



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116952** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 417/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 13256</p> <p>(22) Дата подання заявки: 26.12.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.06.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.06.2017, Бюл.№ 11</p>	<p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Янченко Віктор Олександрович (UA), Демченко Діана Анатолійовна (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>
--	---

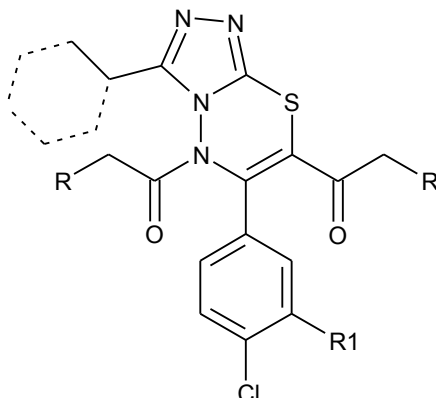
(54) **5,7-ДІАЦИЛ-3-ЕТИЛ(ЦИКЛОГЕКСИЛ)-6-(4-ХЛОРО-3-R-ФЕНІЛ)-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-b][1,3,4]ТІАДІАЗИНИ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ**

(57) Реферат:

5,7-Діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазини, де R=H, CH₂CH₃, R₁=H, Cl, що мають протипухлинну активність.

UA 116952 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів формули:



5

де $R = H, CH_2CH_3$, $R_1 = H, Cl$,

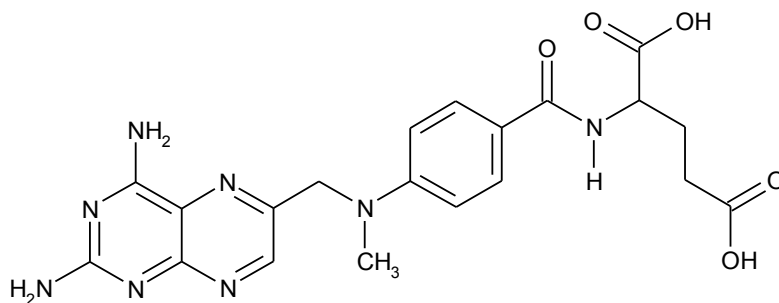
що проявляють протипухлинну активність та можуть бути використані при лікуванні лейкемії.

10 На сучасному етапі для лікування різних видів лейкемії часто застосовують хімотерапію, яка складається, як правило, з комбінації лікарських препаратів, що перешкоджає виникненню резистентності ракових клітин до якогось певного препарату. Інші лікарські препарати, що застосовуються для лікування лейкемії, можуть запобігти виникненню інфекційних захворювань і допомагають організму продукувати нові клітини крові.

15 Для лікування різних видів лейкозу застосовують преднізон, вінкрістин, даунорубіцин, L-аспарагіназу, імаїніб метотрексат, циклофосфамід, ідарубіцин, цитозин арабінозу, мітоксантрон та інші препарати.

Під час лікування лейкемії хімотерапією виникають побічні ефекти, серед яких найпоширенішими і найбільш неприємними є нудота і блювота, а також порушення роботи систем організму.

20 Відома також сполука, похідне біциклічних конденсованих гетероциклів (лікарський засіб метотрексат) формули:



25 Метотрексат - протилейкозний цитостатичний препарат з групи антиметаболітів, антагоністів фолієвої кислоти. Має виражену імуносупресивну дію навіть у відносно низьких дозах, і не володіє помітною гематологічною токсичністю. Завдяки цьому метотрексат ширше, ніж інші цитостатики з імуносупресивною активністю, застосовується як пригнічуючий імунітет препарат [1-6].

30 Метотрексат пригнічує дигідрофолатредуктазу (ДГФ), що перетворює дигідрофолієву кислоту в тетрагідрофолієву, яка є донором карбону в синтезі пуринових нуклеотидів. Крім цього в клітині метотрексат піддається поліглутамінуванню з утворенням метаболітів, що інгібують дію не тільки ДГФ, але і інших фолатзалежних ферментів.

