

(19)



(10) **LT 5623 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5623** (51) Int. Cl. (2006): **C07D 285/00**
A61K 31/433
- (21) Paraiškos numeris: **2008 035**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2008 04 30**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2009 11 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2010 01 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Daumantas MATULIS, LT
Inga ČIKOTIENĖ, LT
Egidijus KAZLAUSKAS, LT
Jurgita MATULIENĖ, LT
- (73) Patento savininkas:
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, V. Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
5-aril-4-(5-pakeistieji 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolai kaip Hsp90 šaperono slopikliai ir tarpiniai junginiai jiems gauti

- (57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su naujais junginiais - 5-aril-4-(5-pakeistais 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiazolidais, kurių bendra formulė (I). Šie junginiai gali būti naudojami biomedicinoje kaip vaistinių preparatų veikliosios medžiagos, nes pasižymi vėžio progresavime dalyvaujančio Hsp90 šaperono slopinimu. Taip pat išradimas susijęs su naujais tarpiniais junginiais, reikalingais bendrosios formulės (I) tiadiazolų sintezei.

Išradimas yra susijęs su naujais 5-aril-4-(5-pakeistais 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolų dariniais, kurie gali būti naudojami biomedicinoje kaip vaistinių preparatų veikliosios medžiagos, nes pasižymi gebėjimu slopinti Hsp90 šaperoną, dalyvaujantį vėžinių susirgimų progresavime. Taip pat išradimas susijęs su naujais tarpiniais junginiais, reikalingais tikslių 1,2,3-tiadiazolų sintezei.

Molekuliniai šaperonai yra baltymai, kurie atsako už tinkamą suvyniojimą, stabilizavimą ir kitų baltymų funkcionavimą ląstelėje. Išoriniai poveikiai, įskaitant karščio šoką, alkoholių, sunkiųjų metalų poveikį arba oksidacinį šoką, pasireiškia tokių šaperonų, kurie žinomi kaip karščio šoko baltymai (Hsp), kaupimusi ląstelėje. Karščio šoko baltymas 90 (Hsp90) sudaro 1-2 % bendro baltymų kiekio ląstelėje ir parpaistai ląstelėje būna dimero pavidalu. Šis baltymas yra molekulinis šaperonas, dalyvaujantis nuo ATF-priklausomame suvyniojime, atsako už daugelio baltymų „klientų“, susijusių su onkogeniniais procesais, stabilumą ir funkcionavimą. Šie baltymai „klientai“ apima ErbB2, c-Raf, Cdk4, mutantinį p53, hTERT, Hif1- α bei estrogeno/androgeno receptorius. Hsp90 slopinimas sukelia sinchroninį, kombinatorinį onkogeninių „klientų“ baltymų destabilizavimą ir degradavimą, savo ruožtu sukeliančius daug ilgiau trunkantį poveikį, apimant nekontroliuojamą proliferaciją, imortalizaciją, invaziją, metastazes ir angiogenezę. Manoma, kad vėžio ląstelės laibiau pasiduoda Hsp90 slopinimui, nei atitinkamos normalios ląstelės (P. Workman (2004), *Trends Mol. Med.*, 10, 47 – 51). Iš kitos pusės, terapinis Hsp90 slopiklių selektyvumas pasireiškia vėžio ląstelės stresinėmis sąlygomis, tiek onkogeninių mutacijų, tiek ir nekontroliuojamo signalų perdavimo dėka, o taip pat dėl aplinkos poveikio, kaip yra hipoksijos, acidozės ir maistinių medžiagų trūkumo atvejais. Be to, buvo pranešta, kad Hsp90, randamas piktybinėse ląstelėse, egzistuoja daugiausiai superšaperono komplekso pavidalu, kuris suriša Hsp90 slopiklius daug efektyviau, nei nekompleksinė forma, kuri pagrindinai randama sveikose ląstelėse (B. W. Dymock et al, (2004), *Expert Opin. Ther. Patents*, 14, 837 – 847).

Hsp90 šaperono ATF-azinis aktyvumas gali būti slopiniamas su tam tikru selektyvumu gamtiniais antibiotikais, tokiais kaip geldanamicinas ir radisikolis (S. M. Roe et al, (1999), *J Med Chem* 42, 260-266). Abu šie junginiai jungiasi prie N-galinio ATF rišančio Hsp90 domeno ir slopina vidinį ATF-azinį aktyvumą. Geldamicinas buvo aktyvus žmogaus auglių ksenografo modeliuose, tačiau pasirodė esąs per daug hepatotoksiškas, kad

jį galima būtų naudoti klinikiniuose tyrimuose. Tačiau geldanamicino modifikuoti dariniai - 17-alilamino-17-demetoksigeldanamicinas (17-AAG) ir 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoksigeldanamicinas (17-DMAG) neprarado Hsp90 slopinimo savybės ir pasižymėjo ženkliai mažesniu hepatotoksiškumu, lyginant su geldamicinu (patentas No. US 4261989, publ. 1981). 17-AAG yra pasiekęs vėžio gydymo klinikinių tyrimų stadiją.

