



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **28811** (13) **U**

(51) МПК (2006)

C07D 231/54 (2006.01)**A61K 31/33****A61K 31/41****A61K 31/4152****A61K 31/4162****A61K 31/436** (2006.01)**A61K 31/438**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) N-БЕНЗИЛ-СПІРО[ІНДОЛІН-3,4-(2-АМІНО-3-КАРБЕТОКСИ-5-МЕТИЛ-4Н-ПІРАНО[2,3-С]ПІРАЗОЛ)]-2-ОН, ЯКИЙ ПРОЯВЛЯЄ АНТИОКСИДАНТНУ ТА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНУ АКТИВНІСТЬ**

1

2

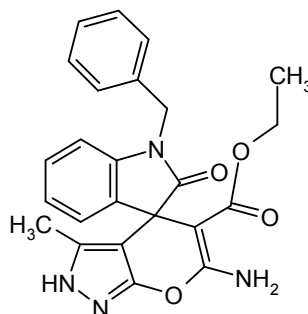
(21) u200708391

(22) 23.07.2007

(24) 25.12.2007

(72) РЕДЬКІН РУСЛАН ГРИГОРОВИЧ, UA,
ЧЕРНИХ ВАЛЕНТИН ПЕТРОВИЧ, UA, ШЕМЧУК
ЛЕОНІД АНТОНОВИЧ, UA, БЕРЕЗНЯКОВА АЛЛА
ІЛЛІВНА, UA, РЕПЕТЄВА ОЛЕНА ВАЛЕРІЙВНА, UA
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, UA

(56)

(57) N-Бензил-спіро[індолін-3,4-(2-аміно-3-
карбетокси-5-метил-4Н-пірано[2,3-с]піразол)]-2-он,
загальної формулиякий проявляє антиоксидантну та
гепатопротекторну активність.

Корисна модель відноситься до хіміко-фармацевтичної галузі, зокрема до синтезу нових індивідуальних хімічних сполук у ряду спіроциклічних похідних 2-оксіндолу з антиоксидантною та гепатопротекторною активністю, що розглядаються як близькі непептидні структурні аналоги епіфізарного гормону мелатоніну.

Дія вільних радикалів в організмі контролюється ендогенними та екзогенними антиоксидантами, а також ферментними антиоксидантними системами. Ендогенна антиоксидантна система організму та, зокрема, печінки протистоїть ушкоджувальній дії вільних радикалів та токсинів. Порушення систем регуляції вільно-радикальних процесів може приводити до розвитку різних киснево залежних патологічних станів (променеве ураження, проліферація злоякісних пухлин, гіпоксія, ішемія, атеросклероз, стрес тощо). У зв'язку з цим актуального значення набуває проблема фармакологічної корекції

вільно-радикальних процесів за допомогою екзогенних препаратів, що одночасно проявляють антиоксидантну та виражену гепатопротекторну дію в однакових дозах.

Відомий епіфізарний гормон мелатонін [1] є одним з ендогенних антиоксидантів, та використовується в медичній практиці, як адаптогенний засіб, що проявляє широкий спектр фармакологічної активності, зокрема, антиоксидантну [2], нормалізуючу біоритми та сон [3] та гепатопротекторну дію [4].

Іншим відомим сучасним антиоксидантом є препарат мексідол [5], який проявляє також гепатопротекторні властивості [6].

До недоліків препарату порівняння мелатоніну можна віднести суперечливі дані про його гепатопротекторну у залежності від патологічної моделі [7] та відсутність гепатопротекторного ефекту у фізіологічних дозах (мелатонін) [8]. Мексідол, у свою чергу, має побічну дію, таку як нудота, сухість у роті, алергічні реакції.

