



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/442 (2021.05); A61P 1/16 (2021.05); C07D 211/90 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021103783, 16.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.02.2021Дата регистрации:
15.09.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.02.2021

(45) Опубликовано: 15.09.2021 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
Н.Д.

(72) Автор(ы):

Кривоколыско Богдан Сергеевич (UA),
Доценко Виктор Викторович (RU),
Фролов Константин Александрович (UA),
Пересыпкина Анна Александровна (RU),
Бибик Елена Юрьевна (UA),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Кривоколыско Сергей Геннадиевич (UA)

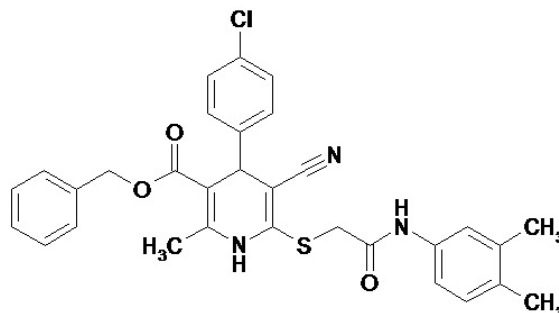
(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KRAUZE A.A. et al. *Pharmaceutical
Chemistry Journal*, 25(7), 1991, pp. 477-481. RU
2007126551 A, 20.01.2009. RU 2163597 C2,
27.02.2001. RU 2528898 C1, 20.09.2014. RU
2139278 C1, 10.10.1999.

(54) Применение бензил 6-({ 2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил } тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата в качестве гепатопротекторного средства

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению бензил 6-({ 2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил } тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата формулы (I) в качестве гепатопротекторного средства. Технический результат – найдена новая область применения соединения формулы (I) в медицине в качестве гепатопротекторного средства. 7 табл.



(I)



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/442 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07D 211/90 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/442 (2021.05); A61P 1/16 (2021.05); C07D 211/90 (2021.05)(21)(22) Application: **2021103783, 16.02.2021**(24) Effective date for property rights:
16.02.2021Registration date:
15.09.2021

Priority:

(22) Date of filing: **16.02.2021**(45) Date of publication: **15.09.2021** Bull. № 26

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovo j N.D.**

(72) Inventor(s):

**Krivokolysko Bogdan Sergeevich (UA),
Dotsenko Viktor Viktorovich (RU),
Frolov Konstantin Aleksandrovich (UA),
Peresykina Anna Aleksandrovna (RU),
Bibik Elena Yurevna (UA),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Krivokolysko Sergej Gennadievich (UA)**

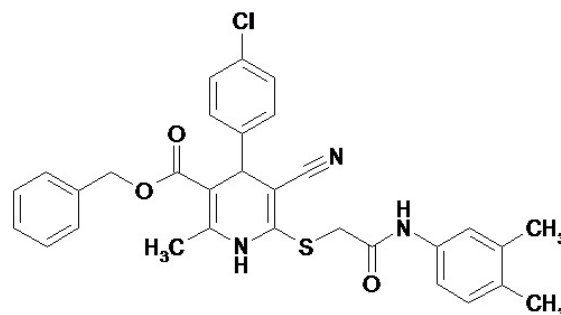
(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **APPLICATION OF BENZYL 6-({2-[(3,4-DIMETHYLPHENYL)AMINO]-2-OXOETHYL}THIO)-2-METHYL-4-(4-CHLOROPHENYL)-5-CYANO-1,4-DIHYDROPYRIDINE-3-CARBOXYLATE AS HEPATOPROTECTIVE AGENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to an application of benzyl 6-({2-[(3,4-dimethylphenyl)amino]-2-oxoethyl}thio)-2-methyl-4-(4-chlorophenyl)-5-cyano-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate by the formula (I) as a hepatoprotective agent.



(I).

EFFECT: proposed is a newly found field of application of a compound by the formula (I) in medicine as a hepatoprotective agent.

1 cl, 7 tbl

Изобретение относится к области медицинской химии и фармакологии, а именно к биологически активным соединениям, конкретно - к гепатопротекторной активности бензил 6-{{2-[(3,4- диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано- 1,4 - дигидропиридин-3 -карбоксилата.

5 Печень является основным детоксицирующим органом, играет ключевую роль в биотрансформации и удалении многих лекарств, других химических веществ. Поражение печени, вызванное ксенобиотиками, уже более 100 лет считается серьезной токсикологической проблемой [P1aa G.L., Charbonneau M., Plante I. Classification of Chemically Induced liver Injury // In: Hayes AW, Kruger CL, editors. Hayes' Principles and
10 Methods of Toxicology. Boca Raton: CRC Press. - 2014. - С. 1445- 1488]. Отмечается [Navarro V.J., Senior J.R. Drug-related hepatotoxicity // N Engl J Med. - 2006. - Vol. 354 (7) . - P. 731-739], [Cameron R.G., Feuer G. , de la Iglesia F.A., editors. Drug Induced Hepatotoxicity // Handbook of Experimental Pharmacology. - 1996. - Vol. 121. Berlin: Springer Verlag], что уровень смертности от лекарственного поражения печени колеблется от 10% до 50%
15 случаев. Несмотря на то, что печень способна к регенерации в случае частичного некроза, некоторые лекарства или токсичные травы могут привести к необратимым изменениям и, в конечном итоге, к смерти [Teschke R. , Frenzel C., Glass X., Schulze J., Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: a critical review // Brit J Clin Pharmacol. - 2013. - Vol. 75(3). - P. 630-636], [Chitturi S., Farrell G.C. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined
20 problem // J gastroenterol hepatol. - 2000. - Vol. 15(10). - P. 1093-1099], [Teschke R., Schwarzenboeck A., Eickhoff A., Frenzel C., Wolff A., Schulze J. Clinical and causality assessment in herbal hepatotoxicity // Exp Opin drug safety. - 2013. - Vol. 12(3). - P. 339-366], [Licata A., Macaluso F.S., Craxi A. Herbal hepatotoxicity: a hidden epidemic // Intern Emerg Med. - 2013. - Vol. 8(1). - P. 13-22], [Pandit A., Sachdeva T. , Bafna P. Drug-induced hepatotoxicity: a review
25 // J Appl Pharm Sci. - 2 012. - Vol. 2(5). - P. 233-43], [King P.D., Perry M.C. Hepatotoxicity of chemotherapy // The Oncologist. - 2001. - Vol. 6(2). - P. 162-176].

