



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118873** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
C07D 417/00
A61K 31/425 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 11886</p> <p>(22) Дата подання заявки: 24.11.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2019</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 25.05.2018, Бюл.№ 10</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2019, Бюл.№ 6</p> <p>(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Суховерх Володимир Володимирович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)</p> <p>(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович</p>	<p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Beverly A. Teicher, Paul A. Andrews. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical. - Medical. - 2004. - V. 1. - 450 p. Демченко С.А "Синтез та властивості похідних [1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-онів", стор.10 Демченко С.А., Бобкова Л.С. "Синтез та протипухлинна активність 2,5,7-заміщених[1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-онів", стор.34-40 Saidov N.B. Directed Synthesis Of Potential Antitumor Substances Among Derivatives Of 3-Mercapto-4-(Pyrrol-1-yl)-5-Cyclohexyl-1,2,4-Triazole(4H) / N.B.Saidov, V.A.Georgiyants, A.M.Demchenko // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. - 2014. - Т. 12, вип. 1 (45) С. 43-46. Abdellatif K. R. Diazen-I-ium-I, 2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of 1-(4-methanesulfonylphenyl)-5-aryl-1H-pyrazol-3-carboxylic acids: Synthesis, nitric oxide release studies and anti-inflammatory activities / K. R. Abdellatif, M. A. Chowdhury, Y. Dong, E. E. Knaus // Bioorganic & Medicinal Chemistry. - 2008. - Vol. 16, № 13. - P. 6528-6534</p>
---	--

(54) 7-ФЕНІЛ-2-(1Н-ПІРОЛ-1-ІЛ)-5Н-ТІАЗОЛО[4,5-d]ПІРИДАЗИН-4-ОН, ЩО МАЄ ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ

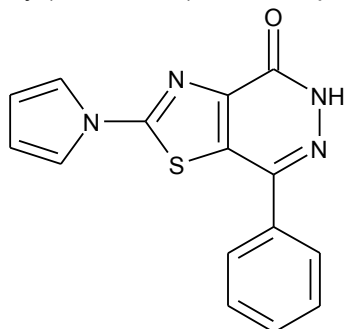
(57) Реферат:

7-Феніл-2-(1Н-пірол-1-іл)-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он, що має протипухлинні властивості. Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини. Заявлена сполука може бути використана при лікуванні пухлини молочної залози.

Визначення протипухлинної активності 7-феніл-2-(1Н-пірол-1-іл)-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону проведено in vitro на 60 лініях ракових клітин при дії речовини в концентрації 10^{-5} моль/л за стандартною процедурою оцінки мітотичної активності, виконаних у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program. Показано, що зазначена сполука проявила відносно шести видів клітин раку молочної залози більш високу протипухлинну активність, ніж препарат порівняння - 5-фторурацил. Так, для клітин MCF7 затримка росту пухлини вище стандарту на 69,45 %, для клітин MDA-MB-231/ATCC - на 11,21 %, для клітин HS 578T - на 14,12 %, для клітин BT-549 - на 64,54 %, для клітин T-47D - на 72,72 %. Для клітин MDA-MB-468 значення складає - 5,05 %. Від'ємні значення свідчать не лише про пригнічення росту і поділу клітин, а й про їх знищення.

UA 118873 C2

Патент на корисну модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активного 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-ону (DAM20860), що має формулу:

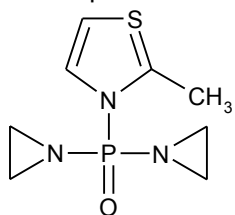


5 Зазначена сполука проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні лейкемії, меланоми, дрібноклітинного раку легенів, товстого кишечника та пухлини молочної залози.

