



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83239** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C07D 417/00
A61K 31/425 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

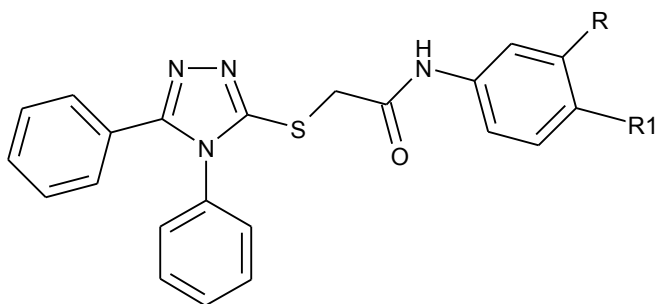
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 04229	(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Сухоусєв Володимир Володимирович (UA), Георгіянц Вікторія Акопівна (UA), Саїдов Нарзулло Бобоєвич (UA), Кадамов Ідибег Мансурович (UA), Гриневич Олександр Йосипович (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.04.2013	(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)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2013, Бюл.№ 16	

(54) 2-(4,5-ДИФЕНІЛ-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛ-3-ІЛСУЛЬФАНІЛ)-N-АРИЛАЦЕТАМІДИ, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ

(57) Реферат:

2-(4,5-Дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-N-арилацетаміди:

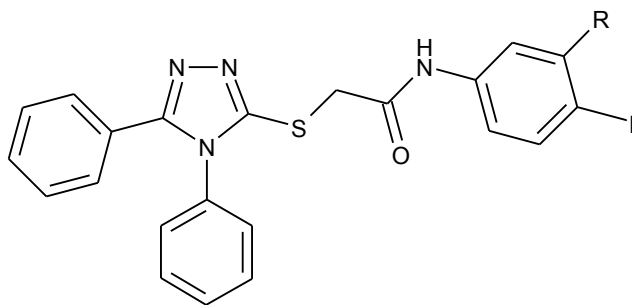


де R, R₁=H, Cl, OC₂H₅, -OCH₂CH₂O-,

що мають протипухлинну активність.

U
83239
UA

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активних похідних 4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазолів загальної формули:

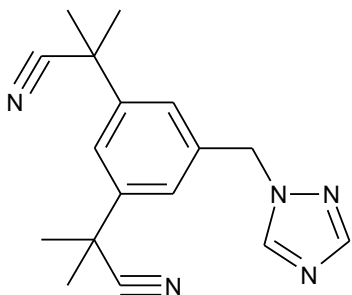


де R, R₁=H, Cl, OC₂H₅, -OCH₂CH₂O-

5 що проявляє протипухлинну активність, та може бути використана при лікуванні пухлини молочної залози.

На сьогодні для лікування пухлинної хвороби та досягнення паліативного ефекту, що призводить до зменшення пухлини і, відповідно, до клінічної ремісії, застосовують понад 40 протипухлинних препаратів, активних при різних формах злоякісних утворень. Протипухлинні
10 препарати з різними механізмами дії, що відомі, застосовують в схемах лікування. При цьому виражений клінічний ефект складає від 20 % до 80 %, в окремих випадках ремісія - до 2 років, понад 10 % хворих мають ремісію понад 3 роки. Широке застосування набули циклофосфан, метатрексат, вінкрисдин, адриабластин. Зазначені лікарські засоби мають необхідні лікувальні
15 властивості, але проявляють значні побічні ефекти на систему кровотворення (лейкопенія, анемія, тромбоцитопенія), ЦНС (почуття втоми, головокружіння, головна 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
25 зниження рівня естрадіолу в периферичних тканинах. Відомо [2], що захворювання на пухлини молочної залози в світі становлять 22.9 % від загальної кількості онкологічних захворювань.