Ряд бытовых химикатов, спирт и обычные органические растворители, такие как хлорированные углеводороды (хлороформ, 1,2- дихлорэтан и особенно
30 четыреххлористый углерод), галонафталины, бензол и его производные (нитробензол, анилин, галогенбензолы, полифенолы), а также тяжелые металлы (Cd, Ni, Си, Hg и др.), обладают значительным гепатотоксическим действием [Zimmerman H. J. , Lewis J.H. Chemical- and toxin-induced hepatotoxicity // Gastroenterol Clins N Am. - 1995. - Vol. 24(4). - P. 1027-1045], [Singh D., Cho W.C., Upadhyay G. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: an overview // Front Physiol. - 2016. № 6. - Article 363], [Teschke R.
35 Aliphatic Halogenated Hydrocarbons: Report and Analysis of Liver Injury in 60 Patients // J Clin Translat Hepatol. - 2018. - Vol. 6(4). - P. 350-361], [Shakya A.K. Drug-induced Hepatotoxicity and Hepatoprotective Medicinal Plants: A Review // Ind J Pharm Educat Res. - 2 020. - Vol. 54 (2) . - P. 234-250], [Chai P, Samuel D. Epidemiology of liver failure // Clin Res Hepat Gastr. – 2011. – Vol. 35(10). – P. 610-617], [Farkas D., Tannenbaum S.R. In Vitro Methods to Study
40 Chemically-Induced Hepatotoxicity: A Literature Review // Curr Drug Metabolism. – 2005. - № 6. – P. 111-125].

Обзор литературы указывает на рост лекарственно-индуцированных поражений печени, причем наиболее тяжелые токсические поражения печени происходят из-за
45 длительного применения более высоких терапевтических доз парацетамола, тетрациклина, противотуберкулезных препаратов изониазида, рифампицина и др. [Leise M.D., Poterucha J.J., Talwalkar J.A. Drug-induced liver injury // Mayo Clin Proc. – 2014. – Vol. 89(1). – P.95–106], [Cano-Paniagua A., Amariles P, Angulo N., Restrepo-Garay M. Epidemiology of drug-induced liver injury in a University Hospital from Colombia: Updated RUCAM Being

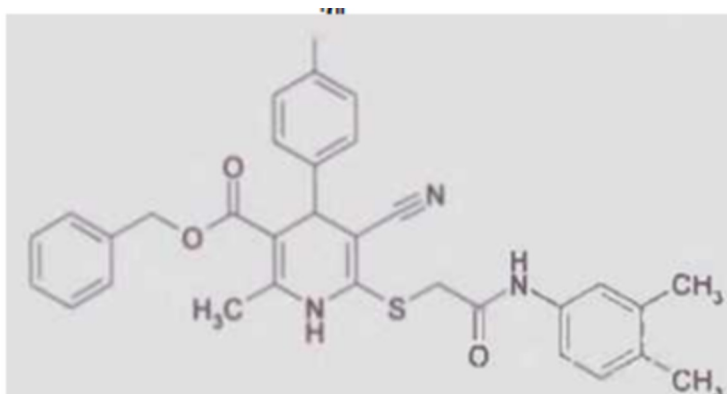
used for prospective causality assessment // *Ann Hepat.* – 2019. – Vol. 18(3). – P. 501-507], [Anusha R., Chand S., Lal V., Sushmitha D.M., Reddy D.S., Tejaswini S., Chitrasahini S. Isoniazid Induced Liver Injury; a Case Series and Review // *J Pharm Pract Community Med.* – 2018. – Vol. 4(2). – P. 128-30], [Ju H.Y., Jang J.Y., Jeong S.W., Woo S.A., Kong M.G., Jang H.Y., Lee S.H., Kim S.G., Cha S.W., Kim Y.S., Cho Y.D., Jin S.Y., Kim H.S., Kim B.S. The clinical features of drug-induced liver injury observed through liver biopsy: focus on relevancy to autoimmune hepatitis // *Clinic Mol Hepat.* – 2012. – Vol. 18(2). – P. 213-18].