Radisikolis tai makrociklinis antibiotikas, išskirtas iš *Monosporium Bonorden*. Radisikolis stipriau slopina Hsp90 ATF-azinių aktyvumą, negu geldanamicinas ar 17-AAG (T. W. Schulte et al, (1998) *Cell Stress Chaperones* 3, 100-108). Tačiau radisikolio struktūra turi jai būdingus apribojimus, tarp jų epoksidinis fragmentas, keto grupė ir polinkis į Michaelio papildomas reakcijas. Dėl cheminio nestabilumo radisikolio priešnavikinis aktyvumas *in vivo* yra nepakankamas. Buvo susintetinti radisikolio dariniai - oksimai (žinomi kaip KF25706 ir KF58333), kurie neprarado gebos slopinti Hsp90. Be to, KF25706 pasižymėjo priešvėžiniu aktyvumu *in vivo* žmogaus auglių ksenografiniuose modeliuose (S. Soga et al (1999) *Cancer Res*, 59, 2931 – 8; US 6239168; US 6316491; US 6635662). Tačiau kol kas ne vienas iš radisikolio darinių nepasiekė klinikinių tyrimų stadijos.

Taip pat yra duomenų, kad kumarinas, novobiocinas ir cisplatinas jungiasi prie Hsp90 C-galinio domeno ir taip pat slopina baltymo ATF-azinių aktyvumą. (G. A. Holdgate (1997) *Biochemistry* 36, 9663-9673; R. J. Lewis (1996) *Embo J* 15, 1412-1420; M. G. Marcu et al (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 37181 – 37186; M. G. Marcu et al (2003) *Curr. Cancer Drug Targets*, 3, 343). Taigi, abiejų Hsp90 galinių domenų blokavimas yra svarbus Hsp90 šaperono funkcijai.

Patentinėje literatūroje stebimas dėmesys įvairiems sintetiniams mažamolekuliniams Hsp90 slopikliams. Pirmieji purinų klasės inhibitoriai (PU3 ir PU24FCI) buvo sukurti remiantis vaistų modeliavimo principais baltymo aktyvaus centro kristalinėje struktūroje. (EP 1335920, G. Chiosis et al (2001) *Chem. Biol.* 8, 289 – 299). Buvo parodyta, kad šie junginiai buvo signalinių molekulių, įskaitant ERBB2, degradacijos priežastis, ir stabdė krūties vėžio ląstelių dauginimąsi. Neseniai S. R. Kasibhatla su bendraautoriais paskelbė apie naujus purino darinius, kuriuose yra amino-, tio-, sulfinil- bei sulfonilgrupės (WO 03037860; US 7241890; US 7138401). Kai kurie iš šių junginių slopina Hsp90 šaperoną nanomoliniu lygiu. Mokslininkų dėmesį dabar traukia ir kiti Hsp90 slopikliai (WO2006075095, EP1838322).

Kitos sintetinių Hsp90 slopiklių klasės atstovai tai purino struktūriniai analogai - pirazolopirimidinais, pirolopirimidinais ir triazolopirimidinais. Šie junginiai buvo susintetinti ir ištirti S. R. Kasibhatla grupės (US 7148228; US 7138402, US 7129244, EP1869027).

Įvairūs 3,4-diarilpirazolų dariniai, turintys rezorcinolio fragmentą, buvo sumodeliuoti ir susintetinti Nacionaliniame vėžio tyrimų institute aukšto našumo skrinimo būdu. Kai kurie iš šių darinių (žinomi kaip CCT 018159, VER 49009) pasižymėjo labai stipriu Hsp90 slopinančiu aktyvumu (K.M. J. Cheung et al (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 3338 – 3343; B. W. Dymock et al (2005) *J. Med. Chem.*, 48, 4212 – 4215; US 7247734; EP 1456180). Eilė 3-arilpirazol-4-piperazino darinių (X. Barril (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 2543 – 2548), o taip pat ir 3-aril-4-ariloksipirazolai (patentas JP 2005225787) buvo susintetinti ir pasirodė linę jungtis su Hsp90.

Iš patentinės literatūros taip pat žinoma, kad pirazolo žiedas 3,4-diarilpirazoluose gali būti pakeistas kitu 5-nariu žiedu, pvz. izoksazolu (EP1611112) arba triazolu (WO 2005000300, WO2007139952).

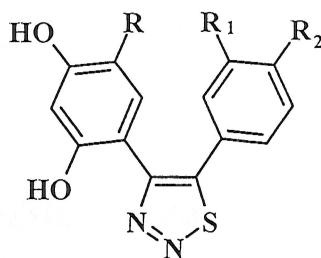
Buvo susintetinta ir įvertinta nemažai mažamolekulinių sintetinių Hsp90 šaperono slopiklių. Tarp jų pirazolai (US2007112192, EP1567151; US2007191445, EP1620090, JP2006306755), triazolai (US2007155809, WO2007139956, WO2008021364, WO2006055760, WO2007139968, WO2007139967, WO2007139952, US2006167070), chinazolinai (EP1885701, WO2006122631), izoindolai (WO2008044034, EP1869042) ir hidroksibenzamidai (WO2006109075).

Nors ir daug buvo susintetinta Hsp90 inhibitorių, tik keli iš jų pasiekė klinikinius tyrimus. Iki šiol išlieka didelis poreikis naujų efektyvių Hsp90 slopiklių, pasižyminčių viena ar keliomis pageidaujamomis savybėmis: didesniu aktyvumu, selektyvumu, tirpumu, mažu toksiškumu ir pašaliniu poveikiu, ekonomiškese sinteze ir pan.

Taigi naujų Hsp90 šaperono slopiklių kūrimas vis dar lieka labai aktualia ir svarbia užduotimi.

Patentinėje ir nepatentinėje literatūroje nebuvo rasta duomenų apie išradimo junginių 5-aril-4-(5-pakeistų 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolų ir tarpinių junginių jiems gauti sintezę.

