УКРАЇНА

(19) UA (11) 140537 (13) U

(51) МПК (2020.01)
*C07C 335/02* (2006.01)
*C07D 219/10* (2006.01)
**A61K 31/00**
*A61P 9/10* (2006.01)
*A61P 17/18* (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **a 2019 08852**

(22) Дата подання заявки: **22.07.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.03.2020**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.03.2020, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):
**Драпак Ірина Володимирівна (UA),**
**Зіменковський Борис Семенович (UA),**
**Перехода Ліна Олексіївна (UA),**
**Серединська Наталія Миколаївна (UA),**
**Демченко Анатолій Михайлович (UA),**
**Голота Сергій Миколайович (UA),**
**Нєктєгаєв Ігор Олексійович (UA)**

(73) Власник(и):
**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**,
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)

# (54) [3-АЛІЛ-4-(4[1]-МЕТОКСИФЕНІЛ)-3Н-ТІАЗОЛ-2-ІЛІДЕН]-(3[2]-ТРИФЛУОРОМЕТИЛФЕНІЛ)АМІНУ ГІДРОБРОМІД (КАРДІАЗОЛ), ЩО ПРОЯВЛЯЄ КАРДІОПРОТЕКТОРНУ ТА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ

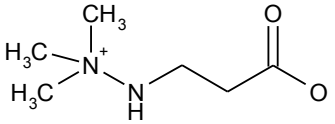
**(57)** Реферат:

[3-Аліл-4-(4[1]-метоксифеніл)-3Н-тіазол-2-іліден]-(3[2]-трифлуорометилфеніл)аміну гідробромід (кардіазол), що проявляє кардіопротекторну та антиоксидантну активність.

UA 140537 U

Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активної сполуки, яка проявляє кардіопротекторну та антиоксидантну активність та може бути використана як кардіопротекторний лікарський засіб.

Як найближчий аналог за фармакологічною дією та хімічною структурою нами вибраний лікарський засіб мельдоній (мілдронат) 2-(2-карбоксилатоетил)-1,1,1-триметилгідразиній формули:



.

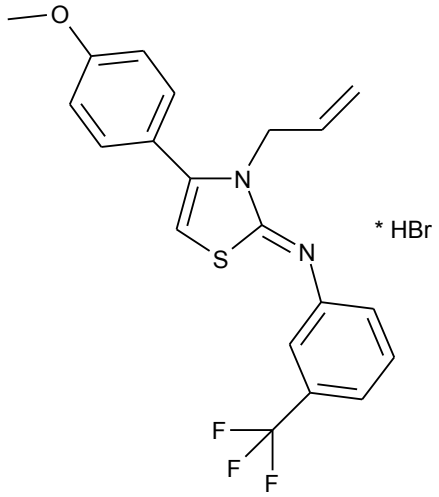
Мельдоній - це синтетичний лікарський засіб, що є конкурентним інгібітором ферменту γ-бутиробетаїнгідроксилази, який каталізує процес перетворення гамма-бутиробетаїну в карнітин. Мельдоній є попередником карнітину, структурним аналогом гамма-бутиробетаїну, в якому один атом вуглецю заміщений на атом азоту. Мельдоній, оборотно інгібуючи гамма-бутиробетаїнгідроксилазу, зменшує біосинтез карнітину і тому перешкоджає транспортуванню довголанцюгових жирних кислот через оболонки клітин, таким чином перешкоджаючи накопиченню в клітинах сильного детергента - активованих форм неокислених жирних кислот. Таким чином запобігається ушкодження клітинних мембран. При зменшенні концентрації карнітину в умовах ішемії затримується (3-оксидація жирних кислот та оптимізується споживання кисню в клітинах, стимулюється окислення глюкози і поновлюється транспортування АТФ від місць його біосинтезу (мітохондрії) до місць споживання (цитозоль). Таким чином, клітини забезпечуються поживними речовинами і киснем, а також оптимізується використання цих речовин. В свою чергу, при збільшенні біосинтезу попередника карнітину, активізується NO-синтетаза, в результаті чого поліпшуються реологічні властивості крові і зменшується периферичний опір судин. При зменшенні концентрації мельдонію біосинтез карнітину знову посилюється і в клітинах поступово збільшується кількість жирних кислот. Вважається, що в основі ефективності дії мельдонію лежить підвищення толерантності до клітинного навантаження (при зміні кількості жирних кислот). Мельдоній має дію аналогічну до γ-бутиробетаїну та підтримує енергетичний метаболізм серця та інших органів. Механізм дії мельдонію визначає широкий спектр його фармакотерапевтичних властивостей. Мельдоній підвищує силу скорочень серцевого м'яза, знижує частоту нападів стенокардії, а також підвищує толерантність організму до фізичних навантажень. При гострих ушкодженнях міокарда застосування мельдонію уповільнює утворення некротизованих зон, скорочує тривалість періоду реабілітації, нормалізує кровообіг в осередку ішемічного ушкодження [Nikolajs Sjakste, Aleksandrs Gutcaits and Ivars Kalvinsh Mildronate: An Antiischemic Drug for Neurological Indications. CNS Drug Reviews, Vol. 11, No. 2, 2005, p. 151-168].