(13) **U**(11) **28811**(19) **UA**

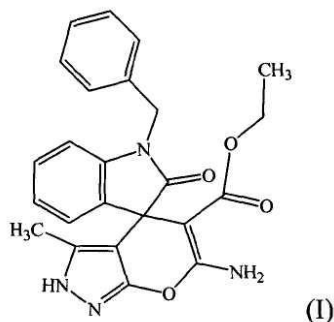
Гепатопротекторна активність мексідолу проявляється лише при довготривалому введенні [9].

Найближчим за хімічною структурою до заявленої сполуки є 1-(3-амінофеніл)-3-метил[1]бензопірано[2,3-с]піразол-4-он [10], який проявляє здатність селективно інгібувати A_2 -рецептори аденозину.

Сполука за прототипом не проявляє антиоксидантної та гепатопротекторної активності.

В основу корисної моделі поставлене завдання створення нової хімічної сполуки, що проявляє високу антиоксидантну та гепатопротекторну активність при низькій токсичності і може бути використана як діюча речовина у складі фармацевтичних препаратів різних лікарських форм: таблеток, капсул, суспензій для перорального застосування тощо.

Поставлене завдання вирішується шляхом синтезу індивідуальної хімічної сполуки N-бензіл-спіро[індолін-3,4-(2-аміно-3-карбетоксі-5-метил-4Н-пірано[2,3-с]піразол)]-2-ону загальної формули



Нова сполука є похідним 2-оксіндолу як структурного аналогу мелатоніну, що містить спіроз'єднані 4Н-пірано[2,3-с]піразольну конденсовану систему та 2-оксіндольне ядро, а також аміноетильний фармакофор, присутній в молекулі мелатоніну, структурно закріплений у пірановому циклі заявленої сполуки.

Сполука проявляє антиоксидантну та гепатопротекторну активність.

Сполука, яка заявляється, синтезована одnoreакторним методом, заснованим на трикомпонентній конденсації N-бензілізатину з етилціаноацетатом та 5-метил-2,4-дігідро-піразол-3-оном в умовах основного каталізу.

N-Бензіл-спіро[індолін-3,4-(2-аміно-3-карбетоксі-5-метил-4Н-пірано[2,3-с]піразол)]-2-он - це біла дрібнокристалічна речовина, добре розчинна у диметилформаміді (ДМФА), диметилсульфоксиді (ДМСО), розчинна в етанолі, практично не розчинна у воді та гексані. Будова сполуки підтверджена за допомогою елементного аналізу, ЯМР¹H-, масс- та ІЧ- та УФ-спектроскопії.

Корисна модель ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1

До 2,37г (0,01моль) N-бензілізатину заздалегідь розчиненого в 10мл абсолютного етанолу додавали 1,1мл (0,01моль) етилціаноцетового ефіру та 1,3мл (0,01моль) триетаноламіну, а потім нагрівали розчин до початку кипіння та кип'ятили ще 15 хвилин після

чого додавали 0,98г (0,01моль) 5-метил-2,4-дігідро-піразол-3-ону розчиненого в 5мл абсолютного етанолу. Реакційну суміш кип'ятили ще 20 хвилин, залишали до повного охолодження, розбавляли 30мл води, та залишали на 12 годин. Осад, що випав, фільтрували, промивали киплячим н-гексаном та сушили.

Вихід 3,74г (87%). Т.пл. 125-128°C.

Спектр ЯМР¹H (DMSO-d₆), δ, м.д.: 0.55 (т, J=6,7Hz, 3H), 1.00 (с, 3H), 3.28 (к, J=7,1Hz, 2H), 4.50 (с, 2H), 6.9-7.2 (м, 3H), 7.22-7.48 (м, 6H), 7.85 (с, 2H, D₂O-мінливий, NH₂), 11.85 (с, 1H, D₂O-мінливий, NH).

Масс-спектр, m/z (I_{віднош.}, %): 430 (M⁺).

C₂₄H₂₂N₄O₄ M.M=430,46

Знайдено, %: C, 66,70; H, 5,26; N, 13,09.

Вирахувано, %: C, 66,97; H, 5,15; N, 13,02.

