

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 458 060** (13) C2

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[C07D 417/00 \(2006.01\)](#)

[A61K 31/54 \(2006.01\)](#)

[A61P 7/02 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 29.05.2017)
Пошлина: учтена за 5 год с 23.05.2013 по 22.05.2014

(21)(22) Заявка: [2009119547/04](#), 22.05.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.05.2009

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2010 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: [10.08.2012](#) Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2259371 C2, 27.08.2005. WO 2007057092 A1, 24.05.2007.

Адрес для переписки:

620002, г.Екатеринбург, ул. Мира, 19,
"УГТУ-УПИ", Центр интеллектуальной
собственности, Т.В. Марк

(72) Автор(ы):

**Чухахин Олег Николаевич (RU),
Сидорова Лариса Петровна (RU),
Петрова Наталья Михайловна (RU),
Новикова Антонина Петровна (RU),
Русинов Владимир Леонидович (RU),
Макаров Владимир Александрович (RU),
Васильева Татьяна Михайловна (RU)**

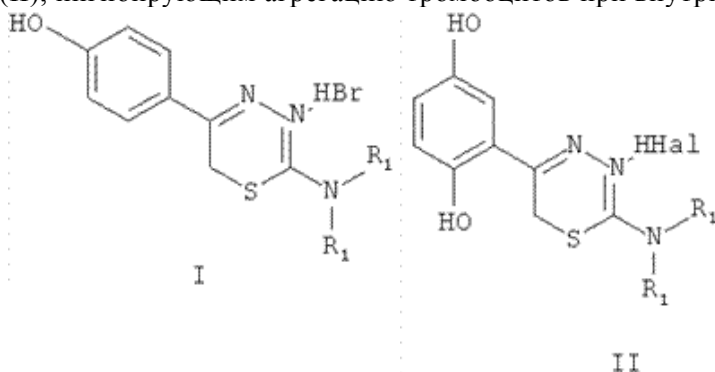
(73) Патентообладатель(и):

**Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Уральский государственный
технический университет - УПИ имени
первого Президента России Б.Н. Ельцина"
(RU)**

(54) 5-(4'-ГИДРОКСИФЕНИЛ)- И 5-(2',5'-ДИГИДРОКСИФЕНИЛ)-6Н-1,3,4-ТИАДИАЗИН-2-АМИНЫ, ГИДРОГАЛАГЕНИДЫ, ИНГИБИРУЮЩИЕ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к 5-(4'-гидроксифенил)- и 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминам, гидрогалогенидам общей формул (I) и (II), ингибирующим агрегацию тромбоцитов при внутривенном введении



NR₁R₁=морфолино-; тиоморфолино-; пирролидино-; пиперидино-; гексаметиленимино-, NHal-HCl; HBr. Данные соединения могут быть использованы при создании лекарственных препаратов для кардиологии и позволят значительно улучшить лечение различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе инфаркта миокарда и тромботического инсульта. 6 табл., 2 ил., 10 пр.

Изобретение относится к области биологически активных соединений и касается разработки новых производных класса 1,3,4-тиадиазинов, обладающих антиагрегантным действием и способных эффективно влиять на гемостаз - ингибировать агрегацию тромбоцитов.

Агрегация тромбоцитов играет важную роль в физиологии и патологии человека, так как является важным этиологическим моментом в патогенезе нарушений кровообращения (в частности, капиллярного). Агрегированные тромбоциты (склеенные между собой) и тромбоциты, адгезированные к сосудистой стенке, служат основой для формирования тромба, что приводит к возникновению сердечно-сосудистых заболеваний (нарушению коронарного и мозгового кровообращения, патологии сосудов конечностей, брюшной полости и др.), к развитию тромбозов после хирургических операций, нарушению кровообращения при ранении человека и животных.

Разработка эффективных антиагрегантов, тормозящих агрегацию тромбоцитов, является важной проблемой современной медицины, решение которой позволит значительно улучшить лечение инфаркта миокарда, тромботического инсульта (данные заболевания являются ведущей причиной смертности в развитых странах). Поэтому модуляция агрегационной способности тромбоцитов - одно из главных направлений в коррекции нарушений системы гемостаза. В настоящее время в мире активно разрабатываются способы целенаправленного химического синтеза антиагрегантов нового поколения, обладающих высокой эффективностью и избирательностью действия.

В последние годы разработаны и внедрены в медицинскую практику эффективные ингибиторы агрегации тромбоцитов из группы производных тиенопиперидина (тиклопидин, клопидогрель). Они являются на сегодняшний день оптимальными из имеющихся препаратов. Однако их терапевтический эффект развивается лишь на второй день и достигает максимума лишь на 4-7-й день лечения. Тиклопидин часто вызывает осложнения в виде диареи, сыпи и лейкопении. Как тиклопидин, так и клопидогрель не предназначены для внутривенного введения, т.е. не могут быть средствами скорой помощи.

Настоящий проект патентной заявки предполагает разработку средства, способного эффективно ингибировать агрегацию тромбоцитов, в том числе при внутривенном введении.

Предшествующий уровень техники

Известны различные представители класса тиадиазина, отличающиеся положением гетероатомов в тиадиазиновом кольце, которые обладают влиянием на свертывающую систему крови. Так, в работе [N.Campillo] с соавторами [1] констатировал уменьшение агрегации тромбоцитов, индуцированной аденазиндифосфатом (АДФ), арахидоновой кислотой (АК) и коллагеном как *in vitro*, так и *ex vivo* при воздействии гетероарилпиразино[2,3-с][1,2,6]тиадиазин-2,2-диоксидов. Однако антиагрегационные свойства данных соединений в несколько раз ниже, чем у заявляемых соединений как при агрегации тромбоцитов АК, так и АДФ.

