



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118861** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 487/00
A61K 31/00
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 02991	(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Демченко Сергій Анатолійович (UA), Суховєєв Олександр Володимирович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.03.2017	(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	

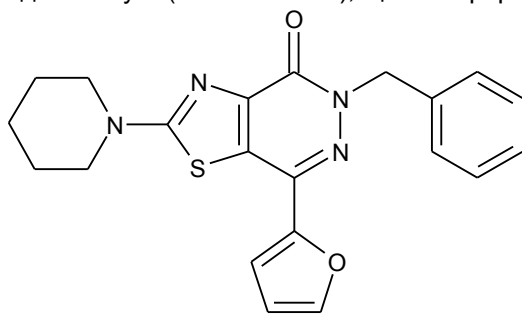
(54) 5-БЕНЗИЛ-7-(ФУРАН-2-ІЛ)-2-ПІПЕРИДИН-1-ІЛ-5Н-ТІАЗОЛО[4,5-d]ПІРИДАЗИНОН-4, ЩО МАЄ ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ

(57) Реферат:

5-Бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло [4,5-d]піридазинон-4. Має протипухлинні властивості.

UA 118861 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активного 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазину-4 (DAM0020930), що має формулу:



DAM0020930

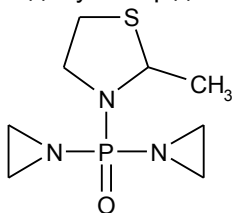
Зазначена сполука проявляє протипухлинну активність та може бути використана при лікуванні лейкемії, клітин раку товстого кишечника, меланоми та простати.

Фармакотерапію пухлинної патології все ширше застосовують у клінічній практиці. У процесі лікування кожного онкологічного хворого розглядається питання щодо можливості та доцільності застосування хіміотерапії. Число пухлинних захворювань, при яких хіміотерапія може сприяти повному виліковуванню, невелика. До них належать лімфогранулематоз, гемобластози, злоякісні герміногенні пухлини, рак передміхурової залози, яєчників і сечового міхура, мієломни, гострі лейкози, дрібноклітинний рак легенів та деякі інші. На регресію пухлини з можливим продовженням життя можна розраховувати у 20-50 % хворих на рак шлунку, меланому, рак молочної залози, тіла матки, плоскоклітинний рак голови та шиї, саркому. Але малочутливими до хіміотерапії є рак щитовидної залози, печінки, підшлункової залози, нирок, шийки матки і піхви [1]. Тому розробка нових протибластомних засобів є нагальною проблемою сучасної фармацевтичної хімії.

Усі протипухлинні синтетичні препарати поділяють на ряд груп, а саме: алкілюючі засоби та антиметаболіти. До алкілюючих засобів належать похідні хлоретил аміну, етиленіміну, метансульфонової кислоти, нітрососечовини та сполуки платини. До антиметаболітів - антагоністи фолієвої кислоти, антагоністи пурину та піримідину [2].

Еталоном для порівняння протипухлинної активності заявленої сполуки використано препарат з групи антагоністів піримідину - 5-фторурацил. Зазначений антибластомний засіб пригнічує процес ділення ракових клітин, блокуючи синтез ДНК. Він пригнічує ріст і розвиток пухлин, а також гемопоєз. 5-Фторурацил використовують при лікуванні меланоми, раку товстого кишечника, прямої кишки, раку молочної залози, шлунка, печінки, карциноми ендометрії, раку яєчників та сечового міхура. При застосуванні препарату може спостерігатися пригнічення кровотворення, центральної нервової системи, порушення серцево-судинної, травної та репродуктивної систем, дерматологічні та алергічні реакції [3].

Аналогом за структурою є протипухлинний лікарський засіб іміфос, який є похідним тіазолідину - азиридинілметилтіазолідинілфосфіноксид [4]:



Іміфос є алкілувальною сполукою, що пригнічує розвиток проліферуючої, включаючи злоякісну, тканини за рахунок порушення обміну нуклеїнових кислот і блокування мітотичного ділення клітин.