Šiame išradime aprašomi nauji 5-aril-4-(5-pakeisti 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolai, kurių bendroji struktūrinė formulė (I)



(I)

kur R yra H, Cl, Br, I, CH₃, C₂H₅, OCH₃;

R₁ ir R₂ yra tie patys ar skirtingi pakaitai, pasirinkti iš grupės, susidedančios iš H,
 5 CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉, OCH₃, OC₂H₅, OC₃H₇, O(CH₂)₂O, O(CH₂)₃O.

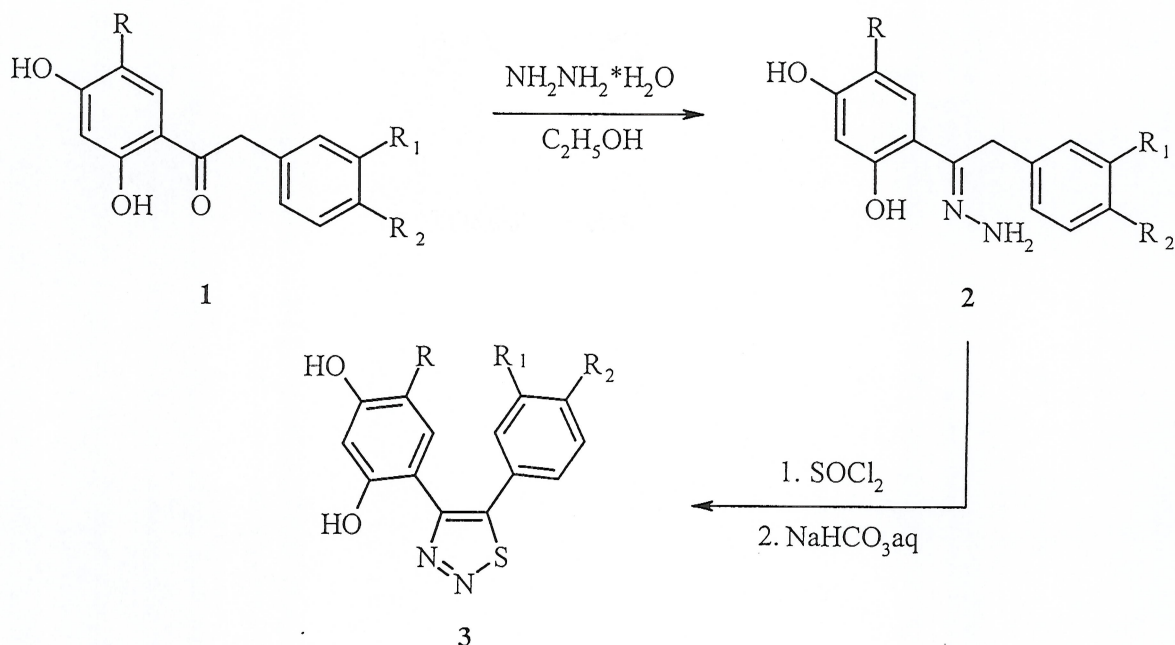
Išradimo objektas yra taip pat 5-aril-4-(5-pakeisti 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-
 tiadiazolų, kurių bendroji formulė (I) netoksiškos, farmaciniu požiūriu priimtinos druskos.
 Tai yra visos druskos, kurios nepraranda aktyvumo lyginant su pagrindiniais junginiais ir
 neįgauna žalingų ir nepageidaujamų poveikių. Tokios druskos gaunamos iš junginių, turinčių
 10 bendrą struktūrinę formulę (I), sumaišius jų tirpalą su farmakologiškai priimtinomis
 netoksinėmis organinėmis ir neorganinėmis rūgštimis, tokiomis kaip vandenilio chloridas,
 butano dirūgtis, citrinų rūgtis, vyno rūgtis, fosforo rūgtis, sieros rūgtis ir kt.

Konkrečių išradimo junginių pavyzdžiais yra junginiai, pasirinkti iš grupės,
 apimančios:

- 15 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-metoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-etoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-metilfenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(3,4-dimetoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-etil-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-etoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą,
 20 pasižymintys Hsp90 slopinimu.

Išradimo objektu taip pat yra žemiau aprašyti nauji tarpiniai junginiai, kurie gali būti
 naudojami bendrosios formulės (I) tiadiazolams gauti.

Nauji išradimo junginiai yra gaunami pagal žemiau atvaizduotą bendrą sintezės schemą:



Pradinių medžiagų (junginių **1**) sintezė buvo atliekama kaip aprašyta B. W. Dymock, X. Barril, P. A. Brough, J. E. Cansfield, A. Massey, E. McDonald, R. E. Hubbard, A. Surgenor, S. D. Roughley, P. Webb, P. Workman, L. Wright, M. J. Drysdale (2005) *J. Med. Chem.*, 48, 4212 – 4215. Junginiai **1** veikiami hidrazinhidratu verdančiame etanolyje, kad sudarytų hidrazonus **2**. Pastarųjų darinių ciklizacija su sulfinilchloridu leidžia gauti 5-aril-4-(5-pakeistųjų 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolų **3** aukštas išeigas.

Gautų junginių pagrindinių savybių iliustravimui šiame aprašyme pateikiamos:

Fig. 1, kurioje pavaizduoti išradimo junginio bendrosios formulės (I), būtent 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3b**) jungimosi prie Hsp90 N-galinio domeno tyrimo izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu būdingi rezultatai. Pateikti neapdoroti izoterminio titravimo kalorimetrijos duomenys.