В работе [Rehse K] показано, что 2-нитрозоимино-3,6-дигидро-2Н-1,3,4-тиадиазины также снижают агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном [2].

В других исследованиях [Ozcelic A.B.] [3] установлена антифибринолитическая активность и некоторое ингибирование тромбоцитарной агрегации 3-замещенных-5-(4-карбокциклогексилметил)-тетрагидро-2Н-1,3,5-тиадиазин-2-тионом.

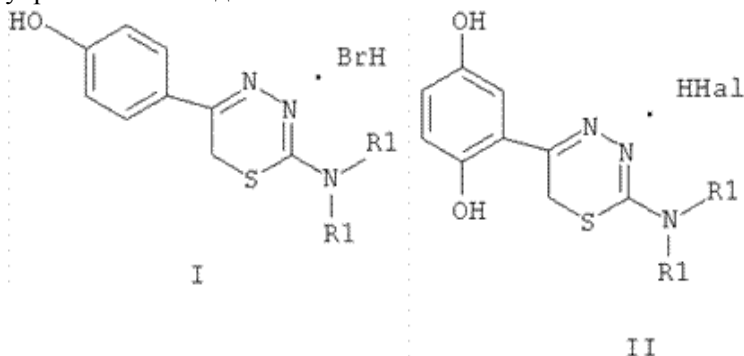
В патенте [Чупахин О.Н и др.] приведены убедительные доказательства антиагрегантного и антикоагулянтного действия 5-арил-1,3,4-тиадиазин-2 аминов [4].

Таким образом, тиадиазины представляют собой класс соединений, на основе которых возможно создание эффективных антиагрегантов, действующих на различные пути активации и агрегации тромбоцитов.

Целью настоящей работы была разработка синтеза и изучение антиагрегационных свойств новых групп класса 1,3,4-тиадиазина: 5-(4'-гидроксифенил)- и 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминов, которые могли бы удовлетворять современным требованиям медицины к препаратам такого рода. Препараты должны быть устойчивыми, способными эффективно ингибировать агрегацию тромбоцитов, в

том числе в условиях внутривенного введения и, таким образом, могли бы быть средствами скорой помощи.

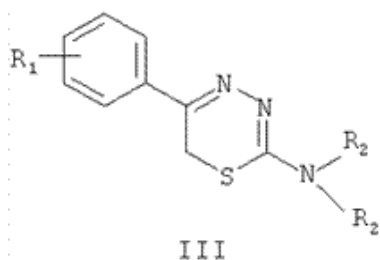
Указанный технический результат достигается тем, что согласно изобретению предложены гидробромиды 5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 аминов, общей формулы (I) и гидрохлориды 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 аминов общей формулы (II), обладающие антиагрегантной активностью в условиях внутривенного введения.



NR_1R_1 = морфолино-; тиоморфолино-; пирролидино-; пиперидино-;
гексаметиленимино-
HHal=HCl

Данные соединения могут быть использованы в кардиологии и позволят значительно улучшить лечение различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе инфаркта миокарда и тромботического инсульта.

Близкими по структуре (прототип), по отношению к заявляемым «5-(4'-гидроксифенил)- и 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 амины, гидрогалогениды, ингибирующие агрегацию тромбоцитов при внутривенном введении» являются 5-арил-1,3,4-тиадиазин-2 амины [4] общей формулы III:



где R_1 =H; Cl; Br; C_1 - C_4 -алкокси; C_1 - C_4 алкильные группы
 NR_2R_2 = циклоалкиламины

От прототипа заявляемые соединения отличаются тем, что в положение-5 1,3,4-тиадиазинового кольца вместо арильного остатка введены остатки фенола и гидрохинона. Наличие в положение-5 тиадиазинового цикла таких заместителей привело к новым положительным свойствам данных препаратов: качественному улучшению растворимости соединений, повышению их как гидрофильности, так и липофильности, а также наличия, благодаря фенолам, вероятных антиоксидантных свойств.

Все исследованные соединения ингибировали агрегацию тромбоцитов, индуцированную АК и АДФ (таблицы 1-4) в диапазоне концентраций 0,001-0,1 мМ.

Примеры синтеза и физико-химические характеристики заявляемых соединений

Все соединения получены с выходом 50-80% путем конденсации соответствующих α -бром-2-ацетилтиофенов и 4,4-циклоалкиламиноосемикарбазидами при нагревании в абсолютном этаноле и последующим высаживанием продуктов реакций эфиром из охлажденных растворов. Строение соединений доказано спектральными данными 1H ЯМР. Чистота соединений подтверждена элементным анализом, тонкослойной хроматографией.

Экспериментальная часть

Синтез исходных соединений: α -бром-2,5-дигидроксиацетофенон

2',5'-Диоксиацетофенон - синтон для получения α -бром-2,5-дигидроксиацетофенона, получен нагреванием смеси 25 г (13 ммоль) диацетата гидрохинона с 58 г (20 ммоль) безводного $AlBr_3$ при температуре 110-120°C до прекращения бурного выделения HBr , затем реакцию массу выдерживали при температуре 160-165°C 3 ч. Остаток $AlBr_3$ разлагали добавлением измельченного льда, а затем - добавлением 125 мл конц. HCl . Сушили на воздухе, кристаллизовали из большого объема воды. Выход 15 г (75%).

Суспензию 14,8 г (66 ммоль) безводного CuBr_2 в 60 мл сухого этилацетата нагревали до полного растворения осадка и добавляли раствор 5 г (33 моль) 2,5-диоксиацетофенона в 80 мл этилацетата и 80 мл хлороформа. Нагревали при перемешивании до перехода темно-зеленой окраски раствора в желтую. Горячую реакционную массу фильтровали, осадок на фильтре промывали горячей смесью этилацетата и хлороформа. Растворитель отгоняли, остаток перекристаллизовывали из бензола. Выход 5,0 г (66%). Т.пл. 113-115°C. Лит. т.пл. 112-113°C.