35 При застосуванні метотрексату часто можуть виникати виразковий стоматит, анорексія, некроз печінки, цироз, жирова атрофія, лейкопенія, анемія, тромбоцитопенія, головний біль, судоми, порушення оогенезу і сперматогенезу, імпотенція, цистит, виражені порушення функції нирок, кропив'янка, порушення пігментації, фурункульоз.

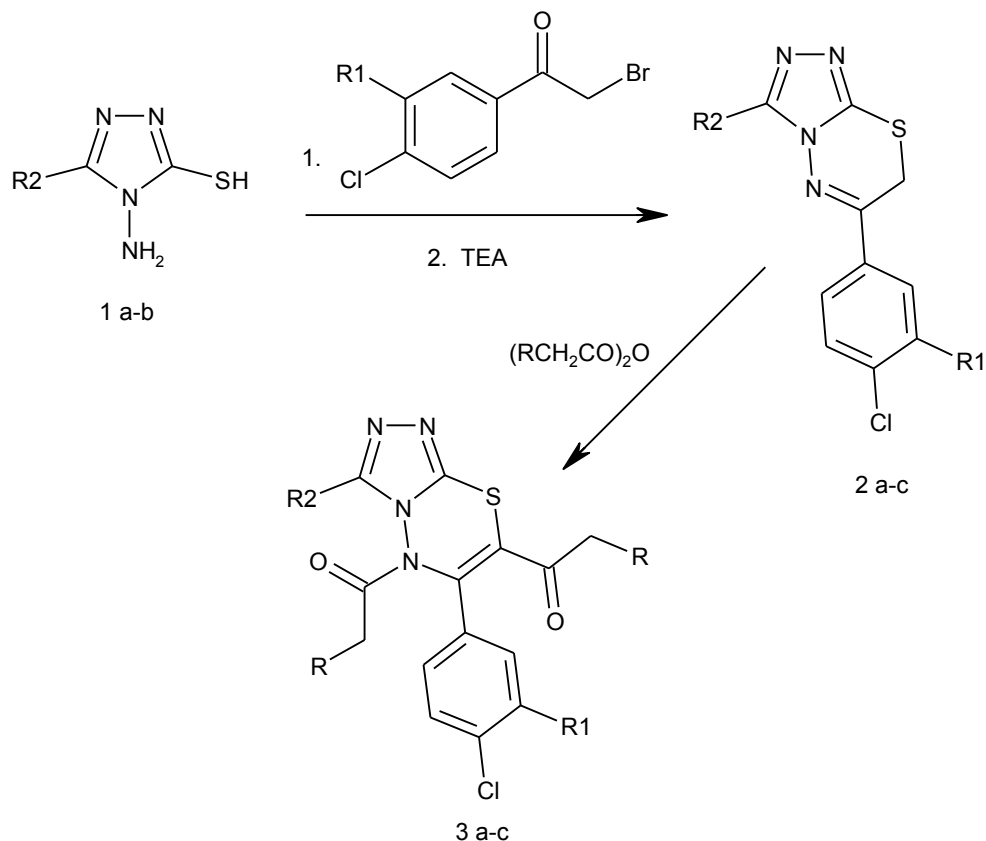
Підвищення ефективності хімотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано із створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст ракових клітин лейкемії: CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові хімічні речовини синтезовано 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-*R*-феніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини (3а-с).

Заявлені сполуки (3а-с) одержують з високим виходом при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій (схема 1).

Схема 1. Синтез 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-*R*-феніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів 3а-с.



де 3а $R = R_2 = CH_2CH_3$, $R_1 = H$; 3b $R = H$, $R_1 = Cl$, $R_2 = CH_2CH_3$;

3с $R = R_1 = H$, $R_2 = \text{цикло-}C_6H_{11}$.

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

Приклади конкретного виконання.

4-Аміно-5-етил-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіол 1а був одержаний за методом [7] взаємодії тіокарбогідразиду з пропаною кислотою. 4-Аміно-5-циклогексил-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіол 1б було одержано за методом [8] з гідрозиду циклогексилкарбонової кислоти, CS_2 та гідрозину.

Заміщені 7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазини 2а-с були синтезовані за методом [9] та використані без додаткового очищення та ідентифікації.