Перелік сучасних фармацевтичних засобів налічує понад 50 протипухлинних (протибластомних) препаратів, а потенціальних засобів вивчено понад 500 тисяч сполук [1]. Вони активні при різних формах злоякісних утворень, що призводить до досягнення паліативного ефекту та зменшення пухлини і, відповідно, до клінічної ремісії. Протипухлинні препарати мають різний механізм дії і застосовуються у відповідних схемах лікування. При цьому виражений клінічний ефект складає 20-80 %. Ремісія може складати від декілька тижнів до двох років, а у 10 % хворих вона сягає понад три роки.

15 Широке застосування серед протипухлинних препаратів набули такі алкілувальні та антиметаболічні засоби, як циклофосфан, тіофосфамід, мієлосан, меркаптопурин, метатрексат, фторурацил та інші. Зазначені лікарські засоби мають необхідні лікувальні властивості, але мають малу вибірковість дії та проявляють значні побічні ефекти. Так, цитостатичний препарат з групи антиметаболітів, антагоністів фолієвої кислоти, метотрексат пригнічує клітинний мітоз, гальмує ріст злоякісних новоутворень і є більш активним по відношенню до клітин, що швидко
20 ростуть. Побічними ефектами є виразковий стоматит, анорексія, ентерит, панкреатит, пронос, анемія, схильність до кровотеч, цироз печінки тощо [2]. Протипухлинний препарат з групи антагоністів піримідинів фторурацил (5-флуорурацил) порушує обмін пуринів, гальмує синтез ДІЖ та частково - РНК. Він пригнічує ріст і розвиток пухлин, а також гемопоез. Побічними
25 ефектами є пригнічення кровотворення (анемія, лейкопенія, тромбоцитопенія), анорексія і діарея, виразковий стоматит, дерматит, анемія, ішемія міокарду, тромбофлебіт, алопеція тощо [3].

Лікарський засіб іміфос є похідним тіазолідину:



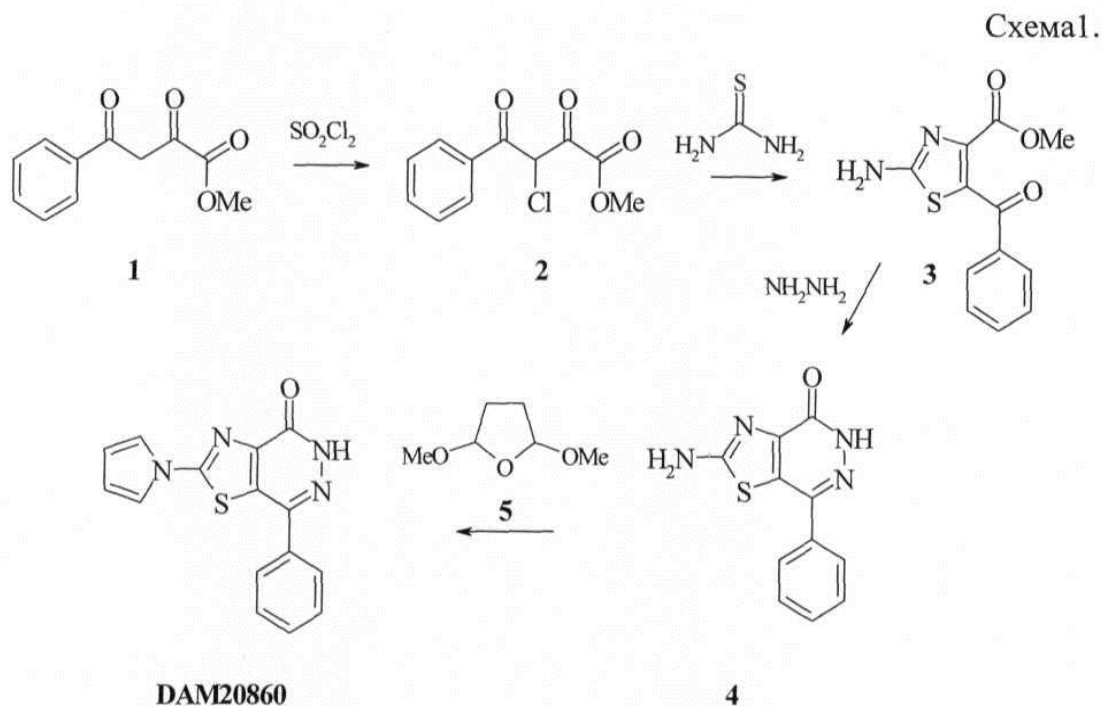
30 Іміфос застосовують для лікування хворих еритремією, яка обумовлена розростанням клітин кісткового мозку та появою в кровеносному руслі значного числа формених елементів крові тощо. При застосуванні іміфосу може розвиватися лейкопенія, тромбоцитопенія та алергічні реакції [4].