α -Бром-4-гидроксиацетофенон

К 15,6 г (70 ммоль) безводного CuBr_2 в 80 мл безводного этилацетата добавляли 5 г (40 ммоль) 4-гидроксиацетофенона в смеси безводных, нагретых до кипения 40 мл этилацетата и 40 мл хлороформа. Суспензию кипятили при перемешивании 1 ч до изменения цвета осадка от черного до бесцветного CuBr . Осадок CuBr отфильтровывали, растворитель отгоняли, остаток - кристаллический осадок слегка желтого цвета, при стоянии темнеет. Выход 5,2 г (68%). Т.пл. 127-128°C (кристаллизовали из сухого бензола).

Пример 1

2-Морфолино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (1)

К раствору 1,08 г (5 ммоль) α' -бром-4-гидроксиацетофенона в 40 мл абсолютного этанола добавляли 0,81 г (5 ммоль) морфолинида тиокарбазиновой кислоты и 0,5 мл концентрированной HBr , кипятили 40 мин, отфильтровывали выпавший осадок слегка желтого цвета. К фильтрату при охлаждении добавляли сухой диэтиловый эфир, образовавшийся осадок слегка желтого цвета отфильтровывали, сушили, объединяли с основным продуктом и кристаллизовали из абсолютного этанола с добавлением нескольких капель HBr конц. Выход 1,40 г (78%). Т.пл. 228-229°C. $R_f=0,32$ (элюент, бутанол:уксусная кислота:вода 4:1:5). Найдено, %: С 43,54; Н 4,44; N 11,71. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_2\text{S}$. Вычислено, %: С 43,58; Н 4,47; N 11,73, ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 3,81 (м, 4Н, морфолино), 3,90 (м, 4Н, морфолино); 4,37 (с, 2Н, CH_2S), 6,91 и 7,85 (д.д., 4Н, C_6H_4); 10,05 (уш.с., 1Н, ОН).

Пример 2

2-Гексаметиленимин-1-ил-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (2).

К раствору 8,4 г (40 ммоль) α -бром-4-гидроксиацетофенона в 100 мл абсолютного этанола добавляли раствор 7 г (40 ммоль) 4-гексаметилениминосемикарбазида в 150 мл абсолютного этанола и 1,5 мл конц. HBr , кипятили 50 мин. После горячего фильтрования к фильтрату темно-коричневого цвета добавляли при охлаждении 350 мл сухого диэтилового эфира, образовавшийся осадок слегка желтого цвета отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из абсолютного этанола. Выход 6,5 г (44,8%). Т.пл. 221-222°C. Найдено, %: С 48,57; Н 5,48; N 11,28. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{OS}$. Вычислено, %: С 48,65; Н 5,41; N 11,35. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ м.д.:

1,76 (6Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 2,50 (2Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 3,88 (4Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 4,29 (2Н, с, CH_2S), 7,35 (4Н, д.д., C_6H_4), 10,02 (1Н, уш.с., NH), 13,32 (1Н, уш.с., ОН).

Пример 3

2-Тиоморфолино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (3)

К раствору 2,16 г (10 ммоль) α -бром-4-гидроксиацетофенона в 60 мл абсолютного этанола добавляли 1,77 г (10 ммоль) тиоморфолида тиокарбазиновой кислоты и 1 мл конц. HBr , кипятили 40 мин, отфильтровывали выпавший осадок слегка желтого цвета. К фильтрату при охлаждении льдом добавляли 100 мл сухого диэтилового эфира, образовавшийся осадок отфильтровывали, сушили, объединяли с основным продуктом и перекристаллизовывали из абсолютного этанола. Выход 2,51 г (73%). Т.пл. 217-218°C. Найдено, %: С 41,62; Н 4,22; N 11,34. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{OS}_2$. Вычислено, %: С 41,71; Н 4,28; N 11,23. ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 2,85 (4Н, м, тиоморфолино), 4,14 (4Н, м, тиоморфолино), 4,31 (2Н, с, CH_2S), 7,41 (4Н, д.д., C_6H_4), 10,23 (1Н, уш.с., NH), 13,25 (1Н, уш.с., ОН).

Пример 4

2-Пирролидин-1-ил-5-(4-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (4)

К раствору 2,16 г (10 ммоль) α -бром-4-гидроксиацетофенона в 60 мл абсолютного этанола добавляли 1,45 г (10 ммоль) 4-тетраметилениминосемикарбазида в 50 мл абсолютного этанола и 0,5 мл концентрированной HBr , кипятили 45 мин. Выпавший после горячего фильтрования и последующего охлаждения осадок слегка желтого цвета отфильтровывали, сушили и кристаллизовали из абсолютного этанола. Выход

1,65 г (48,4%). Т.пл. 223-224°C. $R_f=0,61$ (бутанол:уксусная кислота:вода 3:1:3).
Найдено, %: С 45,42; Н 4,94; N 12,31. $C_{13}H_{16}BrN_3OS$. Вычислено, %: С 45,64; Н 4,72;
N 12,36. ЯМР 1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 2,04 (4Н, м, пирролидин-1-ил), 3,76 (4Н, м,
пирролидин-1-ил), 4,14 (2Н, с, CH_2S), 7,39 (4Н, д.д., C_6H_4). 10,18 (1Н, уш.с., NH),
13,10 (1Н, уш.с., NH).