В современной клинической практике для предотвращения поражения печени используются специальные гепатопротекторы (обзоры: [Ram V.J. Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents // *Drug news Perspect.* – 2001. – Vol. 14(6). – P. 353-363], [Ilyas U., Katare D.P., Aeri V., Naseef P.P. A review on hepatoprotective and immunomodulatory herbal plants // *Pharmacognosy Rev.* – 2016. – Vol. 10(19). – P. 66], [Xu G.B., Xiao Y.H., Zhang Q.Y., Zhou M., Liao S.G. Hepatoprotective natural triterpenoids // *Eur J Med Chem.* – 2018. - № 145. – P. 691-716], [Karimi-Sales E., Mohaddes G., Alipour M.R. Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms // *Pharmacol Res.* – 2018. - № 129. – P. 177-187], [Nair D.G., Weiskirchen R., Al-Musharafi S.K. The use of marine-derived bioactive compounds as potential hepatoprotective agents // *Acta Pharm Sinica.* – 2015. – Vol. 36(2). – P. 158-170], [Weiskirchen R. Hepatoprotective and anti-fibrotic agents: It's time to take the next step // *Front Pharmacol.* – 2016. - № 6. – P. 303]). Сложные травяные составы и растительные лекарственные средства являются наиболее часто используемыми для этих целей [Ram V.J. Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents // *Drug news Perspect.* – 2001. – Vol. 14(6). – P. 353-363], [Ilyas U., Katare D.P., Aeri V., Naseef P.P. A review on hepatoprotective and immunomodulatory herbal plants // *Pharmacognosy Rev.* – 2016. – Vol. 10(19). – P. 66], [Jiménez-Arellanes M.A., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Meckes-Fischer M., León-Díaz R. Medical plant extracts and natural compounds with a hepatoprotective effect against damage caused by antitubercular drugs: A review // *Asian Pacif J Trop Med.* – 2016. – Vol. 9(12). – P. 1141-1149], [Asadi-Samani M., Kafash-Farkhad N., Azimi N., Fasihi A., Alinia-Ahandani E., Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine // *Asian Pacif J Trop Biomed.* – 2015. – Vol. 5(2). – P. 146-157], [Tabeshpour J., Hosseinzadeh H., Hashemzadeh M., Karimi G. A review of the hepatoprotective effects of hesperidin, a flavanon glycoside in citrus fruits, against natural and chemical toxicities // *DARU J Pharm Sci.* - 2020. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00344-x>], [Mandegary A., Saeedi A., Eftekhari A., Montazeri V., Sharif E. Hepatoprotective effect of silymarin in individuals chronically exposed to hydrogen sulfide; modulating influence of TNF- α cytokine genetic polymorphism // *DARU J Pharm Sci.* - 2013. - Vol. 21(1). - P. 28], но и некоторые индивидуальные вещества также оказались эффективными. Среди них были упомянуты метформин [Iranshahy M., Rezaee R., Karimi G. Hepatoprotective activity of metformin: A new mission for an old drug? // *Eur J Pharmacol.* - 2019. - № 850. - P. 1-7], гетероциклы серы [Ram V.J., Haque N., Singh S.K., Nath M., Shoeb A., Tripathi S.C., Patnaik G.K. Synthesis of sulphur heterocycles as hepatoprotectants: part I // *Bioorg Med Chem Lett.* -1994. - Vol. 4(12). - P. 1453-1456], [Ishida N., Nakata K., Tanaka M., Takase K., Mita S. The protective effects of (4R)-hexahydro-7,7-dimethyl-6-oxo-1,2,5-dithiazocine-4-carboxylic acid (SA3443), a novel cyclic disulfide, on chemically-induced acute liver injury // *Jpn J Pharmacol.* - 1991. - Vol. 55(2). - P. 275-278], [Chen Z.Z., Xie Y.D., Shao L.H., Wang Q.T., Xu Y.H., Bian X.L. 5-(4-Hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione-based fibrates as potential hypolipidemic and hepatoprotective agents // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2018. - Vol. 28(23-24). - P. 3787-3792], бициклические пиримидины [Ram V.J., Goel A., Sarkhel S., Maulik P.R. A convenient synthesis and hepatoprotective activity of imidazo[1,2-c]pyrimido[5,4-e]pyrimidine, tetraazaacenaphthene

and tetraazaphenalene from cyclic ketene amins through tandem addition-cyclization reactions // *Bioorg Med Chem.* - 2002. - Vol. 10(5). - P. 1275-1280], хризин [Pingili R.B., Pawar A.K., Challa S.R., Kodali T., Koppula S., Toleti V. A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents // *Chem Biol Interact.* - 2019. - № 308. - P. 51-60].

Задача, на решение которой направлено изобретение, заключается в установлении выраженной гепатопротекторной активности бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата.

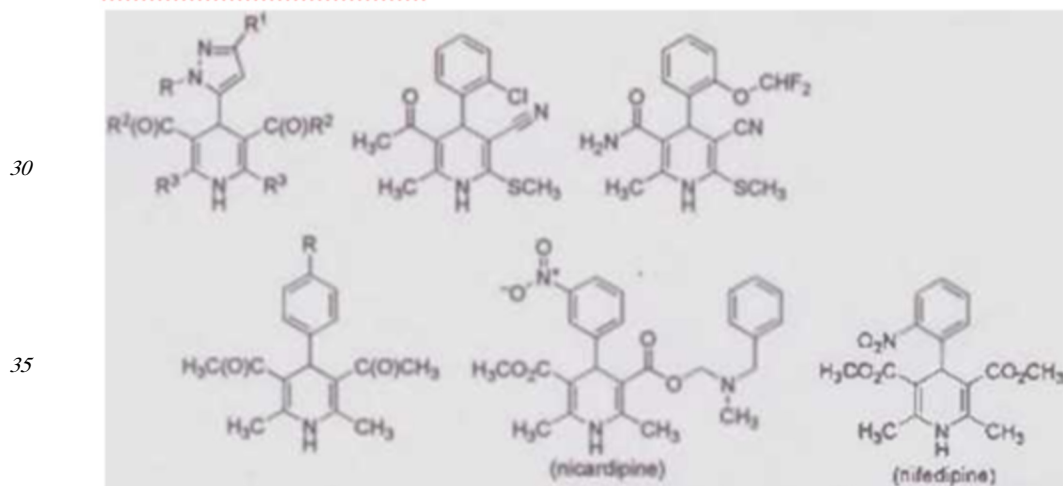
Поставленная задача решается применением бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата формулы (I) в качестве гепатопротекторного средства, разработка способа диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}



получения бензил 6-({2-[(3,4-тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата (I) и изучением его гепатопротекторной активности в сравнении со средством растительного происхождения - карсилем (Carsil, силимарин; обзоры: [Fraschini F., Demartini G., Esposti D. Pharmacology of silymarin // *Clin Drug Invest.* - 2002. - Vol. 22(1). - P. 51-65], [Mayer K.E., Myers R.P., Lee S.S. Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review // *J Viral Hepatitis.* - 2005. - Vol. 12(6). - P. 559-567], [Kshirsagar A., Ingawale D., Ashok P., Vyawahare N. Silymarin: A comprehensive review // *Pharmacognosy Rev.* - 2009. - Vol. 3(5). - P. 126-134].