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють широкий спектр онкологічних захворювань людини.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу нової хімічної речовини 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (DAM20860).

40 Заявлену сполуку одержують з метилового естеру 2,4-діоксо-4-фенілмасляної кислоти (1), який хлорується сульфурилхлоридом до метилового естеру 3-хлор-2,4-діоксо-4-фенілмасляної кислоти (2). Шляхом конденсації естеру (3) з тіосечовиною одержано метиловий естер 2-аміно-5-бензоїлтіазол-4-карбонової кислоти (3), який здатний циклізуватися з гідразинном до 2-аміно-7-феніл-5H-тіазоло[4,5d]піридазин-4-ону (4). Останній, шляхом пірольної конденсації [5] з

еквімолярною кількістю 2,5-диметокситетрагідрофурану (5) в оцтовій кислоті, утворює 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он (DAM20860) (схема 1):



Приклади конкретного виконання.

- 5 Синтез метилового естеру 2,4-діоксо-4-фенілмасляної кислоти (1) з виходом 68 % одержано за методикою [6].

Приклад 1

- Метильний естер 2-аміно-5-бензоїлтіазол-4-карбонової кислоти (3). 0.1 Моль метилового естеру 2,4-діоксо-4-фенілмасляної кислоти (1) розчиняють в 100 мл сухого хлороформу. Утворений розчин нагрівають до 50 °С і при перемішуванні додають по краплях 8.1 мл (0.1 моль) сульфурил хлориду. Кип'ять 2 години до повного припинення виділення газів. Суміш упарюють до сухого залишку. Утворений метильний естер 3-хлор-2,4-діоксо-4-фенілмасляної кислоти (2) використовують без додаткової очистки. До розчину 0.05 моль хлорокислого (2) в 150 мл сухого метанолу додають 0.05 моль тіосечовини та кип'ять зі зворотним холодильником 4 години. Суміш охолоджують та додають 200 мл води та необхідну кількість 1N розчину NaOH (для досягнення лужного середовища). Осад, що утворився, швидко відфільтровують. Перекристалізують з метилового спирту. Вихід 8.92 г (68 %). $T_{пл} = 154-155$ °С. Знайдено, %: N=10,5 $C_{12}H_{10}N_2O_3S$. Вирахувано, %: N=10,7. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- D_6) δ , м. ч.: 3.88 (с, 3H, COOCH₃), 4,5 (уш. с, 2H, NH₂), 7.55 (т, 2H, Ph), 7.68 (т, 1H, Ph), 7.89 (д, 2H, Ph).

Приклад 2

- 2-Аміно-7-феніл-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он (4). 0.03 Моль кетоестеру (3) суспендують в 100 мл етилового спирту і додають двократний надлишок гідрозин-гідрату та кип'ять зі зворотним холодильником протягом 4 годин. Суміш охолоджують, а осад, що утворився, відфільтровують. Перекристалізують із суміші етанол-ДМФА. Вихід 6.23 г (85 %). $T_{пл} = 305-306$ °С. Знайдено, %: N=22,7 $C_{11}H_8N_4OS$. Вирахувано, %: N=22,9. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- D_6) δ , м. ч.: 4.77 (уш. с, 2H, NH₂), 7.56-7.85 (м, 5H, Ph), 13.0 (с, 1H, NH).