Приклад 1. Синтез 5,7-дибутироніл-3-етил-6-(4-хлорофеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину 3а: 2,09 г (0,005 моля) 3-етил-6-(4-хлорофеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину 2а кип'ятили в 10 мл ангідриду бутанової кислоти протягом 3 годин з оберненим холодильником. Реакційну суміш охолоджували і виливали в воду. Продукт відфільтровували та перекристалізовували із ізопропанолу. Вихід 77 %. $T_{пл.} = 86-7^\circ C$. Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч. (DMSO- d_6): 0,86 (т, 3H, CH_3), 0,95 (т, 3H, CH_3), 1,41 (т, 3H, CH_3), 1,55 (м, 2H, CH_2), 1,67 (м, 2H, CH_2), 2,60 (т, 2H, CH_2), 2,97 (т, 2H, CH_2), 3,09 (к, 2H, CH_2), 7,56 і 7,70 (д-д, 4H, C_6H_4). Знайдено, %: N 13,2; S 7,51. $C_{20}H_{23}ClN_4O_2S$. Вирахувано, %: N 13,4; S 7,65.

Приклад 2. Синтез 5,7-діацетил-3-етил-6-(3,4-дихлорофеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину 3б був одержаний аналогічно прикладу 1 з 3-етил-6-(3,4-дихлорофеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину 2б та оцтового ангідриду. Вихід 87 %. $T_{пл.} = 113-4^\circ C$.

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч. (DMSO- d_6): 1,42 (т, 3H, CH_3), 3,09 (к, 2H, CH_2), 2,35 (с, 3H, NCOCH_3), 2,57 (с, 3H, CCOCH_3), 7,76-7,91 (м, 3H, C_6H_3). Знайдено, %: N 14,3; S 8,26. $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$. Вирахувано, %: N 14,1; S 8,05.

Приклад 3. Синтез 5,7-діацетил-3-циклогексил-6-(4-хлорофеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 3с був одержаний аналогічно прикладу 1 з 3-циклогексил-6-(4-хлорофеніл)-7H-[1,2,4,]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину 2с та оцтового ангідриду. Вихід 81 %. $T_{\text{пл.}} = 163-4$ °C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч. (DMSO- d_6): 1,28-2,21 (м, 10H, $(\text{CH}_2)_5$), 2,33 (с, 3H, NCOCH_3), 2,56 (с, 3H, CCOCH_3), 3,21 (м, 1H, CH), 7,56 і 7,72 (д-д, 4H, C_6H_4). Знайдено, %: N 13,5; S 7,81. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$. Вирахувано, %: N 13,4; S 7,67.

Приклад 4. Для визначення протипухлинної активності 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазинів (3а-с). 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 [10] 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 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.

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 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, який обчислюється за однією із наступних формул:

Якщо (середня $\text{OD}_{\text{тест}}$ - середня OD_{tzero}) > 0, тоді

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

Якщо (середнє $\text{OD}_{\text{тест}}$ - середнє OD_{tzero}) < 0, тоді

$$\text{PG} = 100 \times (\text{середнє } \text{OD}_{\text{тест}} - \text{середнє } \text{OD}_{\text{tzero}}) / \text{середнє } \text{OD}_{\text{tzero}}$$

де:

середнє OD_{tzero} = середня величина оптичних вимірювань густини SRB-похідних кольорів безпосередньо перед дією на клітини тестованої сполуки; середнє $\text{OD}_{\text{тест}}$ = 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 тестованої сполуки.

В умовах експерименту заявлені 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазини (3а-с) у концентрації 10^{-5} моль/л виявили здатність пригнічувати ріст ракових клітин лейкемії: CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR. Крім того було відмічено, що похідні 5,7-діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину також в певній мірі пригнічують ріст клітин практично всього спектру онкологічних захворювань людини (табл.).