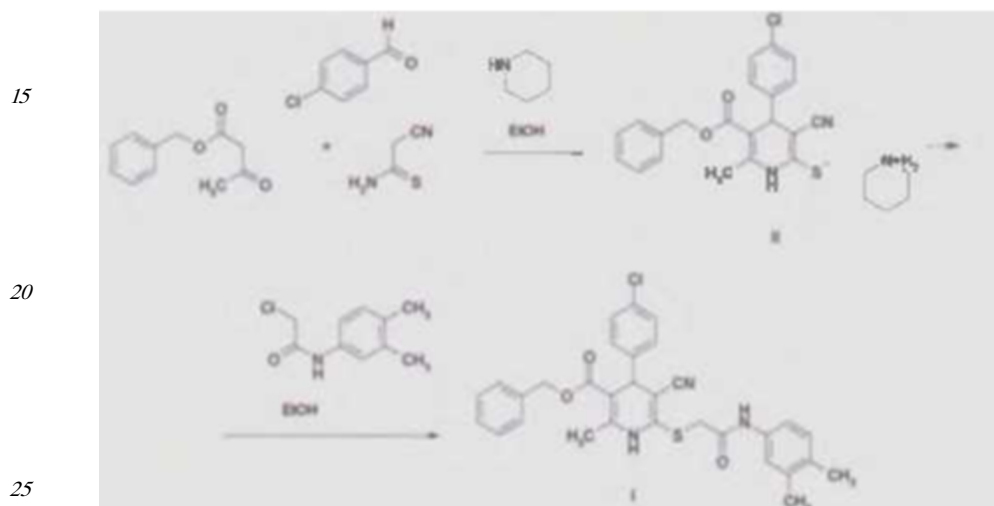
Наиболее близкими по химическому строению к предлагаемому соединению являются 1,4-дигидропиридины Ганча (ДНП), которые в основном известны своими сердечно-сосудистыми эффектами и обычно рассматриваются как лиганды кальциевых каналов [Triggle D.J. 1,4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures // *Cell Mol Neurobiol.* - 2003. - Vol. 23(3). - P. 293-303], [Edraki N., Mehdipour A.R., Khoshneviszadeh M., Miri R. Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications // *Drug Discov Today.* - 2009. - Vol. 14(21-22). - P. 1058-1066], [Kastron V.V., Vitolin' R.O., Dubur G.Y. Synthesis and pharmacological activity of 1,4-dihydropyridines // *Pharm Chem J.* - 1990. - Vol. 24(6). - P. 394-403], [Lavilla R. Recent developments in the chemistry of dihydropyridines // *J Chem Soc Perkin Trans 1.* - 2002. - № 9. - P. 1141-1156], противотуберкулезные и противораковые препараты [Sepehri S., Sanchez H.P., Fassihi A. Hantzsch-type dihydropyridines and Biginelli-type tetrahydropyrimidines: a review of their chemotherapeutic activities // *J Pharm Pharm Sci.* - 2015. - Vol. 18(1). - P. 1-52], однако для нескольких ДНП, отмечается их гепатопротекторная активность [Chekavichus B.S., Odynets A.G., Sausin' A.É., Berzinya D.A., Zolotoyabko R.M., Liepin'sh É.É., Dubur G.Ya. Synthesis and hepatoprotectant properties of 4-pyrazolyl-1,4-dihydropyridines // *Pharm Chem J.* - 1987. - Vol. 21(8). - P. 581-587], [Krauze A.A., Odynets A.G., Verreva A.A., Germane S.K., Kozhukhov A.N., Dubur G.Ya. Synthesis and hepatoprotectant activity of 5-carbamoyl- and 5-

- acetyl-2-alkylthio-6-methyl-4-aryl-3-cyano-1,4-dihydropyridines // Pharm Chem J. – 1991. – Vol. 25(7). – P. 477-481], [Bhaumik A., Reddy G.V.C., Pasha S.Y., Shareef S., Nagababu R. Synthetic Novel 1,4-Dihydropyridine Derivatives Act as Potential Hepatoprotective Agent against CCl₄ Induced Rat Hepatocytes // J Pharm Pharmacol. – 2015. - № 3. – P. 80-89], [Wei Y., Lu Y., Zhu Y., Zheng W., Guo F., Yao B., Xu S., Wang Y., Jin L., Li Y. Structural basis for the hepatoprotective effects of antihypertensive 1,4-dihydropyridine drugs // Biochim et Biophys Acta (BBA)-General Subjects. – 2018. – Vol. 1862(10). – P. 2261-2270], [Drocourt L., Pascussi J.M., Assenat E., Fabre J.M., Maurel P., Vilarem M.J. Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes // Drug Metabolism and Disposition. – 2001. – Vol. 29(10). – P.1325-1331], [Ellouk-Achard S., Mawet E., Thibault N., Dutertre-Catella H., Thevenin M., Claude J.R. Protective effect of nifedipine against cytotoxicity and intracellular calcium alterations induced by acetaminophen in rat hepatocyte cultures // Drug Chem Toxicol. -1995. – Vol.18(2-3). – P. 105-117].
- Механизм гепатопротекторного действия 1,4-дигидропиридинов до сих пор остается неясным в деталях и, вероятно, связан со связыванием DHP с рецептором фарнезоида X (FXR, NR1H4) [Wei Y., Lu Y., Zhu Y., Zheng W., Guo F., Yao B., Xu S., Wang Y., Jin L., Li Y. Structural basis for the hepatoprotective effects of antihypertensive 1,4-dihydropyridine drugs // Biochim et Biophys Acta (BBA)-General Subjects. – 2018. – Vol. 1862(10). – P. 2261-2270] или вызван индукцией CYP3A4 через активацию рецептора прегнана X (hPXR) в гепатоциты человека [Drocourt L., Pascussi J.M., Assenat E., Fabre J.M., Maurel P., Vilarem M.J. Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes // Drug Metabolism and Disposition. - 2001. - Vol. 29(10). - P. 1325-1331]. Известные DHP с гепатопротекторной активностью представлены ниже.



