

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 156170

СПОСІБ ОТРИМАННЯ 5-((2,4-ДИХЛОРОБЕНЗИЛ)ТІО-1,3,4-ТІАДІАЗОЛ-2-АМІНУ, ЩО ПРОЯВЛЯЄ ДІУРЕТИЧНУ ДІЮ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей
22.05.2024.

Директор
Державної організації «Український національний офіс інтелектуальної
власності та інновацій»

О.П. Орлюк





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **156170** (13) **U**
(51) МПК (2024.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/00
A61P 7/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2022 03335</p> <p>(22) Дата подання заявки: 12.09.2022</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 23.05.2024</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 22.05.2024, Бюл.№ 21</p>	<p>(72) Винахідник(и): Драпак Ірина Володимирівна (UA), Зіменковський Борис Семенович (UA), Перехода Ліна Олексіївна (UA), Голота Сергій Миколайович (UA), Нєкєтєгаєв Ігор Олексійович (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ 5-((2,4-ДИХЛОРОБЕНЗИЛ)ТІО)-1,3,4-ТІАДІАЗОЛ-2-АМІНУ, ЩО ПРОЯВЛЯЄ ДІУРЕТИЧНУ ДІЮ

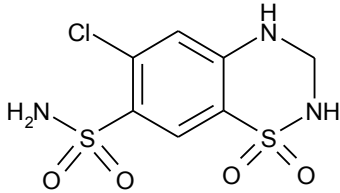
(57) Реферат:

Спосіб одержання 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-аміну загальної формули, що проявляє діуретичну дію, за яким до суспензії 0,004 моль 2-аміно-5-меркапто-1,3,4-тіадіазолу в 10 мл етанолу додають еквівалентну кількість КОН в 2-3 мл етанолу і до утвореного розчину калійної солі вносять 0,0044 моль бензилхлориду, декілька кристалів KI та кип'ятять під зворотним холодильником протягом 2 год. Далі вміст колби охолоджують, продукт реакції відфільтровують, промивають послідовно етанолом, водою, знову етанолом, висушують і перекристалізують із етанолу (Т. пл. 132-134 °С, вихід – 82 %).

UA 156170 U

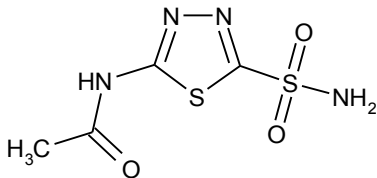
Корисна модель належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активної сполуки, яка проявляє діуретичну активність та може бути використана як діуретичний лікарський засіб.

5 Як аналог за фармакологічною дією вибраний лікарський засіб гідрохлортіазид-6-хлор-3,4-дигідро-2Н-1,2,4-бензотіадіазин-7-сульфонамід-1,1-діоксид:



10 Головним механізмом дії гідрохлортіазиду є блокування реабсорбції іонів натрію та хлору у дистальних ниркових канальцях, внаслідок чого зростає їх екскреція, що сприяє збільшенню виведення води [Бобров В.О., Давидова І.В. Діуретики: класифікація, фармакодинаміка та фармакокінетика, тактика застосування. К.: Мед. книга, 2007. 100 с.]. Проте, застосування гідрохлортіазиду може супроводжуватися побічними ефектами: гіпокаліємією, гіпонатріємією, гіпомагніємією, гіпохлоремічним алкалозом, гіперглікемією, глюкозурією, підвищенням рівня ліпідів у крові, патологічними змінами паразитоподібної залози, що супроводжуються гіперкальціємією та гіпофосфатемією, зменшенням кількості йоду, та ін. [Чекман І.С. та співавт. Фармакологія. Вінниця: Нова книга, 2011. 784 с.].

20 Як ще один аналог за фармакологічною дією та хімічною структурою нами вибраний діуретичний лікарський засіб ацетозоламід - похідне тіадіазолу - N-[5-(аміноссульфоніл)-1,3,4-тіадіазол-2-іл]ацетамід:

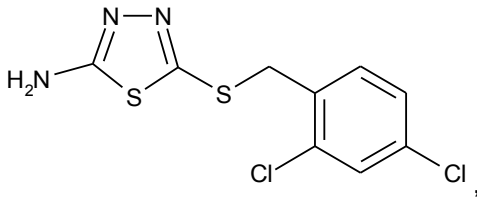


25 За механізмом дії ацетозоламід - інгібітор карбоангідрази; пригнічує вивільнення іонів Na⁺ та Н⁺ з карбонатної кислоти; призводить до пригнічення синтезу карбонатної кислоти у проксимальних канальцях; дефіцит карбонатної кислоти, яка є джерелом іонів водню, підсилює виведення води та натрію [Бобров В.О., Давидова І.В. Діуретики: класифікація, фармакодинаміка та фармакокінетика, тактика застосування, К.: Мед. книга, 2007. 100 с.]. Однак, препарат втрачає свої діуретичні властивості через три дні застосування; підвищує не тільки виведення натрію, а також і бікарбонатів, що може бути причиною метаболічного ацидозу. Виведення значної кількості натрію, спричинене прийомом ацетазоламиду, призводить до посилення виведення води, що супроводжується втратою калію та спричинює гіпокаліємію; призводить також до підвищеного виведення фосфатів, магнію та кальцію із сечею, що, відповідно, може призвести до метаболічних порушень. Також побічними ефектами при застосуванні ацетозоламиду є парестезія, порушення слуху, втрата апетиту, зміна смакових відчуттів, нудота, блювання, спорадична сонливість і дезорієнтація, ацидоз, порушення електролітного балансу, міопія, кропив'янка, гематурія, глюкозурія, печінкова недостатність, фотогіперчутливість, печінкова та ниркова коліки, агранулоцитоз, тромбоцитопенія, лейкопенія, панцитопенія [Carta F, Supuran CT. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005-2013). Expert Opin Ther Pat. 2013; 23:681-91].

40 Тому пошук нових синтетичних діуретичних засобів є надзвичайно актуальним.

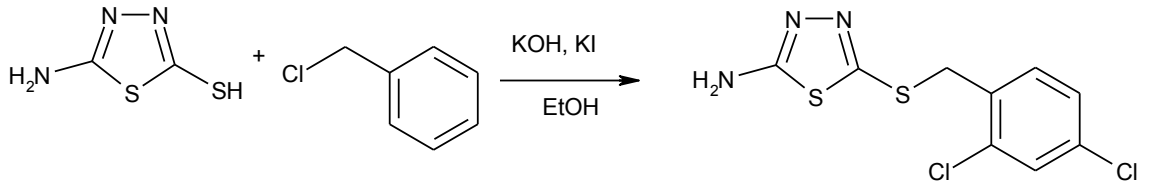
В основу корисної моделі поставлено задачу пошуку нової речовини, що має високу діуретичну активність.

45 Поставлена задача вирішується шляхом синтезу нової хімічної сполуки - 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-аміно загальної формули:



що проявляє діуретичну дію.
Сполуку одержують за схемою:

5



Синтез 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-аміну. До суспензії 0,004 моль 2-аміно-5-меркапто-1,3,4-тіадіазолу в 10 мл етанолу додають еквівалентну кількість KOH в 2-3 мл етанолу і до утвореного розчину калійної солі вносять 0,0044 моль бензилхлориду, декілька кристалів KI та кип'яють під зворотним холодильником протягом 2 год. Вміст колби охолоджують, продукт реакції відфільтровують, промивають послідовно етанолом, водою, знову етанолом, висушують і перекристалізують із етанолу. Одержують світло-жовту кристалічну речовину, нерозчинну у воді, частково розчинну у ДМФА та ДМСО. Т.пл. 132-134 °С, вихід - 82 %.

10

Для доказу складу і структури синтезованої сполуки були використані відомі фізико-хімічні методи, зокрема ЯМР ^1H - спектроскопія та елементний аналіз. Одержані результати свідчать про відповідність синтезованої сполуки заявленій.

15

Знайдено, %: С 37,11; Н 2,52; N 14,51; S 22,08; $\text{C}_9\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}_2$.

Вирахувано, %: С 36,99; Н 2,41; N 14,38; S 21,95.

20

ЯМР ^1H , δ , М.Ч.: 4,33с (2H,); 7,34-7,43м (4H, NH_2 , Ar), 7,63с (1H).