ІЧ-спектр у KBr, см⁻¹: ν 3276 (ν_{NH2}), 2978 (ν_{NH}), 1676(ν_{CO}), 1612, 1546(δ_{NH}), 1485, 1466(ν_{CH2}), 1397.

УФ-спектр (EtOH) λ_{max}: 423nm (ε 256,000), 518 (10,400).

Приклад 2

Вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності заявленої сполуки N-бензіл-спіро[індолін-3,4-(2-аміно-3-карбетоксі-5-метил-4Н-пірано[2,3-с]піразол)]-2-ону (I) проводили на білих статевозрілих мишах обох статей масою 22-25г на моделі гострого гепатиту, викликаного тетрахлорметаном, який в експериментальній фармакології використовується як класичний мембранотропний токсин, що посилює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) і впливає на ліпідні мембрани як розчинник [11]. В якості препарату порівняння було обрано мексідол у дозі 100мг/кг (DE₅₀).

Критеріями оцінки антиоксидантної та гепатопротекторної активності слугували індекси виживаності (ІВ, %) на протязі всього терміну спостереження, ДЛ₅₀, МКП (масовий коефіцієнт печінки - показник гемодинаміки органу), кількісний вміст у гомогенаті органу кінцевого продукту ПОЛ - ТБК-активні продукти. Ступінь антиоксидантного захисту функціонально важливих біомолекул клітин визначали за вмістом відновленого глутатіону (GSH).

Результати вивчення антиоксидантної, гепатопротекторної активності та гострої токсичності заявленої сполуки (I) та препарату порівняння мексідол наведені у таблиці 1.

Показники антиоксидантної, гепатопротекторної та гострої токсичності заявленої сполуки (I) у порівнянні з мексідолом

Піддослідні групи тварин	DE ₅₀ , мг/кг per os	ДЛ ₅₀ , мг/кг per os	TI= ДЛ ₅₀ / DE ₅₀	ІВ %	МКП, %
Інтактний контроль	-	-	-	100	4,93±0,6
Контрольна патологія	-	-	-	85,71	6,81±0,2
Сполука (I)	100	2300	23	100	6,48±0,3

Мексідол	100	2010	20,1	100	6,69±0,21*	74,70±15,26	104,21±15,65*
----------	-----	------	------	-----	------------	-------------	---------------

Примітки:

* - відхилення показника достовірне щодо групи інтактного контролю, $p \leq 0,05$;

** - відхилення показника достовірне щодо групи контрольної патології, $p \leq 0,05$;

*** - відхилення показника достовірне щодо препарату мексідол, $p \leq 0,05$;

В умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту у мишей в дозі 100мг/кг заявлена сполука (I) проявляє виражену антиоксидантну та гепатопротекторну активність, що характеризується позитивним впливом на загальний стан тварин (виживаність), стан антиоксидантних систем та процес ПОЛ.

На тлі гепатотоксину досліджувана сполука (I) достовірно зменшувала вміст ТБК-активних продуктів в гомогенаті печінки. За показником зміни вмісту ТБК-активних продуктів заявлена сполука (I) перевищує препарат порівняння мексідол більш ніж у 2 рази, за вмістом відновленого глутатіону (GSH) сполука (I) наближається до показника інтактного контролю, що свідчить про позитивний вплив на дезінтоксикаційні функції печінки. За показником МКП та ІВ заявлена сполука (I), не поступається мексідолу, при практично однакових величинах ТІ.

Зазначені зміни вмісту ТБК-активних продуктів вказують на здатність заявленої сполуки (I) інгібувати процеси ПОЛ значно ефективніше ніж препарат порівняння, що свідчить про її виражену антиоксидантну та гепатопротекторну активність.

Приклад 3

Вивчення антиоксидантної та гепатопротекторної активності заявленої сполуки N-бензіл-спіро[індолін-3,4-(2-аміно-3-карбетоксі-5-метил-4Н-пірано[2,3-с]піразол)]-2-ону (I) проводили на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180-250г на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту. Гепатит викликали пероральним введенням тетрахлоретану в дозі 0,4мл/100г маси тіла тварини у вигляді 50% розчину на рослинній олії двічі на добу. В якості препаратів порівняння було обрано мексідол та мелатонін.