Його застосовують для лікування хворих на еритремію, яка обумовлена розростанням клітин кісткового мозку та появою в кровеносному руслі значного числа формених елементів крові тощо. При застосуванні іміфосу може розвиватися лейкопенія (знижений вміст лейкоцитів в крові), тромбоцитопенія (зменшення числа тромбоцитів в крові) та алергічні реакції, що є показаннями, щоб відмінити препарат. Протипоказаннями для застосування препарату також є анемія, кахексія, серцево-судинна недостатність, порушення функції печінки, підвищена чутливість до іміфосу.

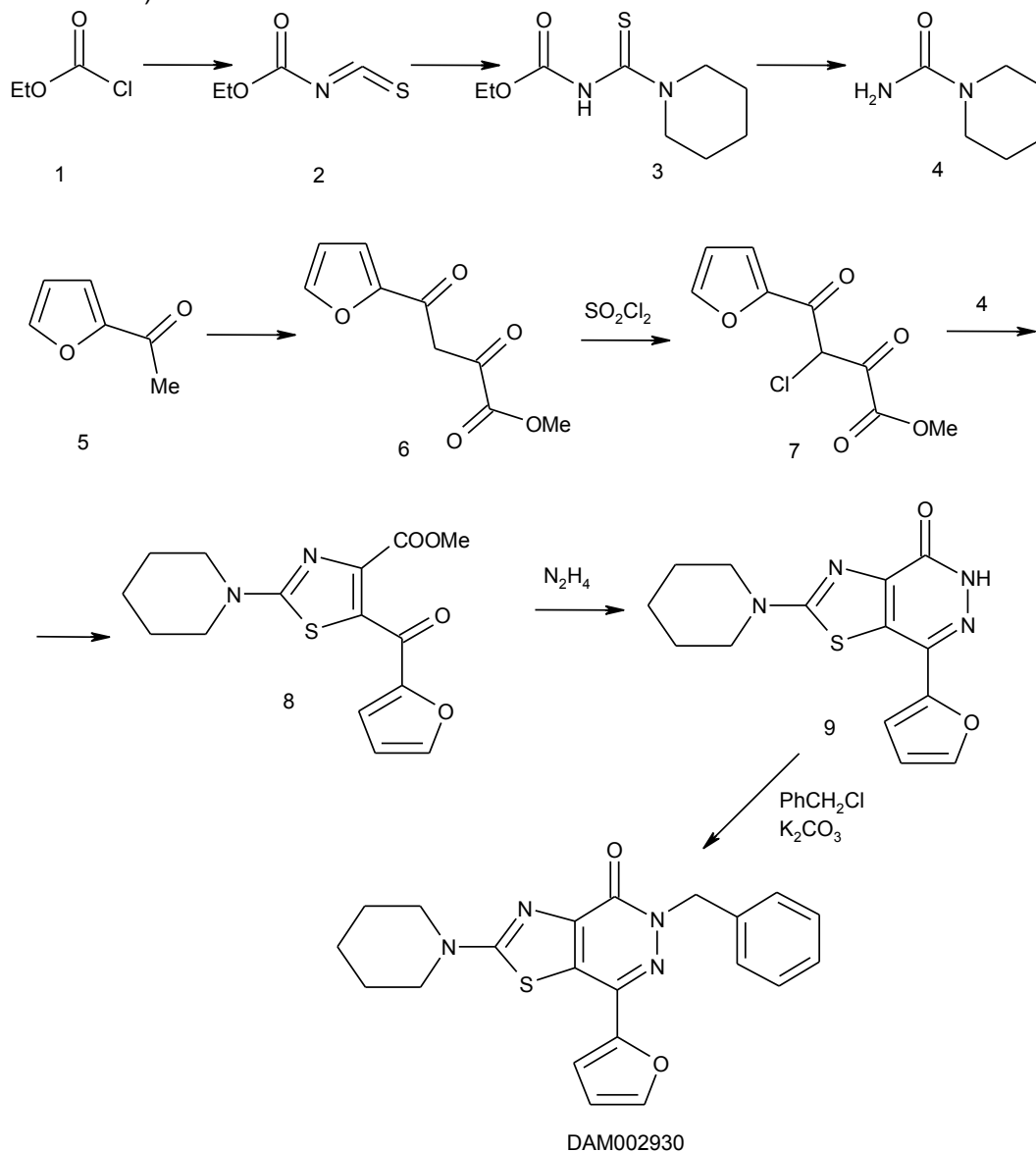
Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано зі створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів [5].