Вивчення діуретичної активності 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-аміну проведено *in vivo* на білих лабораторних нелінійних щурах масою 170-190 г за методом Є.Б. Берхіна [Берхин Е.Б. Методы изучения действия новых химических соединений на функцию почек. Хим. фарм. журн. 1977. Т 11, №5. С. 3-11]. Експериментальних тварин утримували у стандартних умовах віварію згідно з санітарно-гігієнічними нормами на стандартному раціоні та стандартизованих за фізіологічними та біохімічними показниками. При проведенні експериментальних досліджень тварини знаходилися у звичайних умовах, згідно з нормами і принципами Директиви Ради ЄС з питань захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових досліджень [Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) за редакцією член-кор. АМН України О.В. Стефанова. К.: Авіцена, 2001. 528 с.]. Щурів поміщали індивідуально в клітки, як тільки починали дослідження. Клітки разом з воронками та вимірювальним циліндром, що використовувались у дослідженнях, перед кожним експериментом покривались рідким парафіном для полегшення збирання сечі з мінімальними втратами. Кожна тварина розмішувалась в клітці, яка забезпечена дном з дротяної сітки і посудиною для збору сечі; сита з нержавіючої сталі поміщали у воронку, щоб дозволити прохід сечі. Експериментальні тварини були поділені на 4 групи по 6 тварин в кожній ($n=6$). Тварини першої групи слугували інтактним контролем і отримували розчинник - воду дистильовану. Тварини другої та третьої групи отримували діуретики - гідрохлортіазид та ацетазоламід, які вводили внутрішньошлунково в дозах 25 мг/кг. Тваринам четвертої групи вводили внутрішньошлунково за допомогою металевго зонда досліджувану речовину в дозі 7 мг/кг. Попередньо тестовану сполуку суспендували з дистильованою водою та вводили з розрахунку 10 мл/кг. Для всіх груп експериментальних тварин було проведено водне навантаження. Питну воду об'ємом 5 % від маси тіла вводили в шлунок за допомогою металевго зонда. Проби сечі у тварин збирали протягом 24 год. (сечу, зібрану за перші 20 хв, відкидали). В отриманих зразках сечі досліджували показники загального аналізу сечі, діуретичну активність та екскрецію електролітів (Na^+ , K^+ і Cl^-). Загальний аналіз сечі проводили з використанням тесту CITOLAB 11 (Pharmasco Ltd., Україна) та аналізатора CITOLAB READER 300 (Pharmasco Ltd., Україна). Іони Na^+ , K^+ і Cl^- визначали за допомогою іонселективного електродного аналізу (непрямий метод) з використанням аналізатора EASYLYTEPLUSNa/K/Cl

35

40

45

(Medica, США). При необхідності проводили розведення проб плазми та сечі для детекції вмісту електроліту згідно з вимірювальним діапазоном аналізатора. Діуретичну активність досліджуваних речовин оцінювали за їх здатністю змінювати сечовиділення у дослідних групах у порівнянні з групою інтактного контролю і розраховували у перерахунку на 100 г маси тіла тварин; розрахунок проводили за формулою:

$$V_{\text{відн.}} = V_c / m_{\text{ТВ}} \times 100 \%,$$

де $V_{\text{відн.}}$ - відносний об'єм сечі, мл/100 г;

V_c - об'єм сечі, що був виділений кожною твариною за проміжок часу, мл;

$m_{\text{ТВ}}$ - маса тіла тварини, г.

Результати проведених експериментальних досліджень діуретичної активності *gp vivo*, наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Відносний об'єм, показники загальноклінічного аналізу та рівнів електролітів в сечі білих щурів при внутрішньошлунковому введенні щурам досліджуваної сполуки ($M \pm m$, $n=6$)

Групи/Показники	Інтактний контроль	Гідрохлортіазид	Ацетозоламід,	Сполука
$V_{\text{відн.}}$, мл/100 г/доба	3,47±0,53	5,32±0,59*	4,90±0,67	7,46±0,73
Питома вага	1010±5	1010±5	1010±5	1005±5
pH	6,9±0,3	7,2±0,2	8,1±0,3	7,9±0,2
Білок	N	N	N	N
Уробіліноген	N	N	N	N
Глюкоза	N	N	N	N
Білірубін	N	N	N	N
Кетони	N	N	N	N
Нітрити	N	N	N	N
Залишкова кров	N	N	N	N
Na ⁺ , ммоль/л	98,45±8,79	191,84±16,35*	203,52±29,38*	186,63±14,56*
K ⁺ , ммоль/л	54,12±5,03	105,27±11,41*	114,43±18,57*	88,64±9,15*
Cl ⁻ , ммоль/л	88,46±7,34	129,36±15,71*	134,58±21,60	114,96±14,15

Примітки: N - не виявлено; * - $p < 0,05$; * - $p < 0,001$; - по відношенню до групи "інтактний контроль".