Критеріями оцінки антиоксидантної та гепатопротекторної активності слугували показники індексу виживаності тварин (ІВ, %) на протязі всього терміну спостереження, МКП (масовий коефіцієнт печінки - показник гемодинаміки органу), кількісний вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки, кількісний вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові. Ступінь антиоксидантного захисту функціонально важливих біомолекул клітин визначали за вмістом відновленого глутатіону (GSH), ΔM - величиною зміни маси тіла тварин.

Дослідних тварин було поділено на 5 груп: інтактний контроль; контрольна патологія (неліковані тварини); група, що одержувала заявлений засіб (сполуку (I)); групи тварин, лікованих відповідно мексідолом та мелатоніном.

Результати досліджень на 2-й день експерименту наведені у таблиці 2.

Показники антиоксидантної та гепатопротекторної сполуки (I) у порівнянні з мексідолом та мелатоніном на 2

Група тварин	Доза, мг/кг per os	ІВ, %	ΔM	МКП, %	GSH, ум.од. у гомогенаті печінки
Інтактний контроль	-	100	2,00±4,64	4,08±0,19	112,24±4,13
Контрольна патологія	-	85,71	-25,83±4,17*	4,51±0,30	60,61±4,80 *
Сполука (I)	30	100	-11,43±4,27**	4,42±0,21	71,27±5,37
Мексідол	100	57,14	-23,75±3,75*	4,57±0,21	47,04±6,93*
Мелатонін	30	85,71	-10,83±6,25	4,15±0,25	74,76±7,96

Примітки:

* - відхилення показника достовірне щодо групи інтактного контролю, $p \leq 0,05$;

** - відхилення показника достовірне щодо групи контрольної патології, $p \leq 0,05$;

*** - відхилення показника достовірне щодо препарату мексідол, $p \leq 0,05$;

*** - відхилення показника достовірне щодо препарату мелатонін, $p \leq 0,05$;

Як видно з даних, представлених у таблиці 2, тварини групи контрольної патології внаслідок тяжкої інтоксикації значно втрачали вагу та частина тварин гинула (16%) протягом експерименту. Про розвиток тетрахлорметанового гепатиту також свідчила інтенсифікація процесів ПОЛ, що характеризувалася збільшенням рівня ТБК-активних продуктів у сироватці крові ($p=0,07$) і в гомогенаті печінки ($p \leq 0,05$) та зменшенням рівня GSH у гомогенаті печінки ($p \leq 0,05$) порівняно з інтактним контролем.

На тлі лікування гострого тетрахлорметанового гепатиту мексідолом ІВ тварин був значно нижчим ніж у групах тварин, що одержували мелатонін, заявлену сполуку (I) та у групі контрольної патології. Лише під впливом заявленої сполуки (I) щури менше ніж в групі контрольної патології втрачали вагу, а випадків загибелі дослідних тварин взагалі не відзначалося.

Заявлена сполука (I) в умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту позитивно впливала на стан антиоксидантних систем та процес ПОЛ, як у тканині печінки, так і у сироватці крові. Рівень ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки та в сироватці крові значно знижувався порівняно з групою контрольної патології, та практично не поступався препаратам порівняння. Значення GSH під впливом заявленої сполуки (I) підвищувалося відносно контрольної патології, було значно вищим, ніж у препараті порівняння мексідолу та не поступалося мелатоніну, що свідчить про позитивний вплив на захисні антиоксидантні механізми.

Отже, порівняльний аналіз гепатопротекторної та антиоксидантної активності заявленої сполуки (I) та препаратів порівняння показав, що досліджувана речовина у разовій дозі 30мг/кг перевершує лікувальні властивості препарату мексідол в дозі 100мг/кг, не поступаючи йому

мелатоніну у дозі 30мг/кг та перевищує його за показником ІВ.