В основу патенту на корисну модель поставлена задача пошуку нової речовини, що проявляє високу протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин раку відносно лейкемії, товстого кишківника, меланоми та простати.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу нової хімічної речовини -5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазину-4 (DAM0020930).

Заявлену сполуку одержують у декілька стадій (схема 1). Ключовий ізотіоціанатоестер 2 синтезований по модифікованій нами відомій методиці [6], із етилхлорформіату як каталізатора. Піперидин-1-карботіоамід 4 був одержаний при конденсації піперидину та сухого роданіду калію в присутності тетраетил-етилєндіаміну (TMEDA) з ізотіоціанатом 2 та подальшому гідролізі естеру 3 за відомою методикою [7]. Синтезований піперидин-1-карботіоамід 4 був введений в конденсацію з метиловим естером 3-хлор-2,4-діоксо-4-(α -фурил)масляної кислоти 7 в умовах класичної реакції Ганча [8]. Оскільки метиловий естер 3-хлор-2,4-діоксо-4-(α -фурил) масляної кислоти 7 є малостійким маслом, то він був одержаний однореакторно хлоруванням естеру 2,4-діоксо-4-(α -фурил)масляної кислоти 6 хлористим сульфурилом. Метиловий естер 2-піперидин-1-іл-5-(α -фуроїл)-тіазол-4-карбонової кислоти 8 був зациклізований у 2-піперидин-7-(α -фуроїл)-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазин-4-он 9 кип'ятінням у спиртовому розчині гідразингідрату. Останній легко алкілується в ДМФА за наявності K_2CO_3 до 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазину-4 (DAM0020930).

Схема 1. Синтез 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазину-4 (DAM0020930).



Протипухлинна активність 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-*d*]піридазинону-4 (DAM0020930) вивчалась у Національному інституті раку США (National Cancer Institute of Health, USA) в рамках Development Therapeutic Program.

Приклади конкретного виконання.

Ізотіоціанатоестер (2) був одержаний із етилхлорформіату та сухого калію роданіду в присутності тетраметилетилендіаміну (TMEDA) як каталізатора за методом [6]. Піперидин-1-карботіоамід (4) був одержаний за методикою [7]. Метил-2,4-діоксо-4-(α -фууроїл)-бутаноат (6) одержано за відомою конденсацією Клайзена на основі 2-ацетилфурану (2) та діетилоксалату в присутності натрій метилату за методом [9].

Приклад 1. Синтез метилового естеру 2-піперидин-1-іл-5-(α -фууроїл)-тіазол-4-карбонової кислоти (8). До розчину 9.8 г (0.05 моль) метил 2,4-діоксо-4-(α -фурил)-бутаноату (6) в 100 мл сухого хлороформу, нагрітого до 50 °C, при перемішуванні додавали по краплях 4.05 мл (0.05 моль) сульфурилхлориду. Реакційну суміш кип'ятили 2 години до повного припинення виділення газів. Після чого випарювали до сухого залишку. Вихід 7.26 г (63 %). Утворений метиловий естер 3-хлор-2,4-діоксо-4-(α -фурил)масляної кислоти (7) використовували без додаткової очистки.

До розчину 2.306 г (0.01 моль) хлорпохідного (7) у 80 мл метанолу при перемішуванні додавали з 1.442 г (0.01 моль) тіоаміду (4). Кип'ятили зі зворотним холодильником 4 години. Суміш охолоджували та додавали 200 мл води. Підлужнювали 0.1 Н розчином NaOH до pH=8. Осад, що утворився, швидко відфільтровували, сушили. Кристалізували з метанолу. Вихід 2.496 г (78 %). $T_{пл}$ = 145-147 °C. Знайдено, %: N=8.65 S=10.2. $C_{15}H_{16}N_2O_4S$. Вираховано, %: N=8.74 S=10.0. Спектр ПМР (ДМСО-*d*₆, TMC): 1.68-1.72 (м, 6Н, піперидин), 3.56 (м, 4Н, піперидин), 3.85 (с, 3Н, ОСН₃), 6.68 (т, 1Н, фурил), 6.95 (д, 1Н, фурил), 7.83 (д, 1Н, фурил).