Сполука збільшувала добовий діурез у білих щурів, в порівнянні з інтактним контролем, в 2,14 рази ($p \leq 0,05$), в порівнянні з гідрохлортіазидом - в 1,4 рази та ацетазоламідом - в 1,5 рази. При застосуванні досліджуваної сполуки основні показники загального аналізу сечі залишались на рівні здорових інтактних тварин. Однак, відмічалось зміщення рівня pH в слабколужну сторону - до 7,9 одиниць, що є характерним фармакокінетичним параметром для тіадіазольних діуретиків.

Профіль іонограми сечі експериментальних тварин при введенні тестованої сполуки характеризувався достовірним збільшенням виділення іонів Na⁺ ($p \leq 0,001$) та K⁺ ($p \leq 0,05$) та статистично недостовірним зростанням виведення іонів Cl⁻. Рівень екскреції зазначених електролітів перевищував аналогічні показники в групі інтактного контролю, проте якісно і вигідно вирізнявся по відношенню до референс-препаратів, зокрема нижчим рівнем виведення іонів калію.

Гостру токсичність сполуки вивчали на білих безпородних мишах масою 20-22 г при внутрішньоочеревинному введенні. Для визначення гострої токсичності використовували показник середньої летальної дози LD₅₀. Розрахунок LD₅₀ проведено за методом Літчфілда та Уїлкоксона [Litchfield J.T., Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments J. Pharmacol. Exp. Ther. 1949. Vol.96. P.99]. LD₅₀ досліджуваної сполуки становить 580 мг/кг при внутрішньоочеревинному способі введення. За класифікацією Сидорова [Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральном способе введения. Токсикология новых промышленных химических веществ. 1973. Вып. 13. С. 47-51] представлена речовина відноситься до IV класу токсичності - малотоксичні сполуки.

Гепатотоксичність заявленої сполуки досліджували шляхом оцінки біохімічних параметрів функціонального стану печінки. Для цього в плазмі крові тварин першої групи (інтактний

контроль) та четвертої групи (досліджувана сполука) проводили визначення рівнів аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), гама- глутамілтрансферази (γ-ГТП), загальної лужної фосфатази (ЛФ), вмісту загального білка та загального білірубину на автоматичному біохімічному аналізаторі CORMAYACCENT-200 з використанням відповідних реагентів (виробництва фірми CORMAY, Польща).

Аналіз отриманих результатів продемонстрував, що в зразках плазми експериментальних тварин не спостерігалось зміни активності ферментних систем печінки та рівнів ключових метаболітів, в порівнянні до інтактних тварин, що є свідченням відсутності гепатотоксичних проявів при застосуванні досліджуваної сполуки (табл. 2).

Таблиця 2

Біохімічні показники плазми крові білих щурів при внутрішньошлунковому введенні щурам досліджуваної сполуки ($M \pm m$, n=6)

Групи/Показники	Інтактний контроль	Сполука 5 мг/кг
АЛТ, Од/л	71,3±8,0	70,5±5,3
АСТ, Од/л	164,5±17,3	167,3±12,5
ЛФ, Од/л	392,5±25,0	386,0±19,4
гама-ГТП, МО/л	4,0±0,5	4,2±0,4
Білірубін загальний, мг/л	5,1±1,1	4,9±0,9
Загальний білок, г/л	74,7±6,4	73,5±5,8

Таким чином, зазначені результати свідчать, що 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-амін проявляє діуретичну активність та є малотоксичною і негепатотоксичною сполукою. Це передбачає можливість створення на її основі нового діуретичного лікарського засобу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання 5-((2,4-дихлоробензил)тіо)-1,3,4-тіадіазол-2-аміну загальної формули, що проявляє діуретичну дію, за яким до суспензії 0,004 моль 2-аміно-5-меркапто-1,3,4-тіадіазолу в 10 мл етанолу додають еквівалентну кількість КОН в 2-3 мл етанолу і до утвореного розчину калійної солі вносять 0,0044 моль бензилхлориду, декілька кристалів KI та кип'ятять під зворотним холодильником протягом 2 год, вміст колби охолоджують, продукт реакції відфільтровують, промивають послідовно етанолом, водою, знову етанолом, висушують і перекристалізують із етанолу (Т пл. - 132-134 °С, вихід – 82 %).