- Информация о соединении (I) содержится только в электронном ресурсе PubChem (режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, см. номер соединения CID 24324247, дата публикации 29.02.2008), где приводятся созданная с помощью графического редактора его структурная формула, название по IUPAC, виртуальное описание и возможные коммерческие поставщики. Однако сведения относительно исходных соединений, способов получения, реальных экспериментальных физико-химических и других свойств, примеров практического применения и авторов соединения (I) нигде ранее не были описаны (поиск осуществлялся также и в базах данных по химическим наукам Reaxys [www.reaxys.com] и SciFinder – CAS [<https://www.cas.org/products/scifinder/content/>]), его получали по аналогии с ранее описанными методами [Krauze A.A., Liepin'sh

5 $\ddot{E}.\ddot{E}.$, Pelcher Yu.E., Dubur G.Ya. Synthesis of 3-amino-6-methyl-5-ethoxycarbonyl-4,7-dihydrothieno[2,3-b]pyridine derivatives // Chem Heterocycl Compds. - 1987. - Vol. 23(1). - P. 102-106], [Krauze A., Duburs G. Synthesis and properties of 3-cyano-4-(4-cyanophenyl)-1,4-dihydropyridine-2(3H)-thiones // Chem Heterocycl Compds. - 2000. - Vol. 36(6). - P. 693-697],
 10 [Krivokolysko S.G., Dyachenko V.D., Litvinov V.P. Three-component condensation in the synthesis of 4-(2-chlorophenyl)-3-cyano-5-ethoxycarbonyl-6-propyl-3,4-dihydropyridine-2(1H)-thione // Russ Chem Bull. - 2000. - Vol. 49(1). - P.176-178] следующим образом: тиолат (II), который образуется при тройной конденсации по типу Ганча цианотиоацетамида, бензилацетоацетата и 4-хлорбензальдегида в присутствии пиперидина, обрабатывали
 15 N-(3,4-диметилфенил)-а- хлорацетанилидом в горячем 80% водном этаноле. Ниже представлена схема получения бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата (I).



Биологически активное соединение - бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилат (I), проявляет выраженное гепатопротекторное действие перед препаратом сравнения растительного происхождения карсиллом.

30 Технический результат заключается в способности - бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата (I) проявлять в эксперименте более выраженное гепатопротекторное действие чем у препарата сравнения карсил.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

Пример

35 Тиолат (II) (20 ммоль), полученный тройной конденсацией по типу Ганча цианотиоацетамида (20 ммоль) [Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G., Polovinko V.V., Litvinov V.P. On the regioselectivity of the reaction of cyanothioacetamide with 2-acetylcyclohexanone, 2-acetylcyclopentanone, and 2-acetyl-1-(morpholin-4-yl)-1-cycloalkenes // Chem Heterocycl
 40 Compds. - 2012. - Vol. 48(2). - P. 309-319], бензилацетоацетата (20 ммоль) и 4-хлорбензальдегида (20 ммоль) в присутствии пиперидина (20 ммоль), обрабатывали N-(3,4-диметилфенил)-а-хлорацетанилидом (20 ммоль) в горячем 80% водн. EtOH (30 мл). Реакционной смеси давали постоять при 25°C в течение 12 ч. Белый осадок отфильтровывали, промывали EtOH с получением чистого бензил 6-({2-((3,4-
 45 диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата (I) (выход 78%).

Белый кристаллический порошок, т.пл.195-198°C (EtOH).

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C DEPTQ записаны на приборе Bruker Avance III HD (400,17 МГц для ^1H и 100,63 МГц для ^{13}C) в ДМСО- d_6 с использованием Me_4Si в качестве внутреннего стандарта. Значения химических сдвигов (5) были указаны в частях на миллион (ppm), константы взаимодействия (J) в герцах, а множественности даны как s (синглет), br s (широкий синглет), d (дублет), АВ q (квартет АВ) и m (мультиплет). Звездочкой (*) обозначены сигналы атомов углерода в противофазе в спектрах ЯМР ^{13}C DEPTQ.

ИК-спектр записан на спектрофотометре Shimadzu IR Affinity-1S с приставкой НПВО (призма ZnSe).

Элементный анализ выполнен на приборе Carlo-Erba 1106 Elemental Analyzer, погрешность измерения $\pm 0,4\%$. Чистоту соединения контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254, используя ацетон-гексан (1:1) в качестве элюента и визуализируя в парах йода или в УФ-свете. Температуры плавления соединения были измерены с использованием микроскопа на столике Кофлера и не корректировались.

^3H ЯМР спектр, 5, ppm (J, Гц): 2.16, 2.18, 2.33 (все 3H, s, 3 H_3C), 3.93 (2H, АВ q, SCH_2 , ^2J 14.8), 4.55 (1H, s, H-4 пиридин), 5.00 (2H, АВ q, OCH_2Ph , ^2J 12.7), 7.07-7.37 (12H, m, H-Ar), 10.03 (1H, br s, NH), 10.29 (1H, br s, NH).

