



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **143265** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
A61K 31/425 (2006.01)
C07D 277/00
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

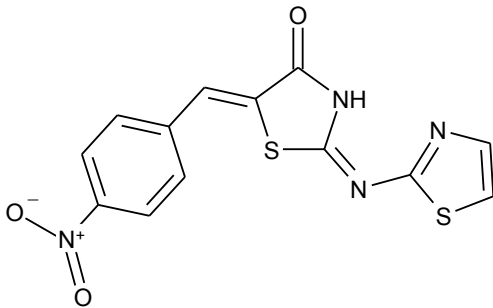
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| <p>(21) Номер заявки: u 2019 10680</p> <p>(22) Дата подання заявки: 28.10.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.07.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.07.2020, Бюл.№ 14</p> | <p>(72) Винахідник(и): Міщенко Марія Віталіївна (UA), Штриголь Сергій Юрійович (UA), Лесик Роман Богданович (UA), Камінський Данило Володимирович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p> |
|--|--|

(54) 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон, що виявляє антиконвульсантну активність

(57) Реферат:

5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон



що виявляє антиконвульсантну активність.

UA 143265 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме нової індивідуальної хімічної сполуки з біологічною активністю, зокрема антиконвульсантною.

Епілепсія - одне з найпоширеніших захворювань мозку, яке вражає понад 70 мільйонів людей у всьому світі та характеризується стійкою схильністю до розвитку спонтанних епілептичних випадків і має численні нейробіологічні, когнітивні та психосоціальні наслідки [1]. Розповсюдженість епілепсії у розвинутих країнах складає 5-10 випадків на 1000 населення, у країнах СНД - від 0,96 до 10 на 1000 населення. У Європі на епілепсію страждає 6 млн. осіб, з них 40 % не отримує належного лікування [2]. За останніми даними Міністерства охорони здоров'я станом на 2019 рік в Україні налічується близько 100 000 хворих на епілепсію [5].

Не зважаючи на широкий вибір протиепілептичних препаратів, близько 30 % хворих страждають на фармакорезистентну форму Епілепсії [6], при якій терапія протисудомними засобами не є ефективною.

Протиепілептичні препарати, які представлені на сучасному фармацевтичному ринку, чинять вплив лише на окремі типи епілептичних нападів [7], універсальні ж препарати, які ефективні при всіх типах епілептичних нападів, дотепер відсутні.

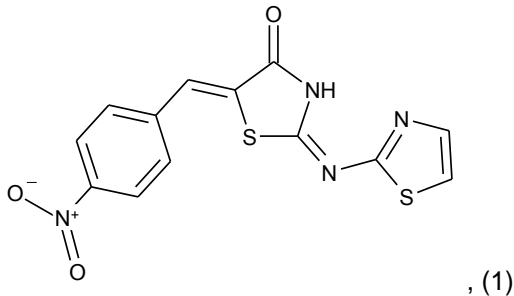
Відомий препарат Вальпроат натрію, що має протисудомні властивості на різних моделях експериментальної епілепсії (з генералізованими та фокальними судомами). Хоча вальпроат натрію вважається відносно безпечним препаратом, при його застосуванні нерідко виникають серйозні побічні реакції, такі як ураження печінки, випадіння волосся, диспепсичні розлади, збільшення ваги тіла, тромбоцитопенія, а також вроджені дефекти - ущелина хребта [8].

Ще одним відомим препаратом є Карбамазепін - синтетичний лікарський препарат, який за своєю хімічною структурою є похідним трициклічного іміностільбену, та належить до протисудомних препаратів. Карбамазепін досить широко застосовується у фармакотерапії епілепсії, однак, при його застосуванні побічні ефекти виникають досить часто (за деякими оцінками, від 25 до 50 % випадків застосування препарату). Найчастішими побічними ефектами карбамазепіну є побічні ефекти з боку нервової системи - атаксія, когнітивні порушення; часто спостерігаються шлунково-кишкові розлади, тремор, висип на шкірі, порушення зору. Частота виражених побічних ефектів, що потребують відміни фармакотерапії, при прийомі фенобарбіталу складає 22 %, при лікуванні фенітоїном - 9 %, карбамазепіном - 4-11 % та вальпроатом натрію - 5 % [8].

Тому пошук нових хімічних сполук з вираженою антиконвульсантною активністю, з високою ефективністю та низькою токсичністю є актуальною проблемою сучасної фармації.