Fig. 2, kurioje pavaizduoti išradimo junginio bendrosios formulės (I), būtent 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3b**) jungimosi prie Hsp90 N-galinio domeno tyrimo izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu būdingi rezultatai integralinėje formoje.

Fig. 3, kurioje pavaizduota tipinė ląstelių išlikimo kreivė bendrosios formulės (I) išradimo junginiui 4-(5-etil-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazolui (**3e**) U2OS ląstelėse. Šios kreivės buvo naudojamos junginių koncentracijoms, kuriose ląstelių augimas sumažėja 50% (GI_{50}), nustatyti.

Žemiau pateikiami konkretūs išradimo junginių ir jų gavimo pavyzdžiai, tarp jų ir reikalingų išradimo junginiams susintetinti tarpinių junginių, konkretūs gavimo pavyzdžiai. Šie pavyzdžiai pateikti išradimo esmės iliustravimui, neapribojant išradimo apimties.

5 **1 pavyzdys.** Tarpinio junginio 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono hidrazono (**2a**) gavimas.

I 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono **1a** (0.5 g, 1.71 mmol) tirpalą 95% etanolyje (5 ml) supilamas hidrazino hidratas (0.166 ml, 3.42 mmol). Reakcijos mišinys virinamas 7 valandas. Tirpiklis nugarinamas rotaciniu garintuvu, liekana plaunama
10 vandeniu, filtruojama ir kristalinama iš 2-propanolio

Išeiga 76%, geltona kieta medžiaga, lyd.t. 143 – 145°C.

¹H BMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ m.d. 3.72 (3H, s, OCH₃), 4.00 (2H, s, CH₂), 6.40 (1H, s, ArH), 6.71 (2H, pl.s. NH₂), 6.88 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.15 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.26 (1H, s, ArH), 9.92 (1H, pl.s. OH), 13.56 (1H, s, OH).

15 ¹³C BMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ m.d. 28.6, 54.9, 104.1, 109.2, 113.0, 114.0, 127.2, 128.0, 129.1, 149.3, 153.2, 157.7, 158.4.

2 pavyzdys. Tarpinio junginio 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono hidrazono (**2b**) gavimas.

20 Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 1 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono **1b** (0.52 g, 1.71 mmol).

Išeiga 97%, geltona kieta medžiaga, lyd.t. 163 – 165°C.

¹H BMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ m.d. 1.28 (3H, t, J = 6.6 Hz, CH₃), 3.94 (2H, k, J = 6.6 Hz, OCH₂), 3.94 (2H, s, CH₂), 6.39 (1H, s, ArH), 6.70 (2H, pl.s. NH₂), 6.84 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.11 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.24 (1H, s, ArH), 10.18 (1H, pl.s. OH), 13.55 (1H, s, OH).

3 pavyzdys. Tarpinio junginio 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metilfenil)etanono hidrazono (**2c**) gavimas.

30 Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 1 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metilfenil)etanono **1c** (0.47 g, 1.71 mmol)

Išeiga 74%, geltona kieta medžiaga, lyd.t. 182 – 184°C.

^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 3.33 (3H, s, CH_3), 3.79 (2H, s, CH_2), 6.41 (1H, s, ArH), 6.75 (2H, pl.s. NH_2), 7.08 – 7.17 (4H, m, ArH), 7.28 (1H, s, ArH), 9.99 (1H, pl.s. OH), 13.50 (1H, s, OH).

5 **4 pavyzdys.** Tarpinio junginio 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(3,4-dimetoksifenil)etanono hidrazono (**2d**) gavimas.

Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 1 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(3,4-dimetoksifenil)etanono **1d** (0.55 g, 1.71 mmol).

Išeiga 83%, geltona kieta medžiaga, lyd.t. 152 – 154°C.

10 ^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 3.71 (3H, s, OCH_3), 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.99 (2H, s, CH_2), 6.40 (1H, s, ArH), 6.65 (2H, pl.s. NH_2), 6.68 - 6.94 (3H, m, ArH), 7.28 (1H, s, ArH), 10.02 (1H, pl.s. OH), 13.52 (1H, s, OH).

15 **5 pavyzdys.** Tarpinio junginio 1-(5-etil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono hidrazono (**2e**) gavimas.

Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 1 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-etil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono (**1e**) (0.51 g, 1.71 mmol).

Išeiga 60%, geltona kieta medžiaga, lyd.t. 63 – 64°C.

20 ^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 1.17 (3H, t, $J = 7$ Hz, CH_3), 1.39 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_3), 2.42 (2H, k, $J = 7$ Hz, CH_2), 3.72 (2H, k, $J = 7.5$ Hz, OCH_2), 3.99 (2H, s, CH_2), 6.32 (1H, s, ArH), 6.54 (2H, pl.s. NH_2), 6.75 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.07 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.21 (1H, s, ArH), 9.90 (1H, pl.s. OH), 13.50 (1H, s, OH).

25 **6 pavyzdys.** 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3a**) gavimas.

Į sulfinilchloridą (1 ml) atsargiai porcijomis sudedamas 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono hidrazonas (**2a**) (0.1 g, 0.33 mmol). Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 2 valandas. Sulfinilchlorido perteklius nudistilijuojamas rotaciniu garintuvu, liekana tirpinama chloroforme (10 ml). Gautas organinis sluoksnis du kartus plaunamas sočiu NaHCO_3 tirpalu (10 ml), po to vandeniui (15 ml), atskiriamas, džiovinamas Na_2SO_4 , sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Liekana gryninama kolonėlės chromatografijos pagalba. (D. S. Pederson, C. Rosenbohm, (2001) *Synthesis*, 16, 2431 - 2434).