^{13}C ЯМР (DEPTQ) спектр, 5, ppm: 18.6*, 18.8*, 19.6* (3 CH_3), (SCH_2), 41.5* (HC-4 пиридин), 65.1 (OCH_2Ph), 88.7 (C-5 пиридин), (C-3 пиридин), 117.1* (CH Ar), 118.8 (C=N), 120.7* (CH Ar), 127.6* (CH Ar), 127.8* (CH Ar), 128.3* (CH Ar), 128.6* (CH Ar), 128.9* (CH Ar), 129.7* (CH Ar), 131.7 (C-Ar), 131.9 (C-Ar), 136.1 (C-Ar), 136.4 (C-Ar), 136.5 (C-Ar), 143.3 (C-Ar), 144.1 (C-6 пиридин), 146.8 (C-2 пиридин), 165.8 (CO_2Ph), 166.8 (C(O)NHAr).

ИК спектр, v/cm^{-1} : 3306, 3034 (N-H), 2938, 2890 (C-H), 2208 (ChN), 1707, 1659 (C=O).
Найдено, %: C 66.48; H 4.95; N 7.34. Вычислено, %: C 66.72; H 5.06; N 7.53.

$\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$, M 558.09.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗАЯВЛЕННОГО СОЕДИНЕНИЯ

Исследование фармакологической активности соединения (I) включало в себя определение биохимических показателей крови и органомерических показателей печени крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом.

Соединение (I) было отобрано из небольшой библиотеки 350+ новых 1,4-дигидропиридинов, которая была проанализирована для прогнозирования возможной активности, целей и параметров ADMET с использованием сервисов OSIRIS Property Explorer [Sander T. OSIRIS Property Explorer. Idorsia Pharmaceuticals Ltd., Switzerland, Avail. URL: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>], SwissADME [Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // Sci Rep. – 2017. - Vol. 7. - Article № 42717], SwissTargetPrediction [Gfeller D., Grosdidier A., Wirth M., Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42(W1). – P. W32-W38], Molinspiration Property Calculation Service [Molinspiration Property Calculation Service. Molinspiration Cheminformatics, Slovak Republic, 2002. Avail. URL: www.molinspiration.com], PASS Online [PASS Online, Laboratory for Structure-Function Based Drug Design, Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia. Avail. URL: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>], [Filz O.A., Poroikov V.V. Design of chemical compounds with desired properties using fragment libraries // Russ Chem

Rev. – 2012. – Vol. 81(2). – P. 158-174] и AntiBac-Pred [Way2Drug, AntiBac-Pred. Laboratory for Structure-Function Based Drug Design, Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia. Avail. URL: <http://way2drug.com/antibac/>].

5 В этой группе веществ соединение (I) показало самую высокую предполагаемую гепатопротекторную активность, связанную с влиянием на протекание соответствующих биологических процессов в печени, такие как синтез белков, мембранопротекцию гепатоцитов, для него в качестве потенциальных биологических мишеней были признаны микротрубочно-ассоциированные белки (MAPs), тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, рибосомальный белок S6 киназа, серин/треонин-протеиновая киназа PLK1-3, рецепторы аденозина A1, A2a, A2b, A3.

10 Дальнейшие исследования биологических эффектов проводились в сертифицированной лаборатории *in vivo* на 40 белых половозрелых крысах-самцах весом 200-240 г в осенний период. В течение всего периода исследований животные содержались в нормальных лабораторных условиях, не более восьми особей на клетку, со свободным доступом к воде и стандартному корму для крыс. Условия содержания и манипуляции с крысами полностью соответствовали принятым зоогигиеническим параметрам и требованиям, изложенным в методических рекомендациях по этике биомедицинских исследований. Перед проведением экспериментов все крысы были тщательно обследованы на заболевания любого вида, были зафиксированы их вес и возраст.

20 В качестве экспериментальной модели острого токсического поражения печени служил патологический процесс, который развивается у животных после введения тетрахлорметана (CCl₄) в 50% растворе рафинированного подсолнечного масла внутрижелудочно однократно в сутки в дозе 4 мл/кг в течение 3 дней. Перед началом эксперимента все лабораторные белые беспородные крысы были распределены на 25 четыре группы: первая - интактная (без патологии), вторая - контрольная (животные с острым тетрахлорметановым гепатитом, которым вводили 1,5 мл физиологического раствора внутрижелудочно за трое суток до моделирования острого токсического поражения печени и на протяжении 3 суток введения масляного раствора тетрахлорметана), третья группа - сравнения (карсил в дозе 100 мг/кг ежедневно с профилактической целью за трое суток до моделирования острого токсического поражения печени и на протяжении 3 суток введения масляного раствора тетрахлорметана). Крысы четвертой группы получали с профилактической целью трое 30 суток внутрижелудочно ежедневно образец исследуемого соединения (I) в дозе 5 мг/кг в виде водной взвеси, а также в течение моделирования острого токсического поражения печени это же соединение в такой же дозировке.

35 За животными всех групп осуществлялся визуальный мониторинг поведенческой активности, аппетита, жажды, состояния шерстяного покрова. После окончания эксперимента на восьмые сутки был произведен забор крови из бедренной вены. 40 Учитывая наличие циркадных ритмов, эвтаназию крыс осуществляли в одно и то же время суток в 9 часов с извлечением из брюшной полости подопытных белых крыс печени. Стандартными методиками на спектрофотометре SOLAR PM 2111 определяли уровень общего билирубина, активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы, тимоловую пробу. Данные были проанализированы с использованием языка программирования R (версия 2.15.3, R Core Team 2013), также использовали критерий суммы рангов Вилкоксона (Wilcoxon rank-sum test) для статистического анализа. После извлечения печени из брюшной полости измеряли ее абсолютную и 45 относительную массу, длину и ширину долей органа – с использованием штангенциркуля.