В основу корисної моделі поставлена задача створення нової хімічної сполуки, що виявлятиме виражений антиконвульсантний ефект та може використовуватись як активний фармацевтичний інгредієнт для створення нових лікарських засобів.

Поставлена задача вирішується шляхом синтезу індивідуальної хімічної сполуки 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон загальної формули:



що виявляє антиконвульсантну активність.

Синтезована сполука є яскраво-помаранчевим кристалічним порошком, розчинним в ДМФА та ДМСО, малорозчинним в оцтовій кислоті та нерозчинним в етанолі, воді та діетиловому етері.

Для доказу складу і структури синтезованої сполуки були використані фізико-хімічні методи, зокрема елементний аналіз (прилад Perkin-Elmer 2400 CHN analyzer), спектроскопія ¹H ЯМР (прилад Varian Gemini, 400 MHz) та хромато-мас-спектрометрія (прилад Agilent 1100). Результати досліджень свідчать про відповідність отриманої структури заявлених.

Заявлену сполуку синтезовано шляхом взаємодії 2-хлороацетамідотіазолу з тіоціанатом амонію з наступними спонтанними реакціями гетеророциклізації та перегрупування в похідне 4-тіазолідинону.

Антиконвульсантну активність заявленої сполуки вивчали відповідно до методичних рекомендацій [3, 4]. Скринінгове дослідження проводили у два етапи: на моделях судом,

спричинених пентилентетразолом (PTZ) та максимальним електрошоком (МЕНІ), які характеризуються різним механізмом розвитку [4].

Досліди проводили на 78 білих нелінійних мишах обох статей масою 18-25 г, яких утримували за стандартних санітарно-гігієнічних умов у віварії Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету. Під час виконання експерименту дотримано норми та принципи, затверджені Гельсінською декларацією щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.) та Директивою Ради Європейського Союзу щодо захисту тварин, що використовуються з науковою метою (2010 р.).

Тварини були рандомізовані на групи: 1 група - контроль патології (судомний синдром без лікування); 2 група - миші, що отримували референс-препарат та 3 група тварин, яким вводили заявлену сполуку.

Тварини отримували заявлену сполуку одноразово у вигляді тонкої суспензії, стабілізованої полісорбатом-80 (Твін-80), у дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково.

За умов PTZ тесту, у якому судоми виникають за рахунок пригнічення ГАМК-ергічних гальмівних процесів. Як препарат порівняння використовували вальпроат натрію (Депакін, Санофі-Авентіс, Франція) внутрішньошлунково у дозі 300 мг/кг [3, 4] у вигляді сиропу для перорального застосування. У групі контролю патології тварини отримували воду очищену внутрішньошлунково у відповідному об'ємі, після чого через 30 хв вводили PTZ (Коразол, Sigma, США) у вигляді водного розчину у дозі 90 мг/кг підшкірно. Після цього кожну мишу вміщували в окремий циліндричний пластиковий контейнер об'ємом 5 л та безперервно спостерігали за твариною протягом 60 хв.

Тест МЕШ використано для дослідження здатності заявленої сполуки запобігати генералізації судомного нападу. Електричний струм, проходячи через корнеальні електроди, вибірково впливає на структури з найменшим порогом збудливості. Здатність препарату попереджувати судоми під впливом електрошоку пов'язана з його властивістю запобігати поширенню імпульсу нервовою тканиною. Як препарат порівняння у тесті МЕШ використано карбамазепін (Фінлепсин, TEVA, Ізраїль/Польща - табл. 200 мг/кг) внутрішньошлунково у дозі 40 мг/кг у вигляді тонкої водної суспензії, стабілізованої твіном-80.

Антиконвульсантну активність оцінювали за такими показниками: відсоток тварин з клонічними та тонічними судомами, тяжкість судом у балах (1 бал - поодинокі здригання, 2 бали - "манежний" біг, 3 бали - клонічні судоми, 4 бали - клоніко-тонічні судоми, 5 балів - тонічна екстензія та 6 балів - тонічна екстензія, яка призвела до загибелі тварини), час перебування тварини у тонічній екстензії та у стані клоніко-тонічних судом, тривалість життя до загибелі тварини та летальність.

Статистичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерної програми Statistica 10.0 методами варіаційної статистики, розраховуючи середнє значення та його стандартну похибку. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за параметричним критерієм Стьюдента (t) у разі нормального розподілу та за непараметричним критерієм Манна-Вітні (U) при його відсутності. Результати у альтернативній формі оцінювали з використанням кутового перетворення Фішера (ω) [6]. Результати дослідження наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону на перебіг пентилентетразолових судом у мишей ($M \pm m$)

| Показники | Контроль патології (пентилентетразол, 90 мг/кг), n=16 | Вальпроат натрію (300 мг/кг), n=12 | Заявлена сполука (100 мг/кг), n=9 |
|--|---|------------------------------------|-----------------------------------|
| Латентний період, хв. | 3,7±0,46 | 13,12±9,39 | 24,57±8,94** |
| Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу | 1,81±0,19 | 2,33±0,67 | 1,11±0,31 |
| % мишей з судомами | | | |
| - клонічними | 100 | 83,33* | 66,67** |
| - тонічними | 93,75 | 83,33 | 55,56** |
| Тяжкість судом, бали | 5,81±0,19 | 4,33±0,96* | 3,44±0,93** |
| Тривалість судомного періоду, хв | 7,10±1,92 | 9,01±2,82 | 7,02±2,17 |
| Час життя тварин до загибелі, хв | 10,99±2,09 | 15,67±2,41 | 14,44±2,99 |
| Летальність, % | 93,75 | 50,00* | 44,44** |

Примітки. Статистично значущі відмінності з групою контролю патології: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Згідно з результатами вивчення антиконвульсантної активності на моделі судом індукованих PTZ (табл. 1) заявлена сполука з достовірною вірогідністю ($p < 0,01$) подовжує тривалість латентного періоду більш ніж 6,5 разу щодо до групи контролю патології. На фоні застосування 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону статистично значуще ($p < 0,01$) знижується відсоток тварин з клонічними та тонічними судомами на 33,4 % та 38,2 % відповідно, що перевершує активність препарату порівняння вальпроату натрію. При введенні заявленої сполуки тяжкість судом зменшується на 40,8 % ($p < 0,01$) порівняно з відповідним показником контролю патології. Зниження летальності є основним інтегральним показником антиконвульсантної активності при проведенні скринінгового дослідження. Заявлена сполука статистично значуще знижувала летальність тварин у 2,1 разу порівняно з такою у групі контролю патології та не поступалася препарату порівняння вальпроату натрію. Таким чином, 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон виявляє виражений антагонізм до PTZ, що свідчить, зокрема, про її вплив на ГАМК-ергічну інгібувальну нервову передачу.

Результати другого етапу дослідження на моделі МЕШ представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону на перебіг судом у мишей на моделі МЕШ ($M \pm m$)

| Показники | Контроль патології (МЕШ), n=15 | Карбамазепін (40 мг/кг), n=14 | Заявлена сполука (100 мг/кг), n=12 |
|--|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| % мишей з судомами: | | | |
| клонічними | 100 | 100 | 100 |
| тонічними | 100 | 42,86** | 50** |
| Тяжкість судом, бали | 5,73±0,18 | 3,57±0,23** | 4,00±0,37** |
| Тривалість судомного періоду (тонічна екстензія), хв | 0,21±0,03 | 0,03±0,03** | 0,05±0,03** |
| Час виходу з бічного положення, хв | 0,41±0,13 | 0,59±0,21 | 0,39±0,09 |
| Час життя тварин до загибелі, хв | 0,25±0,02 | 0,35 | 0,21±0,02 |
| Летальність, % | 86,67 | 7,14** | 25,00** |
| Примітки. Достовірні відмінності з групою контролю патології: *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$. | | | |

Досліджувана субстанція порівняно з групою контролю патології з достовірною вірогідністю ($p < 0,01$) зменшувала кількість тварин з тонічними судомами на 50 %. На фоні застосування 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону статистично значуще ($p < 0,01$) зменшувалася тяжкість судом у 1,4 разу та скорочувалася тривалість перебування тварин у тонічній екстензії у 4,2 разу порівняно з групою контролю патології. Летальність під дією субстанції знижувалася на 61,7 % порівняно з показником групи тварин, які не отримували досліджувану сполуку. За всіма показниками антиконвульсантна активність заявленої сполуки статистично не поступалася препарату порівняння карбамазепіну. Таким чином, 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон виявляє виразний протисудомний ефект та має здатність запобігати поширенню імпульсу нервовою тканиною.

Отже, на основі результатів проведених досліджень заявлена субстанція 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону у дозі 100 мг/кг виявила антиконвульсантні властивості за рахунок посилення процесів гальмування у ЦНС.