Проте застосування мельдонію може супроводжуватися розладами у вигляді алергічних реакцій, зниження артеріального тиску, диспептичних розладів, тахікардії, підвищення збудження, спазмів м'язів, головного болю, запаморочення, втрати свідомості, порушення сну. [Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity/Dambrov M., Makrecka-Kuka M., Vilskersts R., et al. Pharmacological research.2016.Vol. 113. P.771-780].

Тому, пошук нових синтетичних кардіопротекторних засобів є надзвичайно актуальним.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нової речовини, що проявляє високу кардіопротекторну та антиоксидантну активність.

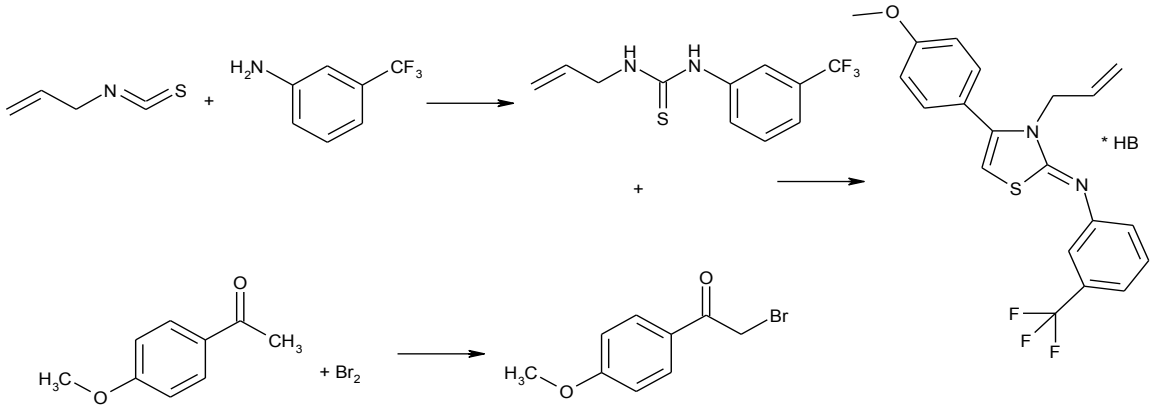
Поставлена задача вирішується шляхом синтезу нової хімічної сполуки - [3-аліл-4-($4^1$-метоксифеніл)-3Н-тіазол-2-іліден]-($3^2$-трифлуорометилфеніл)аміну гідробромід (умовна назва Кардіазол) загальної формули:



,

що проявляє кардіопротекторну та антиоксидантну дію.