Пример 5

2-Пиперидино-5-(4-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (5)

При слабом нагревании растворяли 1,59 г (10 ммоль) 4-пентаметилениминотиосемикарбазида в 40 мл абсолютного этанола и добавляли 2,16 г (10 ммоль) α -бром-4-гидроксиацетофенона и 0,5 мл концентрированной НВг, кипятили 40 мин, отфильтровывали выпавший осадок слегка желтого цвета, сушили и кристаллизовали из абсолютного этанола. Выход 1,81 г (50,6%). Т.пл. 253-255°C. $R_f=0,52$ (бутанол:уксусная кислота:вода 4:1:5). Найдено, %: С 47,44; Н 5,04; N 12,02. $C_{14}H_{18}BrN_3OS$. Вычислено, %: С 47,24; Н 5,12; N 11,84. ЯМР 1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1,81 (6Н, м, пиперидино), 3,92 (4Н, м, пиперидино), 4,27 (2Н, с, CH_2S), 7,18 (4Н, д.д., C_6H_4), 10,15 (1Н, уш.с., NH), 13,11 (1Н, уш.с., OH).

Пример 6

2-Морфолино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-1,3,4-тиадиазин, гидрохлорид (6)

К раствору 1,62 г (7 ммоль) α' -бромхинацетофенона в 30 мл этанола добавляли 1,13 г (7 ммоль) морфолида тиокарбазиновой кислоты, кипятили 1 час. Выпавший ярко-желтый осадок - 2-морфолино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-1,3,4-тиадиазин, гидробромид отфильтровывали, промывали этанолом. Выход 1,3 г (47%). Т.пл. °С (с разлож.). Для получения А-38 гидрохлорида, 0,4 г А-38 гидробромида растворяли в 15 мл горячей воды, охлаждали до 25°C и добавляли 7% водный раствор аммиака до рН 5-6. Выпавшее основание тиадиазина растворяли в минимальном количестве конц. HCl. После охлаждения льдом выделяли гидрохлорид 2-морфолино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазина. Т.пл. 242°C (из воды). Найдено, % С 46,80; Н 4,76; N 12,75. $C_{13}H_{16}ClN_3SO_3$. Вычислено, %: С 47,34; Н 4,85; N 12,74. ЯМР 1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 4,2 (с, 2Н, SCH_2), 3,9 (м, 4Н, морфолино), 3,7 (м, 4Н, морфолино), 5,2-6,6 (уш.с., 2Н, OH), 6,8-7,8 (м, 3Н, C_6H_3).

Пример 7

2-Гексаметиленимин-1-ил-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (7)

К 100 мл концентрированной НВг добавляли 6,9 г (30 ммоль) α -бром-2,5-диоксиацетофенона и 5,1 г (30 ммоль) 4-гексаметилениминотиосемикарбазида, нагревали 1 ч при 80°C. Выпавший кристаллический продукт отфильтровывали и кристаллизовали из воды. Выход 8,0 г (80%). Т.пл. 232°C. Найдено, %: С 45,61; Н 4,90; N 11,41. $C_{15}H_{20}BrN_3O_2S$. Вычислено, %: С 46,63; Н 5,22; N 10,87. ЯМР 1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1,81 (6Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 2,5 (2Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 3,88 (4Н, с, гексаметиленимин-1-ил), 4,24 (2Н, с, CH_2S), 6,80-6,95 (3Н, м, C_6H_3), 9,0-10,2 (2Н, уш.с., OH).

Пример 8

2-Тиоморфолино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н,-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (8)

К 100 мл конц. НВг добавляли 6,9 г (30 ммоль) α -бром-2,5-диоксиацетофенона и 5,3 г (30 ммоль) тиоморфолида тиокарбазиновой кислоты, нагревали при 80°C в течение часа. Выпавший при нагревании кристаллический осадок отфильтровывали и кристаллизовали с углем из воды, подкисленной НВг до рН 4. Выход 7,0 г (64%). Т.пл. 214-215°C. Найдено, %: С 40,15; Н 4,40; N 10,77. $C_{13}H_{16}BrN_3O_2S_2$. Вычислено: С 40,0; Н 4,13; N 10,76. ЯМР 1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 2,85 (4Н, м, тиоморфолино), 4,15 (4Н, м, тиоморфолино), 4,3 (2Н, с, CH_2S), 6,70-7,05 (3Н, м, C_6H_3), 8,50-9,40 (2Н, уш.с., OH).

Пример 9

2-Пирролидин-1-ил-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидрохлорид (9)

При слабом нагревании растворяли 2,9 г (20 ммоль) 4-тетраметилениминотиосемикарбазида в 100 мл конц. HCl и к бесцветному раствору добавляли 4,6 г (20 ммоль) α -бром-2,5-диоксиацетофенона, нагревали 30 мин при 80°C. Охлаждали и отфильтровывали желтый осадок и кристаллизовали из воды, подкисленной до рН 5. Выход 5,0 г (80%). Т.пл. 228-229°C. Найдено, %: С 49,44; Н 4,98; N 13,16. $C_{13}H_{16}ClN_3O_2S$. Вычислено, %: С 49,75; Н 5,14; N 13,49. ЯМР 1H

(DMCO-d₆), δ, м.д.: 2,08 (4H, уш.с., пирролидино), 3,82 (4H, с, пирролидино), 4,18 (2H, с, CH₂S), 6,80-6,81 (3H, м, C₆H₃), 9,06 (1H, уш.с., OH), 10,6 (1H, уш.с., OH).

Пример 10

2-Пиперидино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6H-1,3,4-тиадазин, гидробромид (10)
К раствору 2,4 г (15 ммоль) 4-пентаметиленимиотиосемикарбазида в 50 мл изопропилового спирта добавляли 3,4 г (15 ммоль) α-бром-2,5-диоксиацетофенона в 50 мл изопропилового спирта, кипятили 1 ч. Выпавший при нагревании осадок желтого цвета отфильтровывали и промывали охлажденным изопропиловым спиртом, сушили и перекристаллизовывали из подкисленной HBr воды (pH 4), сушили при 100°C. Выход 4,5 г (80%). Найдено, %: С 45,23; Н 5,02; N 11,32. C₁₄H₁₈BrN₃O₂S.