Приклад 3

- 7-Феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он (DAM20860). До розчину, що містить 4.89 г (0,002 моль) 2-аміно-7-феніл-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (4) в 50 мл оцтової кислоти додають 2.66 мл (0,0022 моль) 2,5-диметокситетрагідрофурану (5). Реакційну суміш кип'ять протягом 5 годин із зворотним холодильником, потім упарюють до половини об'єму та охолоджують. Реакційну суміш виливають у 300 мл крижаної води. Осад, що випав, одфільтровують та очищують кристалізацією з етанолу. Вихід 4.75 г (81 %). $T_{пл} = 187-1889$ °С. Знайдено, %: N=19,0 $C_{15}H_{10}N_4OS$. Вирахувано, %: N=18,7. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- D_6) δ , м. ч.: 6.46 (t, 2H, J=2Hz), 7.66 (д, 2H, J=2Hz), 7.56-7.84 (м, 5H, Ph), 13.4 (с, 1H, NH).

Приклад 4

Для визначення протипухлинної активності 2-аміно-7-феніл-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (4) та 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (DAM20860) 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 [7] 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-фторурацилом. Наведені у таблиці значення показують на скільки досліджувані сполуки є більш ефективними у пригніченні росту ракових клітин у порівнянні з 5-фторурацилом.

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* базується на визначенні відсотку росту клітин пухлини (PG) під впливом сполуки, що тестується.

В умовах експерименту заявлена сполука DAM20860 у концентрації 10^{-5} моль/л виявила здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл. 1). Найбільш ефективною сполука DAM20860 є відносно клітин меланоми SK-MeL-5 (пригнічення росту ракових клітин складає 75,39 %), при лікуванні лейкемії (пригнічення ракових клітин HL-60(TB) складає 76,06 %, а RPMI-8226-73,42 %) та раку молочної залози (пригнічення ракових клітин T-47D складає 72,72 %, а клітин MDA-MB-468 - не лише зупиняє ріст і поділ клітин, а й знищує їх на 5.05 %). Структурним аналогом DAM20860 є сполука (4), яка виявила протипухлинну дію лише на рівні препарату порівняння - 5-фторурацилу.

Таблиця 1

Протипухлинна активність 2-аміно-7-феніл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (4) та 7-феніл-2-(1Н-пірол-1-іл)-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону (DAM20860) *in vitro* на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л.

Лінії ракових клітин		% росту	
		Сполука (4)	DAM20860
Лейкемія	CCRF-CEM	96.17	59.67
	HL-60(TB)	101.33	23.94
	K-562	97.70	37.15
	MOLT-4	95.48	58.62
	RPMI-8226	105.23	26.58
	SR	93.27	67.63
Меланома	LOX IMVI	97.42	73.51
	MALME-3M	-	72.77
	M14	104.98	81.47
	MDA-MB-435	115.03	54.80
	SK-MEL-2	107.11	71.95
	SK-MEL-28	117.75	70.10
	SK-MEL-5	103.11	24.61
	UACC-257	112.51	35.60
Дрібноклітинний рак легенів	UACC-62	105.60	63.22
	A549/ATCC	102.73	51.07
	HOP-62	92.50	98.90
	HOP-92	98.11	60.25
	NCI-H226	101.52	82.58
	NCI-H23	102.16	37.35
	NCI-H322M	100.66	96.68
	NCI-H522	101.52	48.92
Рак простати	NCI-H460	109.31	-
	PC-3	101.13	62.13
	DU-145	105.37	81.20

Таблиця 1 (продовження)