Заявлену сполуку [3-аліл-4-(4[1]-метоксифеніл)-3Н-тіазол-2-іліден]-(3[2]-трифлуорометилфеніл)аміну гідробромід (умовна назва Кардіазол) одержують за схемою:



.

Синтез [3-аліл-4-(4[1]-метоксифеніл)-3Н-тіазол-2-іліден]-(3[2]-трифлуоро-метил-феніл)аміну гідроброміду: до розчину 1,9 г (0,0073 моль) N[1]-аліл-N[2]-(3'-трифлуорометилфеніламіно)тіосечовини (одержували кипятінням із зворотним холодильником протягом 2 год. 1,94 мл ізотіоціанатопропену в 10 мл етанолу та 2,49 мл 3-флуорометил феніл аміну) в 40 мл етанолу при перемішуванні додають 1,7 г (0,0073 моль) а-бром-4-метоксіацетофенону (одержують бромуванням 4-метоксіацетофенону) та кип'ятять із зворотним холодильником 3 години. Після охолодження осад, що випав, відфільтровують. Кристалізують із етанолу.

Вихід 1,8 г (76,5 %), Т.пл.=211 °С.

Знайдено, %: N=5.81 $C_{20}H_{18}BrF_3N_2OS$.

Вирахувано, %: N=5.94.

Спектр ПМР (ДМСО-$d_6$, ТМС): 3,87 (с, 3Н, $OCH_3$), 4,32 (м, 2Н, $CH_2$), 499 та 5.14 (д-д, 2Н, $CH_2$=CH-), 5,84 (м, 1Н, $CH_2$=CH-), 6,98 та 7.27 (д-д, 4Н, $C_6H_4$), 7,16-7,45 (м, 5Н, 5-Н+$C_6H_4$).

Для доказу складу і структури синтезованої сполуки були використані відомі фізико-хімічні методи, зокрема ПМР-спектроскопія та елементний аналіз. Одержані результати свідчать про відповідність синтезованої сполуки заявленій.

Вивчення кардіопротекторних властивостей Кардіазолу проводили на білих нелінійних щурах-самцях, масою 180-220 г, з використанням адреналінової моделі інфаркту міокарда [Маркова О.О. Міокардіодистрофія і реактивність організму. - Т.: Укрмедкнига, 1998.- 152 с.; Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод, рек. /За ред. О.В. Стефанова. - К.: "Авіцена", 2001. - 528 с.]. Зазначена модель за сукупністю чинників є найбільш оптимальною для вивчення кардіопротекторних властивостей органічних сполук і може бути використана для скринінгових досліджень. Експериментальні тварини були розділені на 4 групи по 6 щурів у кожній: 1 група - інтактний контроль - тварини отримували фізіологічний ізотонічний розчин хлориду натрію; 2

група - модельна патологія - одноразове внутрішньоочеревинне введення 0,18 %-го розчину адреналіну гідрохлориду ("Дарниця", Україна) в дозі 1 мг/кг маси тіла тварини; 3 група - за 1 год. до одноразового введення розчину адреналіну гідрохлориду тваринам вводили перорально Кардіазол в дозі 50 мг/кг; 4 група - за 1 год. до одноразового введення розчину адреналіну гідрохлориду тваринам вводили перорально мельдоній дигідрат (мілдронат) ("Grindex", Латвія) в дозі 100 мг/кг. Через 24 год. після індукції інфаркту міокарда розчином адреналіну тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. Розвиток інфаркту та ефективність застосування Кардіазолу моніторили за наступними параметрами: виживання тварин після введення адреналіну; визначення рівня в плазмі крові дослідних тварин лактатдегідрогенази (ЛДГ), МВ-фракції креатинфосфокінази (МВ-КФК), аспартатамінотрансферази (АСТ) на автоматичному біохімічному аналізаторі CORMAY ACCENT-200 з використанням відповідних реагентів (виробництво фірми CORMAY, Польща); визначення впливу Кардіазолу на процеси вільно-радикального окислення (ВРО) в міокарді; визначення наявності змін в кардіограмі дослідних тварин при моделюванні інфаркту міокарда та при застосуванні Кардіазолу. У тварин реєстрували ЕКГ шляхом накладання на кінцівки голкових електродів за загальноприйнятою схемою в стандартних відведеннях під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Аналіз ЕКГ проводився на комп'ютерному аналізаторі CardioCom-2000plus (ХАІ-медика, Україна).