Išeiga 95%, ruda amorfinė medžiaga, lyd.t. 87 – 89°C.

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3) δ m.d. 3.93 (3H, s, OCH_3), 5.76 (1H, pl.s. OH), 6.81 (1H, s, ArH), 7.05 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.17 (1H, s, ArH), 7.39 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 10.20 (1H, s, OH).

^{13}C BMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ m.d. 55.2, 103.9, 109.9, 110.3, 114.5, 120.1, 129.6,
5 131.4, 151.9, 153.4, 154.6, 155.2, 160.2

7 pavyzdys. 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3b**) gavimas.

Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 6 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-
10 2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono hidrazono **2b** (0.11 g, 0.33 mmol).

Išeiga 80%, rusva amorfinė medžiaga, lyd.t. $132 - 134^\circ\text{C}$.

^1H BMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ m.d. 1.30 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, CH_3), 4.01 (2H, k, $J = 6.9$ Hz, OCH_2), 5.92 (1H, pl.s. OH), 6.71 (1H, s, ArH), 6.93 (2H, d, $J = 9$ Hz, ArH), 7.24 (1H, s, ArH), 7.29 (2H, d, $J = 9$ Hz, ArH), 10.23 (1H, s, OH).

15 ^{13}C BMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ m.d. 15.2, 53.9, 104.7, 110.7, 111.1, 115.6, 120.8, 130.4, 132.2, 152.8, 154.2, 155.4, 156.0, 160.3.

8 pavyzdys. 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-metilfenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3c**) gavimas.

20 Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 6 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metilfenil)etanono hidrazono **2c** (0.10 g, 0.33 mmol).

Išeiga 94%, ruda amorfinė medžiaga, lyd.t. $69 - 71^\circ\text{C}$.

^1H BMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ m.d. 2.31 (3H, s, CH_3), 5.57 (1H, pl.s. OH), 6.70 (1H, s, ArH), 7.20 – 7.27 (4H, m, ArH), 7.29 (1H, s, ArH), 10.22 (1H, s, OH).

25 ^{13}C BMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ m.d. 21.5, 104.7, 110.7, 111.0, 126.0, 128.8, 130.3, 132.3, 140.2, 152.9, 154.7, 155.4, 156.0.

9 pavyzdys. 4-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-5-(3,4-dimetoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3d**) gavimas.

30 Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 6 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-chlor-2,4-dihidroksifenil)-2-(3,4-dimetoksifenil)etanono hidrazono **2d** (0.11 g, 0.33 mmol).

Išeiga 96%, rusva amorfinė medžiaga, lyd.t. $117 - 119^\circ\text{C}$.

^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 3.60 (3H, s, OCH₃), 3.77 (3H, s, OCH₃), 5.78 (1H, pl.s. OH), 6.73 (1H, s, ArH), 6.94 – 6.98 (3H, m, ArH), 7.26 (1H, s, ArH), 10.21 (1H, s, OH).

^{13}C BMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 55.2, 55.5, 103.9, 109.9, 110.5, 111.4, 111.9,
5 120.2, 121.6, 131.6, 148.5, 149.9, 152.2, 153.6, 154.7, 155.5.

10 pavyzdys. 4-(5-etil-2,4-dihidroksifenil)-5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazolo (**3e**) gavimas.

Sintezė atliekama pagal metodiką, pateiktą 6 pavyzdyje, pradedant nuo 1-(5-etil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-etoksifenil)etanono hidrazono **2e** (0.10 g, 0.33 mmol).

Išeiga 65%, ruda amorfinė medžiaga, lyd.t. 65 – 66°C.

^1H BMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ m.d. 1.08 (3H, t, J = 6.6 Hz, CH₃), 1.319 (3H, t, J = 7 Hz, CH₃), 2.44 (2H, k, J = 6.6 Hz, CH₂), 4.03 (2H, k, J = 7.5 Hz, OCH₂), 5.87 (1H, pl.s. OH), 6.47 (1H, s, ArH), 6.94 (2H, d, J = 7.5 Hz, ArH), 7.99 (1H, s, ArH), 7.31 (2H, d, J =
15 7.5 Hz, ArH), 10.02 (1H, s, OH).

Junginiai, kurių bendra formulė yra (I), aromatiniuose žieduose turintys įvairius pakaitus ($R = \text{Br}, \text{I}, \text{OCH}_3, R_1, R_2 = \text{OC}_3\text{H}_7, \text{OC}_3\text{H}_7, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_4\text{H}_9, \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}, \text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}$ ir kt.) gali būti susintetinti pagal metodiką, analogiška junginių (**3a-e**) sintezės metodikai, pradiniais junginiais naudojant 1-(5-pakeistus-2,4-dihidroksifenil)-2-(3,4-dipakeistusfenil)etanonus.