Таким чином, заявлено сполуку з високою антиоксидантною та гепатопротекторною активністю, при низькій токсичності. Заявлена сполука може знайти застосування у медичній практиці для лікування ряду патологічних станів, що супроводжуються інтоксикацією та оксидативним стресом внаслідок підвищення процесів ПОЛ, наприклад, при ураженнях печінки токсинами хімічної, бактеріальної або вірусної етіології в гепатології, гастроентерології та токсикології, гострих гнійно-запальних процесах черевної порожнини (гострий деструктивний панкреатит, перитоніт), отруєннях радіонуклідами, токсичних енцефалопатіях на тлі порушення функції печінки та інших внутрішніх органів, в онкології як ад'ювантний засіб у терапії злоякісних пухлин, в анестезіології та реанімації, у комплексній терапії поліорганної недостатності різного генезу тощо.

Для синтезу заявленої сполуки використовуються однореакторний метод та доступні реактиви, дозволені у фармацевтичній практиці, нешкідливі для довкілля. Речовина проста у технологічних дослідженнях, відтворенні у промислових умовах, стійка, що збільшує термін її зберігання, а також має широку фармакологічну активність. Перелічені фактори дозволяють рекомендувати заявлену речовину як лікарську субстанцію для розробки високоефективних засобів у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

1. Reiter, R.J. The Indole amine Melatonin as a Free Radical Scavenger, Electron Donor, and Antioxidant: in vitro and in vivo Studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996, 398, 307-313.

2. Меншикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меншикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. - М.: Фирма "Слово", 2006. - 556с.

3. Garfinkel, D.; Laudon, M.; Zisapel, N. Improvement of Sleep Quality by Controlled-Release Melatonin in Benzodiazepine-Treated Elderly Insomniacs. *Arch. Gerontol Geriatr.* 1997, 24, 223-231.

4. Анисимов В.Н., Кветной И.М., Комаров Ф.И., Малиновская Н.К., Рапопорт С.И. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта. - М.: Советский спорт, 2000.

5. Зорькина А.В., Костин Я.В., Инчина В.И. и соавт. Антиокислительные и гиполипидемические свойства мексидола и эмоксипина при длительном иммобилизационном стрессе // *Хим.-фарм. журн.*, - 1998. - №5. - с.3-5.

6. Катикова О.Ю., Смирнов Л.Д. Коррекция мексидолом гепатотоксичности, индуцируемой туберкулоstaticами у крыс. // *Труды нац. научно-практ. конф. с междун. участием "Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека"*. - Смоленск, 2001. - с.148-150.

7. Олійник Е.В., Мещешин І.Ф., Плачінта О.В. Показники про- та антиоксидантного стану шлунка

щурів за умов дії радіації та мелатоніну // *Медична хімія*. - Т.6, №1. - 2004. - С.73-76.

8. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // *Эксперим. и клин. фармакология*. - 2003. - №4. - с.66-70.

9. Цыганкова Г.М. Влияние мексидола на развитие токсического гепатита // *Автореф. дисс... канд. мед. наук*. - Смоленск, 2003. - 21с.

10. Colotta, V.; Cecchi, L.; Catarzi, D.; Melani, F.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Tacchi, P.; Lucacchini, A. 1-(3-Aminophenyl)-3-methyl[1]benzopyrano[2,3-c]pyrazol-4-one: a new selective A₂ adenosine receptor antagonist. *Pharmacol. Lett.* 1992, 2, 74-76; [*Chem. Abstr.* 1993, 118, 32807].

11. Вивчення гепатопротекторної та антиоксидантної активності халконів на моделі токсичного ураження печінки / С.В. Місюрьова, І.А. Зупанець, В.М. Ковальов, І.А. Журавель, В.П. Хіля // *Вісник фармації*. - 1999. - №2. - С.147-150.