Одноразове введення щурам 0,18 % розчину адреналіну гідрохлориду внутрішньоочеревинно в дозі 1 мг/кг викликало загибель частини тварин групи "модельна патологія" протягом перших 12 годин досліду. При розтині загиблих тварин даної групи спостерігалися патологічні зміни в грудній порожнині: легені були гіперемійовані, при розрізі і натисканні на легені з'являлася піниста рідина, шматочок легенів при зануренні плавав у товщі води; серце мало кулясту/сферичну форму, стінки серця були потовщені і трохи набряклі; в носовій порожнині спостерігалась значна кількість серозної рідини; в черевній порожнині патологічних змін не виявили. Перераховані патологоанатомічні зміни можуть вказувати на набряк легенів кардіогенної природи, що і стало основною причиною смерті. У тварин даної групи, які вижили, до завершення експерименту спостерігались ознаки загальмованості та млявості. Застосування Кардіазолу щурам в дозі 50 мг/кг запобігало загибелі тварин від адреналінового навантаження. Тварини, які отримували Кардіазол, поводилися як звичайно, відхилень в їх поведінці, споживанні корму та води відзначено не було. В групі тварин, які отримували мілдронат в дозі 100 мг/кг не спостерігали змін в поведінці та загибелі тварин.

У плазмі крові тварин групи "модельна патологія", які вижили після моделювання інфаркту міокарда, спостерігалось значне зростання рівнів АСТ у 4,2 разу, ЛДГ у 2,2 разу, МВ-КФК у 3,2 разу відносно групи інтактного контролю (Таблиця 1). В той же час, у тварин, які отримували перед моделюванням інфаркту міокарда Кардіазол, спостерігалось підвищення рівнів вищеперерахованих біохімічних маркерів в плазмі крові, проте це зростання було не таким суттєвим, як у випадку незахищених тварин У даній групі відмічалось зростання рівня АСТ в 1,7 разу, в порівнянні до групи інтактного контролю, що є в 2,4 разу менше в порівнянні до групи "інфаркт міокарда" (модельна патологія); зростання рівня ЛДГ в 1,3 разу в порівнянні до групи інтактного контролю, що є в 1,6 разу менше в порівнянні до групи "модельна патологія"; зростання рівня МВ-КФК в 1,6 разу, в порівнянні до групи інтактного контролю, що є в 1,9 разу менше в порівнянні до групи "модельна патологія". В групі тварин, які отримували мілдронат в дозі 100 мг/кг на фоні інфаркту міокарда, спостерігалось зниження рівнів АСТ на 69 %, ЛДГ на 48 %, КФК-МВ на 62 % в порівнянні до групи "модельна патологія".

Таблиця 1

Рівні АСТ, ЛДГ, МВ-КФК в плазмі крові білих щурів при застосуванні Кардіазолу на адреналіновій моделі інфаркту міокарда (дані представлені в вигляді M±m, n=6 в кожній групі)

| Тварини/Показники | АСТ, Од/л | ЛДГ, Од/л | КФК-МВ, Од/л |
|---|---|---|---|
| Інтактний контроль | 153,7±19,5 | 711,2±50,1 | 16,3±2,8 |
| Адреналіну гідротартрат, 4 мг/кг (інфаркт міокарда) | 644,7±31,8# | 1571,1±87,3# | 52,8±4,5# |
| Інфаркт міокарда+Кардіазол, 50,0 мг/кг | 269,7±21,2* | 953,6±49,9* | 27,2±2,6* |
| Інфаркт міокарда+мілдронат, 100,0 мг/кг | 203,6±18,9* | 820,3±31,3* | 20,4±3,0* |

Примітка: * - $p \leq 0,05$; - $p \leq 0,001$ відносно групи "інтактний контроль".