Приклад 2. Синтез 2-піперидин-1-іл-7-(α -фууроїл)- 5Н-тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4-ону (9). До суспензії 1.60 г (0.005 моль) кетоестеру (8) в 100 мл етилового спирту додавали двократний надлишок гідразин-гідрату та кип'ятили зі зворотним холодильником 4 години. Суміш охолоджували. Осад, що утворився, відфільтровували. Кристалізували із суміші ДМФА: етанол (1:1). Вихід 1.32 г (87 %). $T_{пл}$ =292-293 °C. Знайдено, %: N=18.4 S=10.7. $C_{14}H_{14}N_4O_2S$. Вираховано, %: N=18.5 S=10.6. Спектр ПМР (ДМСО-*d*₆, TMC): 1.65-1.69 (м, 6Н, піперидин), 3.55 (м, 4Н, піперидин), 6.67 (т, 1Н, фурил), 6.96 (д, 1Н, фурил), 7.85 (д, 1Н, фурил), 13.0 (с, 1Н, NH).

Приклад 3. 5-Бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-*d*]піридазинон-4 (DAM0020930): До розчину 1.208 г (0.004 моль) 2-піперидин-1-іл-7-(α -фууроїл)- 5Н-тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4-ону (9) в 40 мл диметил-формаміду при перемішуванні додали еквімолярну кількість K_2CO_3 і поступово 0.004 моль бензилхлориду. Реакційну суміш перемішували при 80 °C протягом 40 хвилин, охолодили та додали 200 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували та промивали водою. Кристалізували із суміші ДМФА: етанол (1:1). Вихід - 0.911 г (58 %). $T_{пл}$ =173-175 °C. Знайдено, %: N=14.1 S=8.27. $C_{21}H_{20}N_4O_2S$. Вираховано, %: N=14.3 S=8.17. Спектр ПМР (ДМСО-*d*₆, TMC): 1.63 (м, 6Н, 3CH₂ піперидин), 3.68 (м, 4Н, CH₂NCH₂), 5.19 (с, 2Н, CH₂), 6.76 (дд, 1Н, фурил), 7.10 (д, 1Н, фурил), 7.26-7.56 (м, 5Н, Ph), 7.96 (д, 1Н, фурил).

Приклад 4. Перший етап фармакологічного скринінгу (прескринінг) полягав у дослідженні протипухлинної активності сполук *in vitro* на лініях ракових клітин (лейкемії, меланоми, раку легень, товстого кишечника, ЦНС, 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). 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 флюорометричним методом, кількісно оцінюючи інтенсивність кольору флуоресцентного випромінювання (барвник - сульфородамін Б) через 48 год. опромінення клітини зі сполукою, що тестується. 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 (DAM0020930) у концентрації 10^{-5} моль/л виявила здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплює практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл. 1).

Таблиця 1

Протипухлинна активність 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазину-4 (DAM0020930) in vitro на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10^{-5} моль/л та поглибленого in vitro скринінгу у градієнті концентрацій 10^{-4} - 10^{-8} М.