Таблиця

Протипухлинна активність сполук 3а-с *in vitro*
на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л

Лінії ракових клітин	3а	3b	3с
Лейкемія			
CCRF-CEM	13,56	24,59	17,39
HL-60(TB)	32,77	42,80	15,07
K-562	25,33	28,14	21,76
MOLT-4	6,20	0,85	7,80
RPMI-8226	16,03	27,89	23,29
SR	-	13,10	5,21
Дрібноклітинний рак легень			
A549/ATCC	32,51	63,61	48,18
EKVX	-	-	26,62

Протипухлинна активність сполук За-с in vitro
на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л

HOP-62	97,70	94,14	93,23
HOP-92	38,80	82,77	64,67
NCI-H226	54,53	59,65	45,36
NCI-H23	42,72	58,75	38,29
NCI-H322M	75,52	-	71,73
NCI-H460	54,33	71,62	62,90
NCI-H522	68,55	87,16	52,00
Рак товстого кишечника			
COLO 205	74,38	104,82	55,97
HCC-2998	85,83	95,41	67,55
HCT-116	26,61	32,49	11,51
HCT-15	16,99	31,33	27,39
HT29	53,72	89,30	27,44
KM12	26,46	36,28	24,23
SW-620	36,59	81,99	46,28
Рак кори головного мозку			
SF-268	57,40	70,77	48,73
SF-295	57,10	-	77,02
SF-539	61,71	98,55	47,67
SNB-19	64,39	-	72,28
SNB-75	69,93	81,88	54,62
U251	42,42	80,14	60,14
Меланома			
LOX IMVI	32,19	35,65	18,21
MALME-3M	83,33	-	57,05
M14	63,69	64,84	55,52
MDA-MB-435	46,85	55,92	29,37
SK-MEL-2	80,18	91,62	-
SK-MEL-28	70,80	85,54	50,45
SK-MEL-5	49,75	65,02	30,41
UACC-257	76,96	125,13	76,37
UACC-62	43,77	74,58	44,87
Рак яєчників			
IGROV1	61,17	-	38,36
OVCAR-3	64,88	83,16	40,32
OVCAR-4	61,46	81,32	47,80
OVCAR-5	52,71	75,33	55,11
OVCAR-8	20,13	86,65	36,78
NCI/ADR-RES	49,96	84,19	75,36
SK-OV-3	105,19	88,88	82,49
Рак нирок			
786-0	61,08	81,13	63,95
A498	58,88	70,96	71,81
ACHN	45,41	76,20	74,14
CAKI-1	75,35	85,77	75,40
RFX 393	84,81	92,61	49,95
SN12C	45,52	72,44	30,85
TK-10	92,96	107,95	39,25
UO-31	34,46	-	40,91
Рак простати			
PC-3	22,03	30,07	38,27
DU-145	81,42	116,83	86,94
Рак молочної залози			

Протипухлинна активність сполук 3а-с in vitro
на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л

MCF7	45,06	51,50	32,13
MDA-MB-231/ATCC	12,02	54,13	24,98
HS 578T	84,69	111,88	-
BT-549	44,95	45,91	-
T-47D	38,90	32,85	39,40
MDA-MB-468	68,83	67,51	69,06

Відповідно до наведеної таблиці, сполуки 3а-с, відносно клітин меланоми, лейкемії, дрібноклітинного раку легенів, раку товстого кишечника, пухлин кори головного мозку, яєчників та нирок виявили більш високу протипухлинну активність, ніж препарат порівняння - 5-флуороурацил. Так, сполука 3а щодо клітин лейкемії CCRF-CEM, K-562, MOLT-4 та RPMI-8226 затримка росту пухлин вище стандарту на 86,44 %, 74,67 %, 93,8 % та 83,97 % відповідно, клітин дрібноклітинного раку легенів A549/ATCC та HOP-92- на 67,49 %, та 61,20 %, клітин раку товстого кишечника - на 14,17-83,01 %, клітин раку кори головного мозку - на 30,07-57,58 %, клітин раку нирок - на 15,19-65,54 %, клітин раку простати - на 18,58-77,97 %, а клітин меланоми на 16,67-67,81 %. Відносно клітин MDA-MB-231/ATCC заявлена сполука зупиняє ріст і поділ клітин на 87,98 %. Сполука 3б перевищує активність, порівняно з 5-флуороурацилом, майже до всіх досліджуваних клітин раку. Так, до клітин лейкемії CCRF-CEM, K-562, MOLT-4, RPMI-8226 та SR затримка росту пухлин вище стандарту на 75,41 %, 71,86 %, 99,15 %, 72,11 % та 86,90 % відповідно, клітин дрібноклітинного раку легенів NCI-H226 на 40,35 %, а NCI-H23 - на 41,25 %; клітин раку простати PC-3 - на 69,93 %, клітин меланоми LOX IMVI - на 64,35 % та клітин раку молочної залози T-47D на 67,15 %. Сполука 3с також перевищує активність, порівняно з 5-флуороурацилом, майже до всіх досліджуваних клітин раку. Так, до клітин лейкемії затримка росту пухлин вище стандарту на 78,24-94,79 %; клітин дрібноклітинного раку легенів EKVX на 73,38 % та NCI-H23 на 61,71 %; клітин раку товстого кишечника на 32,45-88,49 %; пухлин кори головного мозку - на 22,88-51,27 %; клітин меланоми LOX IMVI - на 81,79 %; клітин раку яєчників - на 17,51-63,28 %; клітин раку нирок - на 34,62-71,07 %, клітин раку простати PC-3 на 61,73 % та клітин раку молочної залози - на 30,94-75,02 %.