Вычислено, %: С 45,16; Н 4,87; N 11,29. ЯМР ¹H (DMCO-d₆), δ, м.д.: 1,76 (6H, с, пиперидино), 3,87 (4H, с, пиперидино), 4,24 (2H, с, CH₂S), 6,80-6,94 (3H, м, C₆H₃), 8,90 (1H, уш.с., OH), 11,18 (1H, уш.с., OH).

2. Исследование антиагрегационной активности *in vitro*

Материалы и методы:

Рабочие растворы исследуемых соединений готовили путем их разведения в дистиллированной воде при комнатной температуре или при нагреве до 50-70°C до достижения необходимой концентрации.

Эксперименты по исследованию антиагрегационной способности соединений были выполнены с использованием венозной крови здоровых доноров (n=50), которую получали путем пункции кубитальной вены и стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами. Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы "Chrono-Log Corporation" (США) по методу G. Born [5]. С этой целью в кювету прибора помещали 250 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащей тромбоцитов. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{max}) по сравнению с исходной величиной. Эксперименты проводили следующим образом: в кювету, содержащую 250 мкл богатой тромбоцитами плазмы, добавляли 28 мкл изучаемого препарата и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при температуре 37°C и индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации. В контрольных опытах к богатой тромбоцитами плазме добавляли только проагрегант. В качестве проагрегантов в работе использовали арахидоновую кислоту (АК) в конечной концентрации 1×10⁻³ М и АДФ (Boehringer Mannheim, Германия) в конечной концентрации 1×10⁻⁵ М. Арахидоновая кислота (АК), свободная от продуктов окисления, была предоставлена сотрудниками лаборатории оксипилов Института биорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.

Влияние 5-(4'-гидроксифенил)-6H-1,3,4-тиадазин-2 аминов (1-5) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

- Было изучено влияние на АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов 1,3,4-тиадазинов (1-5), содержащих в качестве заместителя в положении-5 тиадазинового кольца, - гидроксифенил (таблица 1).

Как видно из таблицы, антиагрегационной активностью обладают все изученные 1,3,4-тиадазины, но активность их различна и зависит от заместителя в положении-2 тиадазинового кольца.

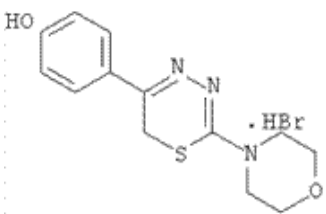
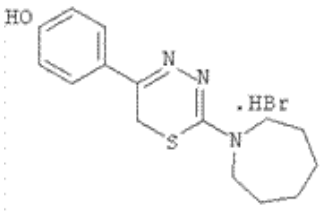
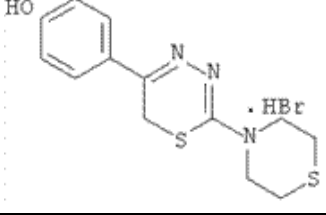
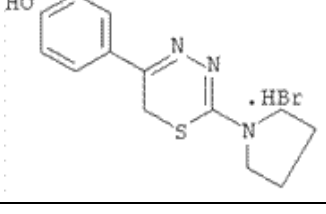
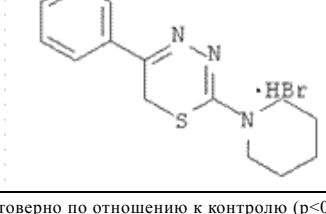
Так, наличие в структуре вещества пирролидинового приводит к резкому снижению антиагрегационной активности. Соединение 4 ингибировало АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов только в максимальных исследованных концентрациях (0,25-0,1 mM). Замена атома кислорода на атом серы в морфолиновом цикле также ухудшала антиагрегационную активность: вещество Н-75 достоверно снижало тромбоцитарное взаимодействие в концентрациях 0,25-0,1 mM. При этом в минимальной эффективной концентрации (0,25 mM) Н-75 ингибировало агрегацию тромбоцитов в 2 раза по сравнению с контрольным экспериментом.

Вещества 1, 2 и 5 ингибировали агрегацию тромбоцитов наиболее эффективно. Соединения 1 и 2 снижали агрегацию в два раза по сравнению с контролем в концентрациях менее 0,1 mM и менее 0,025 mM соответственно. Антиагрегационное действие соединения 5 продолжалось и при его использовании в более низких концентрациях (вплоть до 0,001 mM).

Таким образом, наиболее эффективным в случае АК-индуцированной агрегации оказалось вещество, содержащее в своей структуре пиперидин: 2-пиперидино-5-(4'-

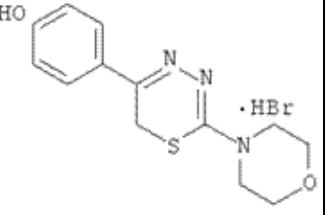
гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (5)

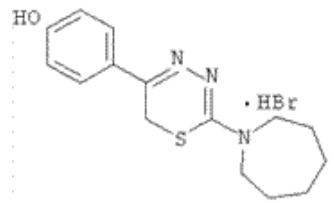
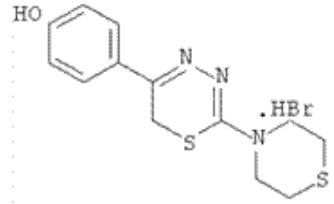
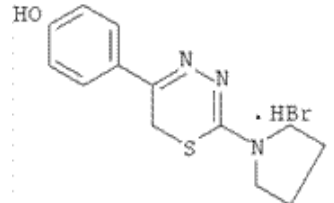
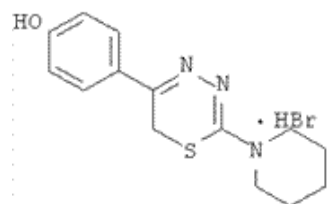
Соединения 3 и 4 ингибировали АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов только в максимальных исследованных концентрациях (0,25-0,1 мМ).