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

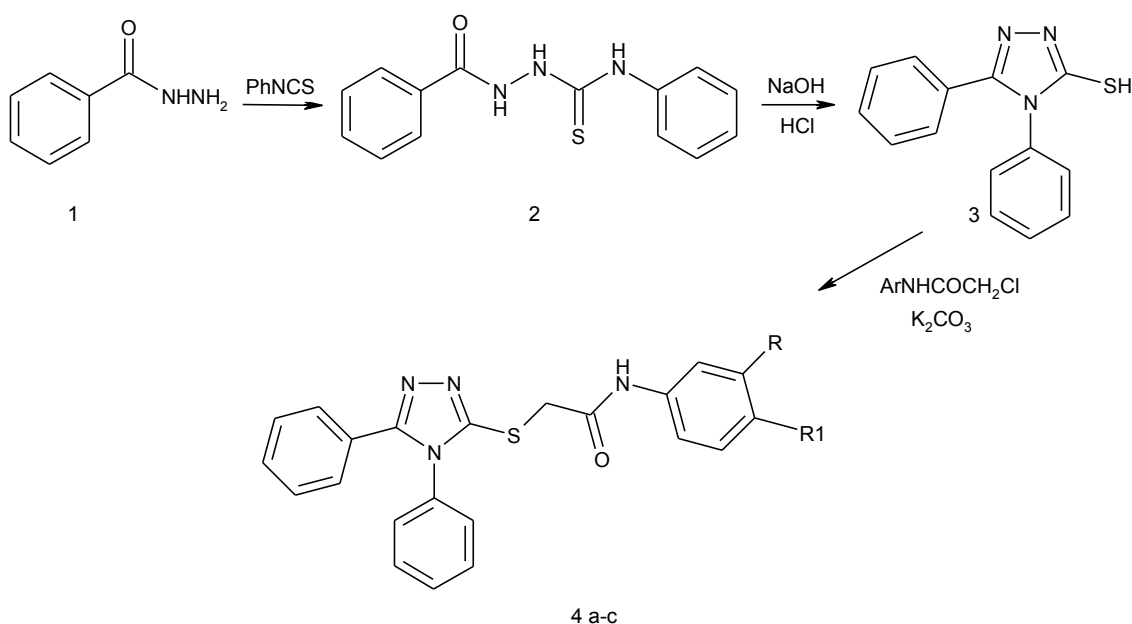
Підвищення ефективності хіміотерапії пухлинної хвороби в першу чергу пов'язано із створенням нових, ефективних протипухлинних препаратів.

30 В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових речовин, що проявляють протипухлинну активність - здатність пригнічувати ріст клітин раку молочної залози, зокрема клітин T-47D.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові хімічні речовини синтезовані 2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-ілсульфаніл)-N-арилацетаміди.

35 Заявлені 2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-ілсульфаніл)-N-арилацетаміди одержують з високими виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій (схема 1).

Схема 1. Синтез 2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-ілсульфаніл)-N-арилацетамідів.



де а) R=H, R₁=Cl, b) R=H, R₁=OC₂H₅, c) R, R₁=-OCH₂CH₂O-

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

Таблиця

Протипухлинна активність сполук 4 а-с in vitro на лініях клітин раку при дії речовин в концентрації 10⁻⁵ моль/л

Лінії ракових клітин		Сполука 4 а	Сполука 4 b	Сполука 4 с
Рак молочної залози	MDA-MB-231/ATCC	27,08	51,45	90,48
	HS 578T	27,93	10,81	78,81
	BT-549	49,77	36,63	61,99
	T-47D	-54,15	23,35	47,42
	MDA-MB-468	44,05	49,78	93,73
Дрібноклітинний рак легень	A549/ATCC	25,31		82,35
	HOP-62	-55,69	20,41	5,58
	HOP-92	-44,27		73,35
	NCI-H226	21,36	31,89	37,06
	NCI-H23	-1,72	44,40	66,45
	NCI-H322M	26,22	43,76	98,06
	NCI-H522	27,69	36,99	34,77
	NCI-H460		-9,85	87,22
Рак нирок	786-0	-50,71	42,78	86,52
	A498	-19,06	26,34	102,3
	ACHN	-34,83	8,43	75,25
	CAKI-1	69,09	31,68	95,10
	RFX 393	27,88	58,18	60,60
	SN12C	43,84	74,72	85,28
	TK-10	-28,13	-13,07	90,57
	UO-31	-29,76	56,28	90,05
Рак товстого кишківника	COLO 205	37,44	68,07	98,44
	HCC-2998	55,30	82,09	87,73
	HCT-116	-7,74	26,43	57,23
	HT29	40,37	17,52	92,68
	KM12	43,75	54,66	85,56

Продовження таблиці

Лінії ракових клітин		Сполука 4 а	Сполука 4 б	Сполука 4 с
Рак яєчників	IGROV1	20,85	56,65	96,60
	OVCAR-4	-16,31	11,58	70,11
	OVCAR-5	30,01	93,70	79,63
	NCI/ADR-RES	15,57	48,19	67,64
	SK-OV-3	-43,54	34,92	42,57
Рак кори головного мозку	SF-268	70,20	50,79	48,85
	SF-539	-17,54	2,48	40,82
	SNB-75	-36,81	-36,54	13,67
Меланома	LOX IMVI	23,36	30,94	81,20
	MALME-3M	-27,98	28,24	63,11
	M14	47,49	29,82	94,46
	MDA-MB-435	48,30	29,31	90,77
	SK-MEL-2	60,69	51,07	77,94

Для визначення протипухлинної активності похідних 2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-N-арилацетамідів 4 а-с проведено *in vitro* дослідження 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 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 в концентрації 10^{-5} моль/л виявили здатність пригнічувати ріст клітин раку, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (табл.).

Приклади конкретного виконання.

4,5-Дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіол 3 був одержаний за методом [3] взаємодією гідразиду бензойної кислоти 1 з фенілізотіоціанатом в спиртовому розчині та подальшою циклізацією проміжної тіосечовини 2 в лужному середовищі.