Тип раку	Лінії ракових клітин	Параметри протипухлинної активності DAM0020930						
		Зміна оптичної щільності від концентрації					Мітотична активність, %	lgGI ₅₀
		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}		
Лейкемія	CCRF-CEM	99	99	87	37	43	39.81	-5.26
	HL-60(TB)	112	110	98	28	43	32.97	-5.31
	K-562	97	111	88	31	34	38.70	-5.34
	MOLT-4	108	113	104	25	37	33.13	-5.31
	RPMI-8226	99	98	97	35	45	57.13	-5.25
	SR	102	103	73	6	13	19.98	-5.65
	A549/ATCC	92	93	85	36	44	64.39	-5.29
Дрібноклітинний рак легенів	HOP-62	96	100	99	68	68	82.44	>-4.00
	HOP-92	82	85	67	18	31	64.31	-5.66
	NCI-H226	85	96	83	43	59	68.87	>-4.00
	NCI-H23	100	103	98	81	78	105.81	>-4.00
	NCI-H322M	107	104	92	68	80	99.40	-5.42
	NCI-H522	88	96	98	54	58	109.04	>-4.00
	COLO 205	102	105	110	43	46	67.92	-5.10
Рак товстого кишечника	HCC-2998	101	101	99	70	81	88.66	>-4.00
	HCT-116	104	104	92	29	31	36.09	-5.34
	HCT-15	94	94	55	23	24	33.00	-5.83
	HT29	109	107	115	43	46	63.84	-5.10
	KM12	104	107	104	51	52	75.81	>-4.00
	SW-620	94	96	96	50	55	-	>-4.00
	SF-268	98	102	95	52	60	73.61	>-4.00
Рак кори головного мозку	SF-295	97	92	94	45	70	-	-
	SF-539	92	93	90	58	69	54.06	>-4.00
	SNB-19	98	93	88	49	82	-	-
	SNB-75	82	79	80	50	66	68.15	-
	U251	95	92	80	32	43	42.03	-5.38
	LOX IMVI	100	102	95	33	46	45.57	-5.27
	MALME-3M	104	101	103	87	90	126.00	>-4.00
Меланома	M14	101	105	114	73	88	86.51	>-4.00
	MDA-MB-435	96	95	95	56	66	80.10	>-4.00
	SK-MEL-2	102	119	120	75	80	131.12	>-4.00
	SK-MEL-28	96	94	100	61	71	95.54	>-4.00
	SK-MEL-5	93	95	83	21	28	41.01	-5.47
	UACC-257	92	90	87	69	69	105.34	>^0.00
	UACC-62	96	97	95	52	60	74.87	>-4.00
	IGROV1	106	107	98	54	65	84.53	>-4.00
	OVCAR-3	105	110	103	58	76	85.06	>-4.00
Рак яєчників	OVCAR-4	96	91	87	58	71	81.50	>-4.00
	OVCAR-5	88	88	89	86	94	103.82	>-4.00
	OVCAR-8	98	100	98	39	56	70.37	>-4.00
	NCI/ADR-RES	104	111	95	42	66	74.67	>-4.00
	SK-OV-3	100	106	113	84	98	81.74	>-4.00
	786-0	104	108	102	59	82	57.36	>-4.00
	A498	69	57	64	16	32	54.20	-5.70
Рак нирок	ACHN	97	102	96	55	69	81.40	>-4.00

	CAKI-1	94	92	88	33	52	65.17	>-4.00
	RXF393	86	89	72	30	53	73.30	-
	SN12C	95	91	88	53	79	91.76	>-4.00
	TK-10	92	96	89	48	56	99.38	-
	UO-31	91	98	85	49	64	70.30	-
Рак простати	PC-3	103	96	71	35	42	36.66	-5.42
	DU-145	107	110	105	61	67	97.05	>-4.00
Рак молочної залози	MCF7	95	93	94	49	59	72.26	-
	MDA-MB-231/ATCC	102	104	90	48	60	66.47	-
	HS 578T	95	92	88	61	66	84.85	>-4.00
	BT-549	100	98	96	53	58	58.16	>-4.00
	T-47D	91	96	96	54	71	74.53	>-4.00
	MDA-MB-468	79	91	81	47	61	91.67	-

Відповідно до табл. 1, сполука 5-бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло[4,5-d]піридазинон-4 перевищує еталон на 54 лініях ракових клітин з 60, що досліджувалися. Найбільш ефективним (DAM0020930) виявився відносно лейкемії (перевищує дію 5-фторурацилу на усі лінії клітин від 42,87 % для RPMI-8226 до 80,02 % для SR), клітин раку товстого кишечника COLO 205, HT-29, НСТ-116 та НСТ-15 (перевищує дію еталону на 32,08 %, 36,16 %, 63,91 % та 67,00 % відповідно), раку кори головного мозку U251 - на 57,97 %, меланоми LOX IMVI та SK-MEL-5 - на 54,43 % та 58,99 % відповідно та клітин раку простати PC-3 перевищує дію 5-фторурацилу на 63,34 %.

На другому етапі досліджень або поглибленому in vitro скринінгу, сполука (DAM0020930) тестувалась у п'яти концентраціях при 10-кратному розведенні (100 μM, 10 μM, 1 μM, 0,1 μM та 0,01 μM) на перелічених лініях ракових клітин людини. У результаті експерименту розраховано три дозозалежні параметри, а саме: GI_{50} - концентрація сполуки, яка викликає пригнічення росту 50 % клітин лінії; TGI - концентрація, що створює повне пригнічення росту клітин; LC_{50} - концентрація, яка викликає загибель 50 % пухлинних клітин. GI_{50} інтерпретовано як ефективний рівень інгібування, TGI - як цитостатичний ефект, а LC_{50} - летальна концентрація, що характеризує цитотоксичну дію. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів ($lgGI_{50}$, $lgTGI$ та $lgLC_{50}$) є меншими, ніж -4,00, то сполука (DAM0002990) вважається активною [11].