Таким чином, запропоновані нові біологічно активні сполуки, які можуть бути потенційними протипухлинними засобами.

Джерела інформації:

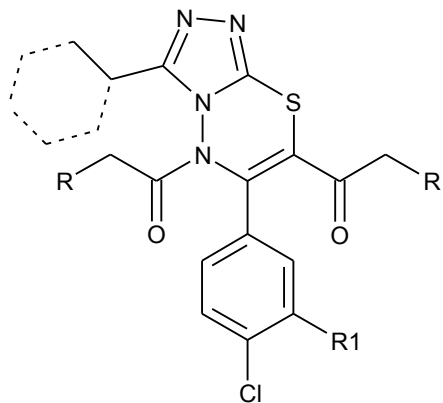
1. Bedford Laboratories. Methotrexate for injection prescribing information. Bedford, OH: 2012 April.
2. Dava Pharmaceuticals, Inc. Rheumatrex (methotrexate tablets) prescribing information. Fort Lee, NJ: 2009 Jul.
3. Anon. Drugs of choice for cancer. Treatment Guidelines from the Medical Letter. 2003. - 1:41-52.
4. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome treatment. From PDQ: Physician data query (database). Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2003, Dec 12.
5. Rajagopalan, P. T. Ravi; Zhang, Zhiqian; McCourt, Lynn; Dwyer, Mary; Benkovic, Stephen J.; Hammes, Gordon G. (2002). "Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics". Proceedings of the National Academy of Sciences. 99 (21): 13481-6.
6. Goodsell DS (August 1999). "The Molecular Perspective: Methotrexate". The Oncologist. 4 (4): 340-341.
7. Bhalerao, Uday T.; Muralikrishna, Chivukula; Rani, Bonala Radha. Laccase Enzyme Catalysed Efficient Synthesis of 3-Substituted-1,2,4-Triazolo(4,3-b)(4,1,2)Benzothiadiazine-8-Ones Tetrahedron, 1994. - Vol.50, № 13. - P. 4019-4024.
8. Marakos, Panagiotis; Papakonstantinou-Garoufalias, Spyroula; Tani, Ekaterini; Kourounakis, Panos N.; Athanasiou, George; Chytyroglou-Lada, Aikaterini. Synthesis and antifungal and antioxidant properties of some new 5-substituted-4-amino(or aryl)-3-mercapto-4(H)-1,2,4-triazoles Arzneimit-tel-Forschung/Drug Research, 2002. - Vol. 52, № 7. - P. 572-577.
9. Sasaki, Tadashi; Ito, Eikoh; Shimizu, Ikuo. Ring Transformation of 1,3,4-Oxadiazole to s-Triazole-Fused Heterocycles. New Synthetic Route for Thiazolo[2,3-c]-s-triazole and 7H-s-Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine. Journal of Organic Chemistry, 1982. - Vol. 47, № 14. - P. 2757-2760.

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

5,7-Діацил-3-етил(циклогексил)-6-(4-хлоро-3-R-феніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазини



10 де R=H, CH₂CH₃, R₁=H, Cl,
що мають протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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