Таблица 1								
Влияние 5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 аминов (1-5) на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой (АК 1×10^{-3} М) in vitro (A_{max} , %)								
№	Исследуемое вещество	АК 1×10^{-3} М	Конечная концентрация, мМ					
			0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,001
1		54,5±1,7	4,5±1,1*	25,2±2,3*	-	35,9±2,7*	45,6±2,8	-
2		73,3±1,8	0*	15,0±3,2*	46,3±4,0*	57,3±5,4*	57,7±4,1*	61,7±4,2*
3		68,6±4,1	1,5±0,9*	29,3±5,3*	55,3±4,3	-	61,2±2,3	63,3±4,5
4		69,9±2,6	0*	18,3±5,5*	66,4±3,7	-	59,1±3,6	68,8±2,7
5		65,5±2,6	0*	6,8±1,8*	7,7±2,1*	-	49,5±3,4*	55,7±2,3*

* - достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

- Было изучено влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов 1,3,4-тиадиазин-2 аминов (1-5), содержащих в качестве заместителя в тиadiaзиновом кольце гидроксифенил (таблица 2).

Таблица 2							
Влияние 5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 аминов (1-5) на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ (АДФ 1×10^{-5} М) in vitro (A_{max} , %)							
№	Исследуемое вещество	АДФ 1×10^{-5} М	Конечная концентрация, мМ				
			1	0,5	0,1	0,01	0,001
1		57,7±3,2	35,0±1,9*	-	36,8±1,9*	45,6±2,4*	-
2		73,7±2,4	34,0±2,7*	44,3±3,8*	59,8±2,4*	67,1±2,1	66,4±3,7

							
3		59,7±3,7	43,4±3,9*	43,3±2,5*	51,4±3,4	51,8±4,1	51,1±3,1
4		64,9±2,0	25,7±2,5*	36,9±3,1*	43,6±2,6*	44,9±2,7*	42,8±2,3*
5		64,2±3,7	23,0±2,2*	32,5±1,5*	43,2±2,4*	46,7±2,2*	46,7±1,9*

* - достоверно по отношению к контролю (p<0,05)

Соединение 5 показало себя наиболее эффективным и в случае индуцирования тромбоцитарной агрегации АДФ (таблица 2). В максимальной исследованной концентрации (1 мМ) оно ингибировало тромбоцитарное взаимодействие более, чем в два раза по сравнению с контрольной величиной. Достоверное снижение АДФ-индуцированной агрегации наблюдалось во всем диапазоне концентраций соединения 5 (0,001-1 мМ), при этом даже в минимальных дозах данное соединение уменьшало активность тромбоцитов на 20-22%.

Другим соединением, оказывающим выраженное антиагрегационное действие на АДФ-индуцированную агрегацию, оказалось соединение 4, которое проявило активность, сопоставимую с соединением 5.

Тиадиазины, содержащие в своей структуре: морфолин, тиоморфолин, гексаметиленмин, были менее эффективны и достоверно ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию в концентрациях 0,1-1 тМ и 0,5-1 мМ соответственно.

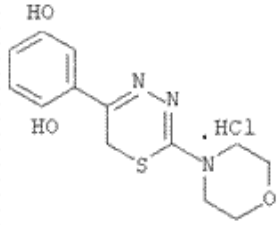
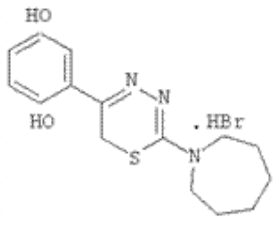
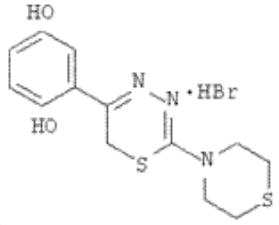
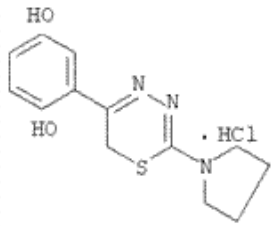
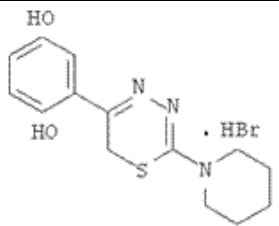
Таким образом, среди всех изученных соединений, содержащих в своей структуре гидроксифенил, наиболее эффективными, в случае АДФ-индуцированной агрегации, являются соединения-лидеры:

- 2-пирролидино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (4) и
- 2-пиперидино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (5).

Влияние 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2 аминов (6-10) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

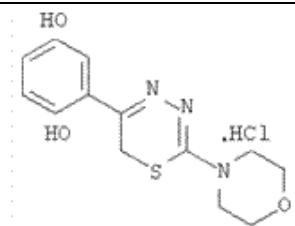
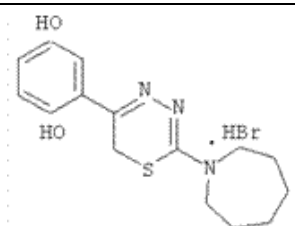
- Было изучено влияние на АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов 1,3,4-тиадиазин-2 аминов (6-10), содержащих в качестве заместителя в положении-5 тиадиазинового кольца дигидроксифенил (таблица 3).