Приклад 1. Синтез N-(4'-хлорфеніл)-2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-ацетаміду 4 а. До розчину 2,53 г (0,01 моль) 4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіолу 3 в 40 мл сухого ДМФА додавали 2,76 г (0,02 моля) калій карбонату. Потім додавали 2,04 г (0,01 моль) 2-хлор-N-(4'-хлорфеніл)-ацетаміду. Нагрівали при перемішуванні на водяній бані 2 години. Охолоджували і виливали в 100 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою. Перекристалізовували з етанолу. Вихід - 3,65 г (87 %), $T_{пл}=242-3^{\circ}\text{C}$. Знайдено, %: N 13,0, Cl 8,66, $C_{22}H_{17}ClN_4OS$. Обчислено, %: N 13,3, Cl 8,43. ЯМР ^1H (δ , м.ч.): 4,14 (с, 2H, CH_2), 7,21 та 7,60 (д-д, 4H, C_6H_4 -пара), 7,25-7,53 (м, 10H, 2Ph), 10,4 (с, 1H, NH).

Приклад 2. N-(4'-Етоксифеніл)-2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-ацетамід 4 б був одержаний аналогічно прикладу 1 із 2,53 г. (0,01 моль) 4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіолу 3 та 2,14 г (0,01 моль) 2-хлор-N-(4'-етоксифеніл)-ацетаміду. Вихід - 3,65 г (87 %), $T_{пл}=227-8^{\circ}\text{C}$. Знайдено, %: N 13,2, S 7,27, $C_{24}H_{22}N_4O_2S$. Обчислено, %: N 13,0, S 7,43. ЯМР ^1H (δ , м.ч.): 1,38 (т, 3H, CH_3), 3,97 (кв., 2H, OCH_2), 4,11 (с, 2H, CH_2), 6,74 та 7,47 (д-д, 4H, C_6H_4 -пара), 7,26-7,54 (м, 10H, 2Ph), 10,1 (с, 1H, NH).

Приклад 3. N-(2,3-Дигідробензо[1,4]діоксан-6-їл)-2-(4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-арилацетамід 4 с був одержаний аналогічно прикладу 1 із 2,53 г. (0,01 моль) 4,5-дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіолу 3 та 2,28 г (0,01 моль) 2-хлор-N-(2,3-дигідробензо[1,4]діоксан-6-їл)-ацетаміду. Вихід - 3,65 г (87 %), $T_{пл}=238-9^{\circ}\text{C}$. Знайдено, %: N 12,8, S 7,07, $C_{24}H_{20}N_4O_3S$. Обчислено, %: N 12,6, S 7,20. ЯМР ^1H (δ , м.ч.): 4,09 (с, 2H, CH_2), 4,21 (м, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 6,66-7,53 (м, 13H, 2Ph+ C_6H_3), 10,0 (с, 1H, NH).

Визначення цитотоксичного ефекту *in vitro*. Основною метою досліджень *in vitro* є оцінка прямого цитотоксичного ефекту потенційних протипухлинних сполук та виявлення можливої диференційної чутливості пухлинних клітин людини різного ґенезу до сполук, що вивчаються. Експеримент *in vitro* проводили на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстого кишечника, 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 сполуки, що тестується, який обчислюється за однією із наступних формул:

Якщо $(\text{середня } OD_{\text{тест}} - \text{середня } OD_{\text{tzero}}) > 0$, 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 $(\text{середнє } OD_{\text{тест}} - \text{середнє } OD_{\text{tzero}}) < 0$, 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.

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. - P. 1802-1810.

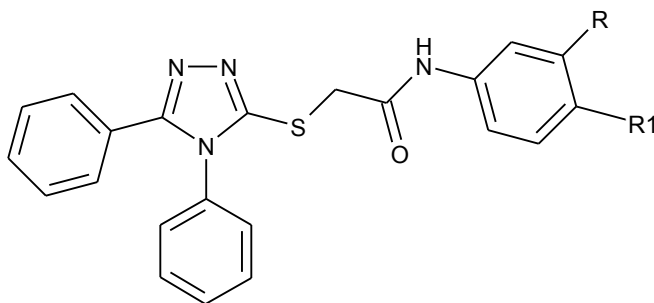
2. "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. 2008. Retrieved 2011-02-26. (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma, which are common but rarely fatal).

3. Maxwell, James R.; Wasdahl, Dan A.; Wolfson, Alan C; Stenberg, Virgil I. Synthesis of 5-Aryl-2H-tetrazoles, 5-Aryl-2H-tetrazole-2-acetic Acids, and <(4-Phenyl-5-aryl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio>acetic Acids as Possible Superoxide Scavengers and Antiinflammatory Agents. Journal of Medicinal Chemistry, 1984. - Vol.27, № 12. - P. 1565-1570.

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

2-(4,5-Дифеніл-4Н-[1,2,4]триазол-3-їлсульфаніл)-N-арилацетаміди:



де R, R₁=H, Cl, OC₂H₅, -OCH₂CH₂O-

що мають протипухлинну активність.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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