11 pavyzdys. Hsp90 slopinimo ir jungimosi įvertinimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu (Chaires, J. B. 2008. Annu. Rev. Biophys. 37: 135-51) įvertintas Hsp90 *N*-galinio domeno jungimasis su išradimo slopikliais. Rezultatų iliustravimui Fig. 1 pateikti Hsp90 *N*-galinio domeno (50 mM Hepes buferis, 100 mM NaCl, pH 7.5, 37 °C) jungimosi su išradimo junginiu (**3b**) tyrimo izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu būdingi rezultatai. Baltymo koncentracija kalorimetro kiuvetėje buvo
30 6 μM . Ligando koncentracija švirkšte buvo 120 μM . Fig. 2 pateikti tie patys duomenis kaip ir Fig 1. integralinėje formoje. Jungimosi konstanta $1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ nustatyta esant stochiometrijai 0.97. Tai yra disociacijos konstantos, lygios 7.5 nM, ekvivalentas. Tokių stiprių jungimosi konstantų nustatymas yra ties prietaisų galimybių riba. Taigi, jos gali būti kiek nepakankamai įvertintos. Labai stačios izoterminio titravimo kreivės rodo labai aukštą

junginio jungimasi ir tai, kad išradimo junginiai galėtų būti labai geri galimi kandidatai Hsp90 aktyvumui in vitro slopinti.

Įvairių junginių jungimosi prie abiejų baltymo struktūrinių fragmentų (N-terminalinio domeno Hsp90N ir viso ilgio baltymo Hsp90F) konstantos buvo nustatomos 37 °C temperatūroje ir yra pateiktos žemiau.

Junginių, besijungiančių prie Hsp90 N-galinio domeno (Hsp90N), disociacijos konstantos (K_d), nustatytos titravimo kalorimetrijos metodu, yra tokios: junginiui **3a** - 0.016 ± 0.004 μ M, junginiui **3b** - 0.035 ± 0.008 μ M, junginiui **3c** - 0.017 ± 0.006 μ M, junginiui **3d** - 0.034 ± 0.003 μ M, ir junginiui **3e** - 0.029 ± 0.002 μ M. Analogiškai, junginių besijungiančių prie Hsp90 viso ilgio baltymo (Hsp90F) disociacijos konstantos yra tokios: junginiui **3a** - 0.039 ± 0.018 μ M, junginiui **3b** - 0.014 ± 0.001 μ M, junginiui **3c** - 0.011 ± 0.007 μ M, junginiui **3d** - 0.057 ± 0.002 μ M, ir junginiui **3e** - 0.031 ± 0.005 μ M.

12 pavyzdys. Augimo slopinimo konstantų (GI_{50}) nustatymas.

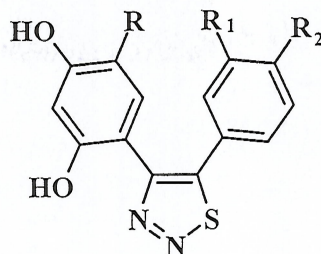
Išradimo junginių augimo slopinimo konstantos buvo nustatomos naudojant dvi vėžinių ląstelių linijas: U2OS (osteosarkoma) ir HeLa (cervikalinė karcinoma). Ląstelės buvo išlaikomos DMEM (HeLa) ir 50-50% DMEM ir F-12 terpės mišinyje (U2OS) papildant 10% jaučio embrioniniu serumu. Tiriamų junginių tirpalai (20mM) buvo ruošiami 100% dimetilsulfoksido (DMSO). Ląstelės auginamos lėkštelėse (24 šulinėlių), buvo veikiamos įvairių tiriamų junginių koncentracijų tirpalais (50mM - 0.05mM) 0.25% DMSO-de. Po trijų dienų, ląstelių gyvybingumas buvo nustatomas su XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-karboksianilido natrio druska) ir PMS (fenazino metosulfato) reagentais (Scudiero et al. 1988. *Cancer Res.* 48, 4827-4833). XTT (1mg/ml) ir PMS (1.53 mg/ml) tirpalai buvo ruošiami Hank'o buferio fiziologiniame tirpale (HBS). Kultūrų terpė kiekvienoje lėkštelėje buvo keičiama 100 μ l OptiMEM terpe (Life technologies), į kurios sudėtį įeina 35 μ g/ml XTT ir 0.27 μ g/ml PMS. Ląstelės buvo gražintos į inkubatorių 15-20 min. Gyvybingų ląstelių kiekis kiekviename šulinėlyje buvo nustatomas spektrofotometriškai matuojant XTT formazano absorbciją prie 470 nm. Kiekvienas eksperimentas buvo dubliuojamas. Įvairių junginių augimo slopinimo konstantos U2OS (osteosarkoma) ląstelių atžvilgiu buvo tokios: junginiui **3a** - 8.4 ± 1.2 μ M, junginiui **3b** - 15.1 ± 3.4 μ M, junginiui **3c** - 7.1 ± 0.1 μ M, junginiui **3d** - 11.5 ± 0.1 μ M, junginiui **3e** - 0.65 ± 0.08 μ M. Analogiškai, GI_{50} konstantos HeLa (cervikalinė karcinoma) ląstelių atžvilgiu buvo: junginiui **3a** - 2.5 ± 0.1 μ M, junginiui **3b** - 4.2 ± 0.4 μ M, junginiui **3c** - 3.3 ± 0.1 μ M, junginiui **3d** - 3.6 ± 0.3 μ M, junginiui **3e** - 0.70 ± 0.04 μ M. Toks didelis junginių

efektyvumas slopinant vėžinių ląstelių augimą ir gyvybingumą rodo, kad išradimo junginiai yra potencialiai vieni svarbiausių kandidatų terapiniam priešvėžiniam poveikiui tirti.