Згідно з результатами ґрунтового in vitro скринінгу тестована сполука проявила значний рівень протиракової активності. Так, щодо клітин лейкемії значення $lgGI_{50}$ знаходиться в межах від -5.25 до 5.65, раку товстого кишечника COLO 205 та HT-29 $lgLC_{50}$ становить -5.10, а для НСТ-116 і НСТ-15, складає -5.34 та -5.83 відповідно, раку кори головного мозку U251 $lgLC_{50}$ = -5.38, меланоми LOX IMVI та SK-MEL-5 $lgLC_{50}$ = -5.27 та -5.47 відповідно та клітин раку простати PC-3 $lgLC_{50}$ = -5.42.

Таким чином, запропонована нова біологічно активна сполука, яка може бути потенційним протипухлинним засобом для лікування лейкемії, клітин раку товстого кишечника, меланоми та простати.

Джерела інформації:

1. Протипухлинні (протибластомні) лікарські засоби. [Електронний ресурс].

Режим доступу: http://pidruchniki.com/68392/meditsina/protipuhlinni_protiblastomni_likarski_zasobi - Назва з екрану.

2. Препарати при онкології. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://fivobio.com/onkologija/2093-preparati-pri-onkologii.html> - Назва з екрану.

3. 5-Фторурацил. [Електронний ресурс]. - 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> - Назва з екрану.

4. Mifos (Имифос). [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://www.wiki-meds.ru/aktivnyeveshchestva/imifos-1632.htm> - Назва з екрану.

5. Хіміотерапевтичні препарати. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/188/ximioterapevtichni-preparat> - Назва з екрану.

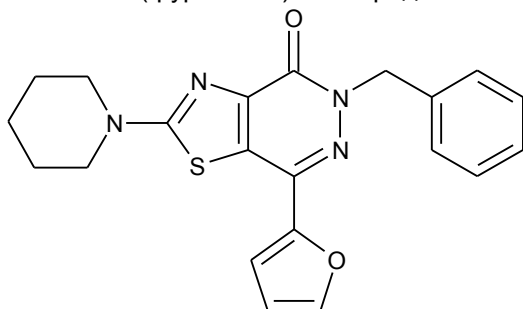
6. Gensler W. J. Synthesis of a triazole homo-C-nucleoside / Walter J. Gensler, Sum Chan, David B. Ball // Journal of Organic Chemistry.-1981. - Vol. 46, № 17.-P. 3407-3415.

7. Synthesis of mesoionic triazoline nucleosides / Masataka Yokoyama, Toshihiro Ikuma, Nobutoshi Obara, Hideo Togo // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999).-1990. - № 12. - P. 3243-3247.

8. Патент 2011121137 WO, МПК⁷ А 61 К 31/495, А 61 Р 25/00, А 61 Р 29/00, С 07 D 487/04. Novel nk-3 receptor selective antagonist compounds, pharmaceutical composition and methods for use in nk-3 receptors mediated disorders / Hamid Hoveyda, Marie-Odile Roy, Graeme Lovat Fraser, Guillaume Dutheil; Euroscreen S. A. - № 2011EP55218; заявл. 04.04.2011; опубл. 06.10.2011.
- 5 9. Пат. 2003/0212054 США, МПК⁷ А 61 К 31/553, А 61 К 31/47. Substituted amino methyl factor XA inhibitors / M. L. Quan, R. R. Wexler; Bristol-myers squibb company. -№ 10304810; заявл. 26.11.2002; опубл. 13.11.2003.
- 10 10. Teicher B.A. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical / B.A. Teicher, P. A. Andrews. - Medical.-2004. - V. 1.-450 p. II.Grever M.R. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program / M.R. Grever, S.A. Schepartz, B.A. Chabner // Seminars in Oncol.-1992. - Vol. 19, № 6. - P. 622-638.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 5-Бензил-7-(фуран-2-іл)-2-піперидин-1-іл-5Н-тіазоло [4,5-d]піридазинон-4



що має протипухлинні властивості.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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