-аміно-5-феніл-4Н-[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 °С. 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)-7Н-[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)-4Н-[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 °С. 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 7Н-[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 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 (середнє OD_{тест} - середнє OD_{тzero}) > 0, тоді PG=100 x (середнє OD_{тест} - середнє OD_{тzero}) / (середнє OD_{ctrl} - середнє OD_{тzero}); Якщо (середнє OD_{тест} ~ середнє OD_{тzero}) < 0, тоді PG=100 x (середнє OD_{тест} - середнє OD_{тzero}) / середнє OD_{тzero},

де: середнє OD_{тzero} = 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. 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.

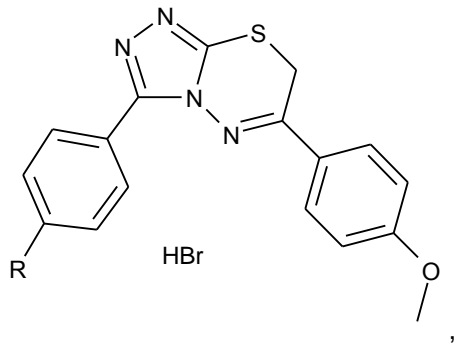
2. "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. 2008. Retrieved 2011-02-26. (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma, which are common but rarely fatal).

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

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

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



- 5 де R - H; OCH₃,
що мають протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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