- 5 Aukščiau parašyti junginiai efektyviai jungiasi prie Hsp90 ir veiksmingai slopina vėžinių ląstelių augimą. Naujų junginių efektyvumas yra to paties lygio ir aukštesnis, nei kitų patentuotų junginių. Tačiau siūlomų junginių sintezė yra žymiai paprastesnė ir ekonomiškesnė negu panašaus slopinimo lygio patentuotų junginių.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. 5-aril-4-(5-pakeistieji 2,4-dihidroksifenil)-1,2,3-tiadiazolai, kurių bendroji formulė (I)



(I)

- 5 kur R yra H, Cl, Br, I, CH₃, C₂H₅, OCH₃ ;
 R₁ ir R₂ yra tie patys ar skirtingi pakaitai, pasirinkti iš grupės, susidedančios iš H, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉, OCH₃, OC₂H₅, OC₃H₇, O(CH₂)₂O, O(CH₂)₃O, ir jų farmaciniu požiūriu priimtinos druskos
- 10 2. Junginiai pagal 1 punktą, pasirinkti iš grupės, apimančios:
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-metoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-etoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-metilfenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 4-[6-(4-chlor-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(3,4-dimetoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą;
 15 4-[6-(4-etil-1,3-dihidroksifenil)]-5-[4-(4-etoksifenil)]-1,2,3-tiadiazolą,
 pasižymintys Hsp90 slopinimu.
- 20 3. 5-chlor-2,4-dihidroksifenil-4-metoksibenzilketono hidrazonas – tarpinis junginys, naudingas tiadiazolams bendrosios formulės (I) gauti.
4. 5-chlor-2,4-dihidroksifenil-4-etoksibenzilketono hidrazonas - tarpinis junginys, naudingas tiadiazolams bendrosios formulės (I) gauti.
5. 5-chlor-2,4-dihidroksifenil-4-metilbenzilketono hidrazonas - tarpinis junginys, naudingas tiadiazolams bendrosios formulės (I) gauti.
- 25 6. 5-chlor-2,4-dihidroksifenil-3,4-dimetoksibenzilketono hidrazonas - tarpinis junginys, naudingas tiadiazolams bendrosios formulės (I) gauti.

7. 5-chlor-2,4-dihidroksifenil-4-etoksibenzilketono hidrazonas tarpinis junginys, naudingas tiadiazolams bendrosios formulės (I) gauti..
- 5 8. Kompozicija, skirta būklėms, kuriose reikalingas Hsp90 šaperono slopinimas, kontroliuoti, besiskirianti tuo, kad turi tiadiazolo pagal vieną iš 1-2 punktų veiksmingą kiekį.