Таблица 3								
Влияние 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-аминов (6-10) на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой (АК 1×10^{-3} М) <i>in vitro</i> (A_{max} , %)								
№	Исследуемое вещество	АК 1×10^{-3} М	Конечная концентрация, мМ					
			0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,001
6		74,2±2,0	0	8,1±1,8*	37,6±8,4*	41,3±5,3*	66,1±1,8	-

								
7		70,5±2,6	0*	0*	0,4±0,2*	10,6±4,1*	54,0±1,8*	73,3±1,8
8		77,5±1,8	0*	0*	2,0±1,1*	11,6±3,1*	64,7±3,0*	68,9±2,6
9		71,6±2,0	0*	2,4±1,2*	5,1±1,3*	45,3±4,5*	69,3±2,6	71,5±2,3
10		75,9±2,5	0	1,2±0,8*	2,9±1,1*	19,1±4,6*	64,2±3,0*	75,6±1,9

* - достоверно по отношению к контролю (p<0,05)

- Было изучено влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов 1,3,4-тиадиазин(6-10), содержащих в качестве заместителя в положении-5 тиадиазинового кольца дигидроксифенил (таблица 4).

Влияние 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6H-1,3,4-тиадиазин-2 аминов (6-10) на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную (АДФ 1×10^{-5} M) in vitro (A_{max} , %)							
	Исследуемое вещество	АДФ 1×10^{-5} M	Конечная концентрация, mM				
			1	0,5	0,1	0,01	0,001
6		61,8±1,6	22,6±2,0	29,1±1,9*	40,4±2,0*	44,3±1,7*	42,8±1,2*
7		62,4±1,9	-	34,9±1,4*	41,8±2,0*	46,7±1,4*	48,6±1,9*
8		58,5±2,0	36,8±2,2*	39,7±0,9*	40,3±1,9*	46,5±1,7*	51,3±1,8

9		68,6±2,5	37,5±2,3	44,7±1,9	45,4±2,5*	47,8±3,1*	46,0±3,4*
10		64,9±2,0	37,7±1,1*	40,8±1,1*	41,6±1,5*	46,9±1,8*	48,1±1,6*

* - достоверно по отношению к контролю (p<0,05)

Все исследованные 1,3,4-тиадиазины (6-10), содержащие в своей структуре дигидроксифенил, оказывали близкий по величине эффективный антиагрегационный эффект, как в случае АК-, так и в случае АДФ-индуцированной агрегации. Все соединения ингибировали АК-индуцированную агрегацию в концентрациях 0,01-0,25 мМ и АДФ-индуцированную агрегацию в концентрациях 0,001-1 мМ. Максимальный антиагрегационный эффект (снижение агрегации в 2 раза) наблюдалось у соединения-лидера 6 в концентрации 0,5 мМ и в 1,7 раза - у всех остальных соединений в концентрации 1-0,5 мМ.

Таким образом, в случае АК- и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, наличие в химической структуре морфолинового, пирролидинового, гексаметилениминового, тиоморфолинового или пиперидинового циклов не оказывает существенного влияния на антиагрегационную активность 5-(2',5'-гидроксифенил)-6H-1,3,4-тиадиазин-2 аминов (6-10).

- Были изучены интегральные параметры плазменного гемостаза крови кроликов для двух представителей (1 и 6) разных групп изученных соединений.

Таблица 5						
Влияние 2-морфолино-5-(4'-гидроксифенил)-6H-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (1) (20 мг/кг, в/в) на интегральные параметры плазменного гемостаза крови кроликов						
Исследуемый показатель	Время после введения, ч					
	0 (контроль)	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	24 часа
АЧТВ, с	16,63±1,51	16,30±0,98	16,19±1,61	17,48±2,49	15,77±2,17	16,13±1,46
Протромбиновое время, с	13,61±0,40	13,64±0,55	13,27±0,64	12,91±0,57*	12,80±0,74*	12,30±0,84*
Тромбиновое время, с	14,35±1,99	14,43±1,13	14,67±1,45	13,85±0,97	13,86±2,31	12,25±0,92
Концентрация фибриногена, г/л	2,86±0,44	3,18±0,93	3,33±1,30	3,15±0,45	3,11±0,99	3,08±0,49

* - достоверно по отношению к контролю (p<0,05)

Достоверное снижение АДФ-индуцированной агрегации наблюдалось через 4 часа после инъекции соединения 1. При этом тромбоцитарная агрегация снижалась на 7,5% по отношению к исходному уровню. Через сутки после введения, показатель агрегации восстановился (таблица 5, рис.1).

При болюсном внутривенном введении кроликам соединения 1 в дозе 20 мг/кг была установлена тенденция к укорочению протромбинового времени (таблица 4). Отмечалось достоверное уменьшение тромбинового времени с 14,35±1,99 с в контроле до 13,86±2,31 с спустя 4 часа после инъекции. Далее тромбиновое время продолжало укорачиваться, через сутки после введения данный показатель составил 12,25±0,92 с.

При болюсном внутривенном введении кроликам соединения 6 в дозе 20 мг/кг, в противоположность соединению 1, было отмечено достоверное удлинение

тромбинового времени на 20% по сравнению с исходным уровнем спустя 4 часа после инъекции (таблица 6, рис.2)

Влияние 2-морфолино-5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (6) (20 мг/кг, в/в) на интегральные параметры плазменного гемостаза крови кроликов						
Параметр	До введения (контроль)	Через 20 мин после введения	Через 1 час после введения	Через 2 часа после введения	Через 3 часа после введения	Через 4 часа после введения
АЧТВ, с	16,4±0,5	12,6±1,8	15,5±0,9	15,5±1,0	15,7±1,1	16,7±1,6
Протромбиновое время, с	11,3±1,0	10,2±0,9	11,5±0,9	11,0±1,0	10,6±0,9	11,2±1,0
Тромбиновое время, с	29,1±0,8	27,6±2,3	30,6±1,5	29,8±1,4	28,3±0,9	35,1±0,7*
Концентрация фибриногена, г/л	2,7±0,2	2,4±0,2	2,5±0,2	2,4±0,2	2,4±0,9	2,1±0,1

*- достоверно по отношению к контролю (p<0,05)

Промышленная применимость изобретения

Данные соединения могут быть использованы в качестве фармакологически активных веществ в производстве лекарств, позволяющих эффективно и достаточно быстро ингибировать тромбообразование, что крайне важно при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Как лекарственные препараты, они могут быть использованы для внутривенного введения и могут быть лекарствами скорой помощи.