Для оцінки інтенсивності вільнорадикального окислення в міокарді визначали рівень маркерів окисної модифікації білка альдегідфенілгідразони (АФГ) і карбоксифенілгідразони (КФГ) в гомогенатах тканин за методом B. Halliwell за взаємодією окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) і утворенням АФГ і КФГ, що мають спектр поглинання при 274 нм і 363 нм відповідно [Halliwell B. Molecular Biology of Free Radicals in Human. - St. Lucia London: OICA Int., 1999. - 352 p.]. Також оцінювали стан антиоксидантної системи за активністю супероксидисмутази (СОД) [Antioxidant measurements /A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai [et al.] //Physiol. Meds. - 2001. - Vol. 28, N 4-P. 41-45.] та глутатіонпероксидази (ГПР) [Sedlack J. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent /J. Sedlack, H. Lindsay //Analyt. Biochem. -1968. -V. 25, N 1. -P. 192-195.]. Отримані дані наведені у Таблиці 2.

Таблиця 2

Показники інтенсивності вільно-радикального окислення та стану антиоксидантної системи в гомогенаті тканин білих щурів при застосуванні Кардіазолу на адреналіновій моделі інфаркту міокарда (дані представлені в вигляді M±m, n=6 в кожній групі)

| Тварини/Показники | АФГ, у.о./г білка | КФГ, у.о./г білка | СОД, у.о./мг/хв | ГПР, мкм/мг/хв |
|---|---|---|---|---|
| Інтактний контроль Адреналіну | 9,39±0,48 | 15,41±0,92 | 299,7±11,8 | 153,1±6,0 |
| гідротартрат, 4 мг/кг (інфаркт міокарду) | 19,46±0,83# | 37,53±1,58# | 141,3±8,6# | 71,8±5,3# |
| Інфаркт міокарду+Кардіазол, 50,0 мг/кг | 14,02±0,54* | 25,16±1,14# | 207,2±10,3* | 112,6±5,3* |
| Інфаркт міокарду+мілдронат, 100,0 мг/кг | 13,11±0,51* | 21,43±1,39* | 229,1±12,2 | 121,4±7,1* |

Примітка: * - p<0,05; - p<0,001 відносно групи "інтактний контроль".

При моделюванні інфаркту міокарда спостерігалось підвищення маркерів окислювальної модифікації білка АФГ на 107 %, КФГ на 143 %, пригнічення активності СОД на 53 % та ГПР на 53 % в міокарді тварин 2-ої групи в порівнянні до інтактного контролю. Введення Кардіазолу викликало антиоксидантний ефект, який проявлявся в пониженні маркерних продуктів: АФГ на 28 %, КФГ на 37 %; в підвищенні активності СОД на 46 % та ГПР на 57 % в порівнянні до групи "модельна патологія". В аналогічних умовах препарат порівняння Мілдронат викликав пониження маркерних продуктів: АФГ на 33 %, КФГ на 43 %; в підвищенні активності СОД на 62 % та ГПР на 69 % в порівнянні до групи "модельна патологія".