Как показали результаты проведенных экспериментальных исследований, острый тетрахлорметановый гепатит у крыс контрольной группы приводил к достоверному, более чем трехкратному увеличению концентрации общего билирубина. Параллельно с этим было зафиксировано увеличение активности печеночных трансаминаз – АЛТ на 169,8% и АСТ на 221,6%, что свидетельствует о высокой интенсивности патологического процесса и повреждении мембран гепатоцитов.

Применение соединения (I) в дозе 5 мг/кг внутрижелудочно однократно в сутки на протяжении 6 дней способствовало восстановлению биохимических и функциональных показателей у экспериментальных животных опытной группы. Это сопровождалось достоверным ($p < 0,001$), относительно контрольных значений, снижением содержания общего билирубина, также активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы и тимоловой пробы. Наблюдаемый фармакологический эффект соединения (I) по этим биохимическим маркерам повреждения печеночной паренхимы существенно превосходил таковой у карсила.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Визуальное наблюдение в динамике за поведением подопытных животных показало, что наиболее выраженная агрессия была установлена у крыс контрольной группы. В этой группе животных на последние сутки эксперимента зарегистрирована гибель двух крыс.

При наблюдении за животными в процессе эксперимента была установлена гибель одной крысы на вторые сутки введения масляного раствора тетрахлорметана в группе сравнения (карсил). При внешнем осмотре крысы опытной группы соединения (I) были самыми активными, спокойно реагировали на манипуляции, гибели в этой группе не наблюдалось. Кроме того, отечность слизистой оболочки глотки и пищевода животных этой опытной группы была минимальной в сравнении с таковой у крыс других групп, поскольку желудочный зонд без затруднений вводился в желудок крыс.

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, уровень общего билирубина в биохимическом анализе крови крыс контрольной группы достоверно ($p < 0,03$) увеличивается в 3,37 раза по сравнению с показателями, зарегистрированными у подопытных животных интактной группы.

Таблица 1

Показатели общего билирубина крови крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Mean	Median	Lower (Quartile)	Upper (Quartile)	Std.Dev.	p-value
Интактная	2,16	2,03	1,32	2,86	0,98	0,003
Контрольная	6,58	6,88	6,03	7,10	0,83	
Сравнения (карсил)	3,12	2,53	2,12	3,52	1,72	0,01
Опытная (соединение I)	1,40	1,11	0,52	1,74	1,20	0,003

Острое тетрахлорметановое поражение печени, моделируемое нами у крыс контрольной группы, привело к увеличению активности такого фермента печени, как АСТ на 221,6%, что свидетельствует об интенсивности патологического процесса и

повреждении гепатоцитов, как видно из данных таблицы 2.

Таблица 2

Активность аспартатаминотрансферазы крови крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Mean	Median	Lower (Quartile)	Upper (Quartile)	Std.Dev.	p-value
Интактная	1,54	1,49	1,33	1,68	0,30	0,003
Контрольная	3,39	3,47	3,04	3,67	0,39	
Сравнения (карсил)	1,74	1,64	1,59	1,74	0,25	0,003
Опытная (соединение (I))	2,07	1,81	1,74	2,00	0,73	0,02

Еще одним маркером функционального состояния печени является щелочная фосфатаза, активность которой у крыс контрольной группы выше на 167% в сравнении с таковой, зарегистрированной у животных интактной группы (таблица 3).

Таблица 3

Активность щелочной фосфатазы крови крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Mean	Median	Lower (Quartile)	Upper (Quartile)	Std.Dev.	p-value
Интактная	3072,8	2960,5	2845,3	3071,3	397,3	0,001
Контрольная	5143,9	4989,0	4831,5	5573,0	550,8	
Сравнения (карсил)	3364,6	3419,5	2521,8	4196,5	939,0	0,002
Опытная (соединение (I))	2969,2	2901,5	2380,0	3731,1	964,1	0,001

У крыс группы сравнения, получавших карсил с профилактической и фармакотерапевтической целью, выявлено снижение уровня билирубина в 2,11 раза в сравнении с животными контрольной группы, однако этот показатель в 1,6 раза больше, чем у интактных крыс. Показатели активности щелочной фосфатазы и АСТ у крыс группы сравнения приближаются к значениям, зарегистрированным у животных интактной группы.

Тимоловая проба в крови крыс контрольной группы увеличилась в 2,6 раза по сравнению с таковой у крыс интактной группы (таблица 4).

Таблица 4

Тимоловая проба в крови крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>Lower (Quartile)</u>	<u>Upper (Quartile)</u>	<u>Std.Dev.</u>	<u>p-value</u>
Интактная	0,73	0,68	0,47	0,89	0,29	0,003
Контрольная	1,91	1,52	1,42	2,51	0,60	
Сравнения (карсил)	0,67	0,49	0,47	0,70	0,49	0,02
Опытная (соединение (I))	0,43	0,38	0,33	0,47	0,14	0,003

В крови крыс опытной группы с моделируемым токсическим тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекцией соединением (I) значения общего билирубина в 4,7
 15 раза меньше таковых у животных контрольной группы. Более того, этот показатель ниже на 25,6%, чем у интактных животных, тогда как препарат сравнения – карсил, способен уменьшить уровень общего билирубина в 2,11 раза в сравнении с таковым значением у крыс контрольной группы. Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ)
 20 крови крыс опытной группы была снижена на 39,2% по сравнению с контрольной группой. Активность щелочной фосфатазы была на 42,3% ниже, чем у крыс контрольной группы и соответствовала таковой, зарегистрированной в группе интактных животных. Достоверные различия ($p < 0,001$) нами зафиксированы при исследовании показателей тимоловой пробы крыс опытной группы (соединение (I) в сравнении с контрольной
 25 группой.