Лінії ракових клітин		% росту	
		Сполука (4)	DAM20860
Рак нирок	786-0	104.41	85.23
	A498	121.25	64.95
	ACHN	102.23	103.22
	CAKI-1	103.48	94.19
	RXF393	132.85	101.85
	SN12C	104.01	57.42
	TK-10	111.84	96.90
	UO-31	94.56	96.07
Рак товстого кишечника	COLO 205	107.13	32.12
	HCC-2998	116.89	56.48
	HCT-116	103.46	51.94
	HCT-15	100.35	105.70
	HT29	109.19	57.80
	KM12	89.26	47.59
	SW-620	118.22	-
Рак яєчників	OVCAR-3	111.80	78.60
	OVCAR-3	104.00	38.06
	OVCAR-4	112.89	57.94
	OVCAR-5	96.69	83.79
	OVCAR-8	108.65	73.31
	NCI/ADR-RES	112.85	109.13
	SK-OV-3	102.97	89.10
Рак кори головного мозку	SF-268	94.99	71.55
	SF-539	99.74	85.75
	SNB-75	101.67	65.20
	U251	104.12	42.91
Рак молочної залози	MCF7	97.24	30.55
	MDA-MB-231/ATCC	119.27	88.79
	HS 578T	97.26	85.88
	BT-549	98.43	35.46
	T-47D	98.17	27.28
	MDA-MB-468	132.18	-5.05

Відповідно до наведеної таблиці, 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он (сполука DAM20860) проявила відносно шести видів клітин раку молочної залози більш високу протипухлинну активність, ніж препарат порівняння - 5-фторурацил. Так, для клітин MCF7 затримка росту пухлини вище стандарту на 69,45 %, для клітин MDA-MB-231/ATCC - на 11,21 %, для клітин HS 578T - на 14,12 %, для клітин BT-549 - на 64,54 %, для клітин T-47D - на 72,72 %. Для клітин MDA-MB-468 значення складає - 5,05 %.

Таким чином, запропонована нова біологічно активна сполука, яка може бути потенційним протипухлинним засобом.

Джерела інформації:

1. Протипухлинні засоби. Режим доступу:

<http://dmupharm.pp.ua/index.php/temi/20-khimioterapevtichni-zasobi-riznikh-grup/228-protipukhlinni-zasobi>

2. Метотрексат. Режим доступу:

<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%BA%D1%81%D0%BO%D1%82>.

3. 5-Фторурацил. Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/5-%D0%A4%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%83%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BB>.

4. IMIFOS (ИМИФОС). Режим доступу: <http://www.wiki-meds.ru/aktivnye-veshchestva/imifos-1632.htm>.

5. Saidov N.B. Directed Synthesis Of Potential Antitumor Substances Among Derivatives Of 3-Mercapto-4-(Pyrrol-1-yl)-5-Cyclohexyl-1,2,4-Triazole(4H) /N.B. Saidov, V.A. Georgiyants, A.M. Demchenko //Журнал органічної та фармацевтичної хімії. - 2014. - Т. 12, вип. 1 (45) С. 43-46.

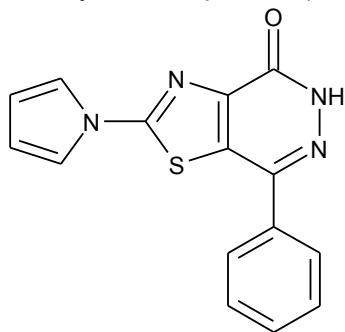
6. Abdellatif K.R. Diazen-1-ium-1,2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of 1-(4-methanesulfonylphenyl)-5-aryl-1H-pyrazol-3-carboxylic acids: Synthesis, nitric oxide release studies and anti-inflammatory activities /K.R. Abdellatif, M. A. Chowdhury, Y. Dong, E.E. Knaus //Bioorganic & Medicinal Chemistry. - 2008. - Vol. 16, № 13. - P. 6528-6534.

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

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування 7-феніл-2-(1H-пірол-1-іл)-5H-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-ону



15 як сполуки, що проявляє протипухлинну активність відносно клітин раку молочної залози.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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