При аналізі електрокардіограм (ЕКГ) у експериментальних щурів було встановлено ряд наступних проявів та змін. На ЕКГ щурів першої групи (інтактний контроль) патологічних змін не виявлено. У ЕКГ тварин другої групи підйом сегмента ST і позитивний зубець T можна було чітко спостерігати лише у двох випадках. В інших чотирьох тварин вольтаж зубців був занадто знижений, що може свідчити про виражену токсичну кардіоміопатію. Для всіх тварин даної групи спостерігалося уповільнення серцевого ритму. У ЕКГ експериментальних 3 та 4 груп, тварини яких на фоні змодельованого інфаркту міокарда отримували досліджувану сполуку та мілдронат відповідно, підйом сегмента ST вище ізолінії і позитивний зубець T спостерігали лише для двох тварин у кожні групі. Зона трансмурального ушкодження м'язових волокон після гострого порушення коронарного кровообігу зумовлює реєстрацію на ЕКГ підйому сегмента ST вище ізолінії і злиття його з позитивним зубцем T. У двох щурів в кожній з 3 та 4 груп спостерігали значне зниження вольтажу зубців ЕКГ, в тому числі зубця R. Висота зубця R зменшується за рахунок утворення зони пошкодження в міокарді. У двох щурів в кожній з 3 та 4 груп виразних відхилень по ЕКГ виявлено не було.

Оскільки застосування кардіопротекторних засобів вимагає тривалого застосування, було досліджено вплив Кардіазолу на функцію печінки при внутрішньошлунковому введенні в дозі 50 мг/кг протягом 7 діб, з частотою один раз на добу (Таблиця 3).

Таблиця 3

Показники рівнів печінкових ферментів в плазмі крові білих щурів при застосуванні Кардіазолу (дані представлені у вигляді M±m, n=6 в кожній групі)

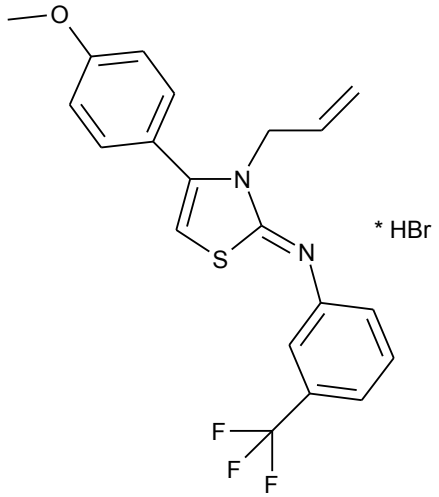
| Групи/Показники | Кардіазол, 50 мг/кг | Самці-щури, віварій ЛНМУ |
|---|---|---|
| АЛТ, Од/л | 66,5±4,7 | 48,0-86,0 |
| АСТ, Од/л | 201,4±16,5 | 81,0-180,0 |
| ЛФ, Од/л | 167,7±15,2 | 79,0-293,0 |
| гама-ГТП, МО/л | 3,1±0,3 | 2,0-5,5 |

Аналіз отриманих даних демонструє, що в зразках плазми експериментальних тварин не спостерігалось суттєвих змін рівнів ферментів печінки, в порівнянні до інтактних тварин, що є свідченням відсутності гепатотоксичних проявів при застосуванні Кардіазолу.

Таким чином, отримані результати свідчать, що заявлена сполука (Кардіазол) не проявляє гепатотоксичного впливу та проявляє кардіопротекторну дію. Застосування Кардіазолу в дозі 50 мг/кг спричинює виразний кардіопротекторний ефект у білих щурів на моделі адреналінового інфаркту і запобігає загибелі тварин від адреналінового навантаження. Застосування Кардіазолу суттєво сприяє нормалізації рівнів АСТ, ЛДГ, та МВ-КФК до значень групи інтактного контролю, в порівнянні з групою "модельна патологія". В умовах гострого інфаркту міокарда Кардіазол понижує рівень маркерів окиснювальної модифікації білка та виявляє антиоксидативний захист міокарда з ефектом, еквівалентним лікарському препарату мілдронат. Це передбачає можливість створення на її основі нового кардіопротекторного лікарського засобу Кардіазол, ефективного при лікуванні ішемій та інших порушень функції міокарда.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

[3-Аліл-4-($4^1$-метоксифеніл)-3Н-тіазол-2-іліден]-($3^2$-трифлуорометилфеніл)аміну гідробромід (кардіазол) загальної формули:




,

що проявляє кардіопротекторну та антиоксидантну активність.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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