Как видно из приведенных в таблицах 5-7 результатов морфологических
 органомерических исследований, абсолютная масса печени крыс контрольной группы с острым тетрахлорметановым гепатитом имеет тенденцию к увеличению. Относительная масса печени крыс контрольной группы характеризуется аналогичной
 30 тенденцией по сравнению с показателями, зарегистрированными у подопытных животных интактной группы.

Следует акцентировать внимание на достоверном увеличении абсолютной (на 30,2%)
 и относительной масс (на 23,6%) печени крыс группы сравнения, которые получали растительный гепатопротектор карсил с профилактической и терапевтической целью,
 35 по сравнению с интактной группой.

Таблица 5

Данные органомерических исследований печени крыс с острым тетрахлорметановым
 гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Масса животных	Абсолютная масса печени	Относительная масса печени
<u>Интактная</u>	196,67 ±9,24	7,5 ±0,55	0,03813
Контрольная	207,5 ±11,4	8,38 ±0,53	0,04038
Сравнения (карсил)	207,5 ±10,07	9,75* ±0,71	0,04698*
Опытная (соединение (I))	207,78 ±12	8,22 ±0,37	0,03956

*- достоверно по отношению к интактной группе ($P \leq 0,05$).

Таблица 6

Длина долей печени крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Длина первой доли	Длина второй доли	Длина третьей доли	Длина четвертой доли	Длина пятой доли	Длина шестой доли
<u>Интактная</u>	2,83 ±0,25	2,45 ±0,21	1,85 ±0,31	1,52 ±0,28	0,95 ±0,09	0,8 ±0,12
Контрольная	3,63* ±0,15	3,05 ±0,31	1,68 ±0,25	1,78 ±0,17	0,96 ±0,17	1,63* ±0,47
Сравнения (карсил)	3,08 ±0,18	2,59 ±0,2	1,74 ±0,43	1,23 ±0,16	1,18 ±0,27	1,37* ±0,21
Опытная (соединение (I))	2,83 ±0,23	2,91 ±0,3	1,92 ±0,23	1,29 ±0,18	1,27 ±0,18	1,27 ±0,24

*- достоверно по отношению к интактной группе ($P \leq 0,05$).

Таблица 7

Ширина долей печени крыс с острым тетрахлорметановых гепатитом и фармакокоррекции соединением (I) (n=8-10)

Группа животных	Ширина первой доли	Ширина второй доли	Ширина третьей доли	Ширина четвертой доли	Ширина пятой доли	Ширина шестой доли
Интактная	3,00 ±0,27	3,63 ±0,17	2,03 ±0,19	1,77 ±0,26	1,67 ±0,21	1,26 ±0,19
Контрольная	3,43 ±0,35	3,61 ±0,34	1,93 ±0,11	1,8 ±0,17	1,81 ±0,23	1,8* ±0,1
Сравнения (карсил)	2,99 ±0,27	3,51 ±0,4	2,4 ±0,41	1,95 ±0,25	2,05 ±0,24	1,71 ±0,24
Опытная (соединение (I))	2,99 ±0,34	3,4 ±0,41	2,1 ±0,15	1,71 ±0,25	1,63 ±0,18	1,7 ±0,24

* - достоверно по отношению к интактной группе ($P \leq 0,05$).

Применяемое нами в опытной группе соединение (I) обнаружило способность препятствовать увеличению абсолютной и относительной масс печени на фоне моделируемого острого тетрахлорметанового ее поражения (таблица 5). Так, изучаемые индексы в этих группах находятся на уровне таковых, зарегистрированных у интактных животных.

Результаты органомерических исследований по длинам долей печени крыс различных групп приведены в таблицах 6-7. Так, у животных контрольной группы выявлено достоверное ($P < 0,05$) увеличение длины первой и шестой долей и тенденция к увеличению длины второй и четвертой долей в сравнении с интактными значениями. У животных группы сравнения, получавших карсил на фоне острого тетрахлорметанового гепатита, прослеживается тенденция к увеличению длины первой, третьей и пятой долей при достоверном увеличении длины шестой доли по отношению к показателям, зарегистрированным у крыс интактной группы.

Значения длины и ширины долей печени крыс опытной группы не имеют достоверных отличий в сравнении с таковыми у интактных животных.

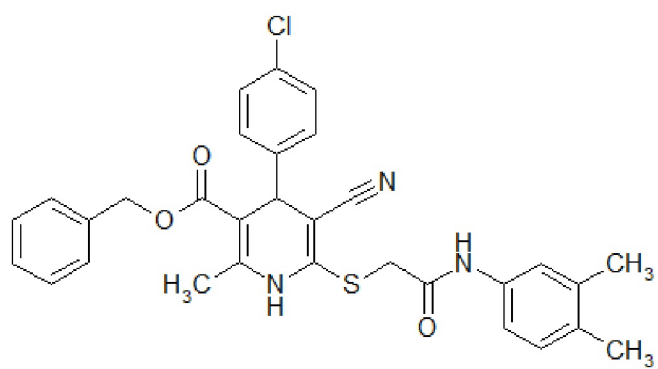
Таким образом, приведенные результаты наглядно демонстрируют, способности бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата (I), проявлять в эксперименте более выраженное гепатопротекторное действие, чем у препарата сравнения карсил.

(57) Формула изобретения

Применение бензил 6-({2-[(3,4-диметилфенил)амино]-2-оксоэтил}тио)-2-метил-4-(4-хлорфенил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилата формулы (I) в качестве гепатопротекторного средства.

5

10



(I)

15

20

25

30

35

40

45