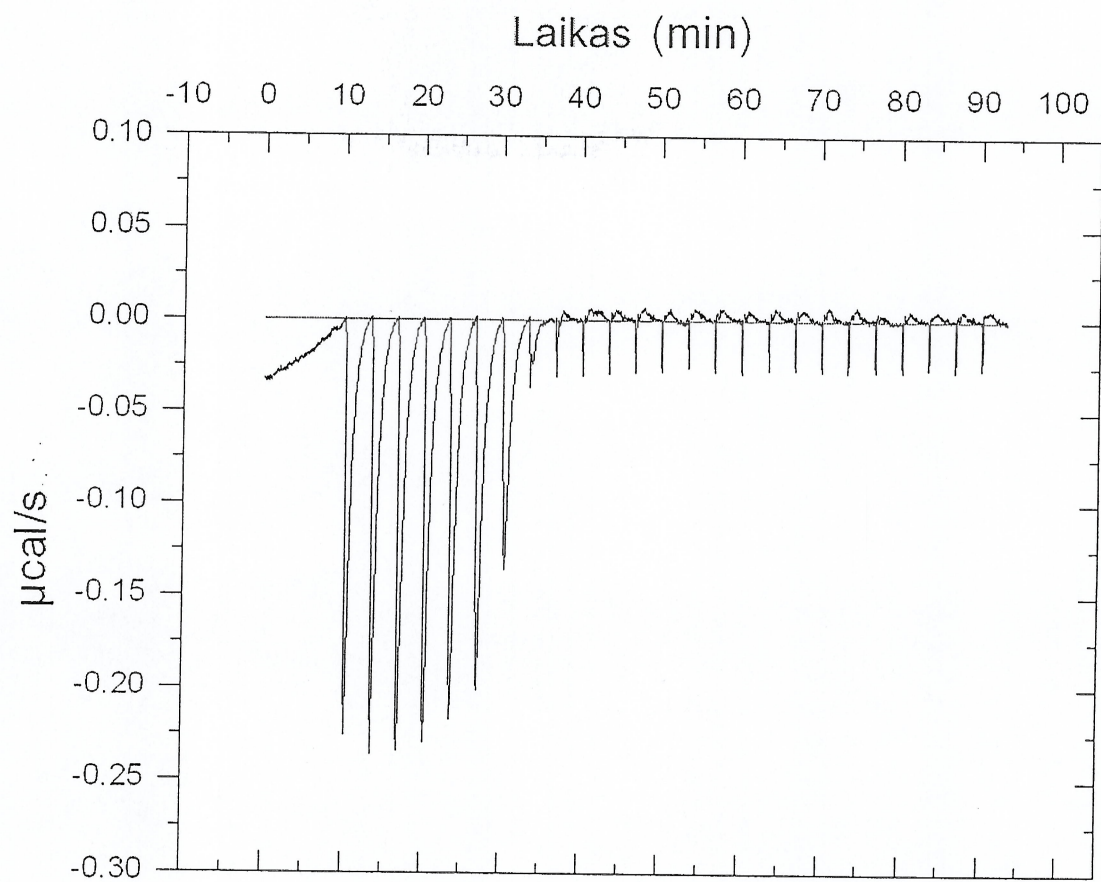


Fig. 1

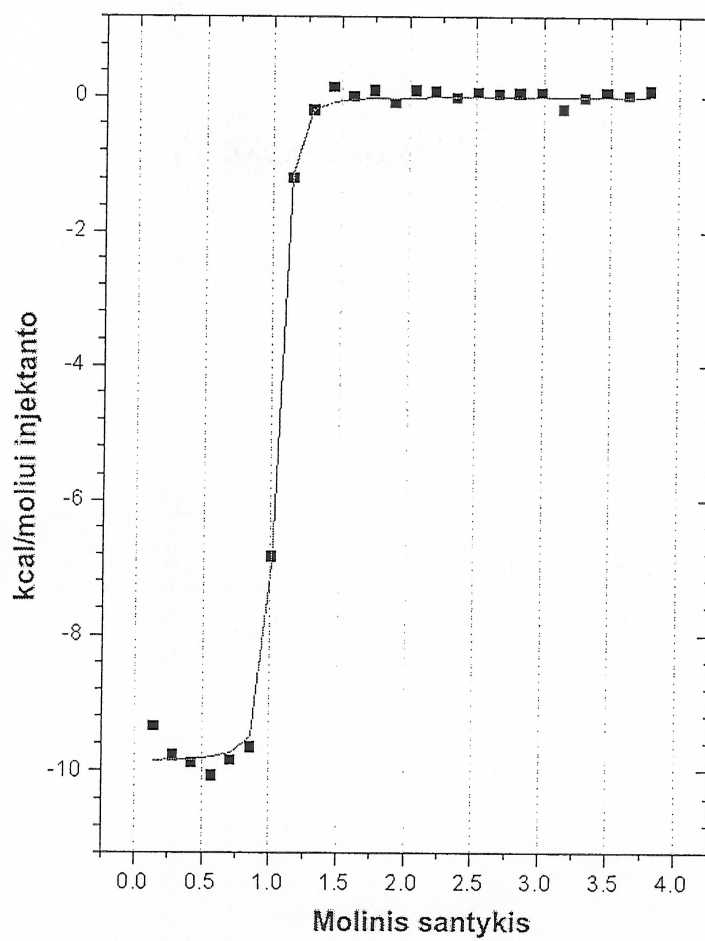


Fig. 2

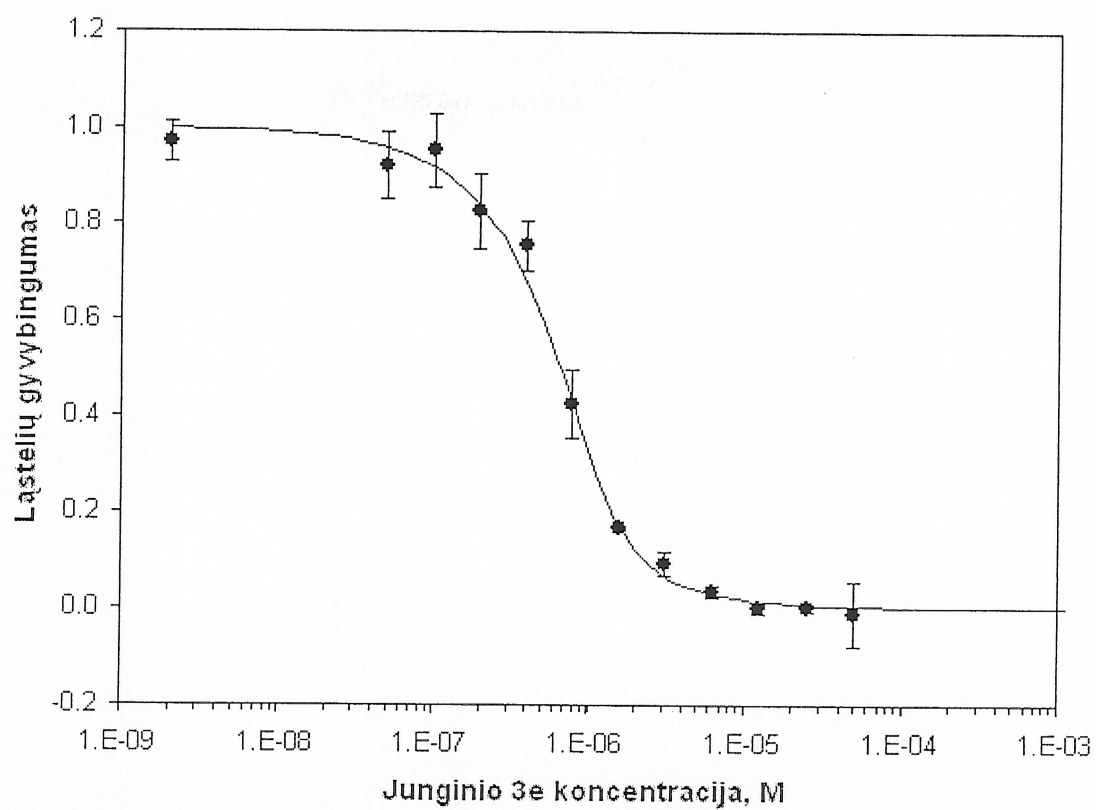


Fig. 3