Для розуміння запропонованої корисної моделі нижче наведено приклад одержання 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону.

2-(Тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон. У круглодонну колбу із зворотнім холодильником помішують 10 ммоль 2-хлороацетамідотіазолу (1.76 г, 10 ммоль), тіоціанату амонію (1.52 г, 20 ммоль) і 30 мл ацетону. Реакційну суміш кип'ятять протягом трьох годин і охолоджують. Надлишок ацетону відганяють у вакуумі водоструйного насосу і залишок розтирають з 50 мл води. Продукт реакції відфільтровують, промивають спиртом і перекристалізують з бутанолу або оцтової кислоти. Вихід 78 %, $T_{\text{топл.}} = 188-191 \text{ }^\circ\text{C}$. $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{OS}_2$: вираховано (%): С 36.17, Н 2.53, N 21.09; знайдено (%): С 36.10, Н 2.40, N, 21.30. Спектр ^1H ЯМР (δ , м.ч.; J, Гц): 4.00 (с, 2H, CH_2), 7.40 (д, 1H, J=5.1 Гц, тіаз.), 7.60 (д, 1H, J=5.1 Гц, тіаз.), 12.10 (шс, 1H, NH).

5-[(Z)-(4-Нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон. Суміш 2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону (1.0 г, 5 ммоль), 4-нітробензальдегіду альдегіду (0.76 г, 5 ммоль) та безводного ацетату натрію (0.41 г, 5 ммоль) у оцтовій кислоті (30 мл) кип'ятять у колбі із зворотним

холодильником протягом 3 год. Осад, одержаний після повного охолодження, відфільтровують, промивають метанолом і перекристалізують з суміші ДМФА - етанол (1:2). Вихід 80 %, $T_{\text{топл.}} = 230$ °C. $C_{13}H_8N_4O_3S_2$: вираховано (%): C 46.98, H 2.43, N 16.86; знайдено (%): C 47.10, H 2.30, N, 16.70. Спектр 1H ЯМР (δ , м.ч. J, Гц): 7.52 (шс, 1H, тiaz.), 7.72 (шс, 1H, тiaz.), 7.81 (с, 1H, =CH), 7.88 (д, 2H, J=8.4 Гц, аром.), 8.38 (д, 2H, J=8.4 Гц, аром.), 12.86 (шс, 1H, NH); LCMS: m/z 333.0 (100.0 %, [M+H]⁺).

Таким чином запропонована нова хімічна сполука, що виявляє виражений антиконвульсантний ефект та може використовуватись як активний фармацевтичний інгредієнт для створення нових лікарських засобів.

Джерела інформації:

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-82.

2. Epilepsy must become a higher priority in Europe// *The Lancet Neurology*.-2010.-V. 9 (Is. 10).-P. 941

3. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: методичні рекомендації/ Під ред... акад. М. Я. Головенко, проф. Л.О. Громова. - К.: ДЦ МОЗ України, 2003.-46 с

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева и др. - М.: Гриф и К.-2012.-944 с.

5. Що треба знати про епілепсію і як надати першу допомогу: Міністерство охорони здоров'я України, 26 березня 2019 URL: <https://moz.gov.ua/article/health/scho-treba-znati-pro-epilepsiju-i-jak-nadati-pershu-dopomogu> (Дата звернення: 15.09.2019).

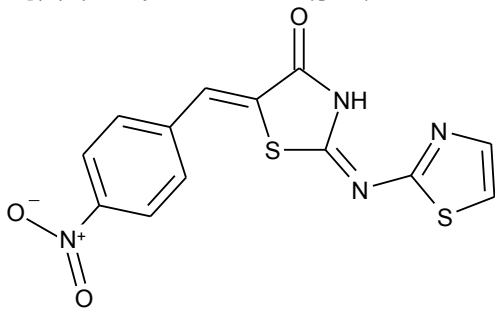
6. Epilepsy: World Health Organization 8 February 2018 URL: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> (Date of access: 15.09.2019).

7. Клиническая фармакология: национальное руководство / под ред. Ю. Б. Белоусова, В. Г. Кукеса, В. К. Лепихина, В. И. Петрова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.-976 с.

8. Treatment outcome and associated factors among patients with epilepsy / Niriayo, Y. L., Мато, А., Kassa, T. D., et al. // *Scientific reports*.-2018. - Vol. 8(1).-P. 17354.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинон



що виявляє антиконвульсантну активність.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601