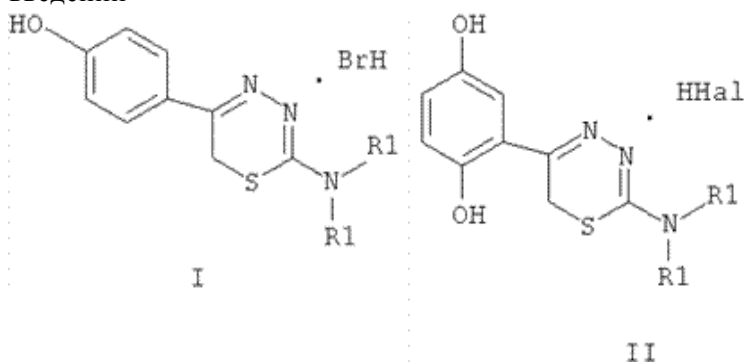
Краткое описание чертежей

Рис.1 - влияние 2-морфолино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (1) на АДФ- и АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика в дозе 20 мг/кг, ex vivo (проагреганты: АДФ в конечной концентрации 1×10^{-5} М; АК в конечной концентрации 1×10^{-3} М).

Рис.2 - влияние 2-морфолино-5-(2',5'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (6) (20 мг/кг, в/в) на тромбиновое время «ex vivo».

Формула изобретения

5-(4'-гидроксифенил)- и 5-(2',5'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин-2-амины, гидрогалогениды, ингибирующие агрегацию тромбоцитов при внутривенном введении



NR₁R₁=морфолино-; тиоморфолино-; пирролидино-; пиперидино-; гексаметиленимино-
HHal=HCl; HBr.

Графические материалы

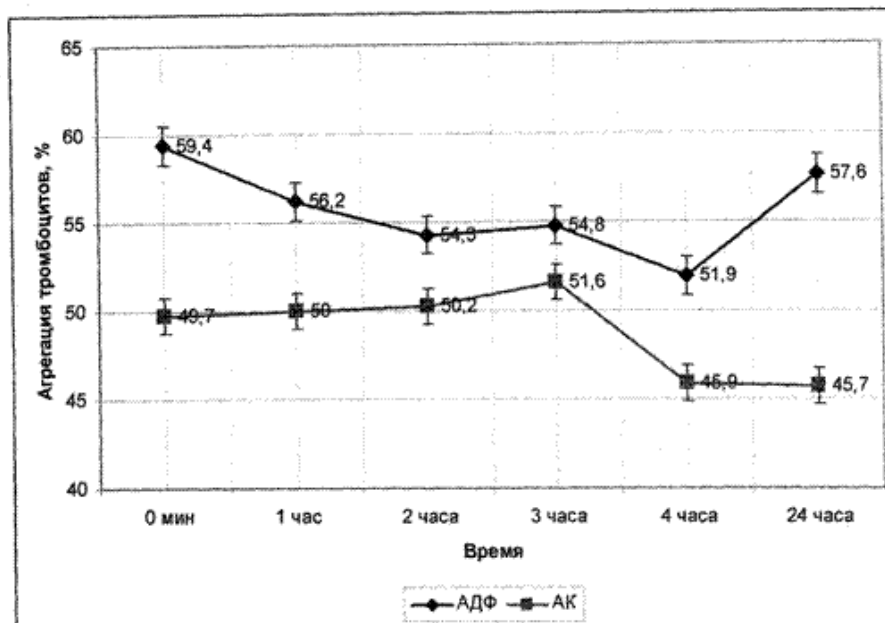


Рис. 1

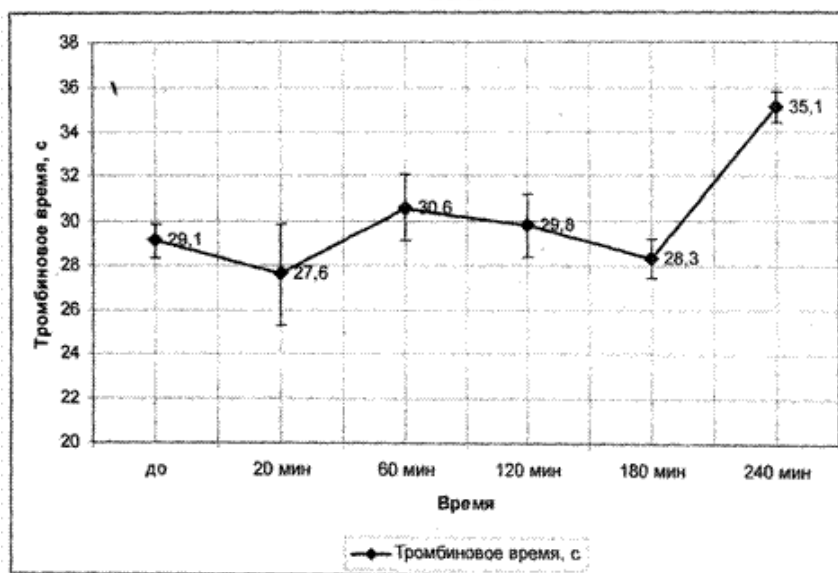


Рис. 2

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: 23.05.2014

Дата публикации: [10.04.2015](#)