

УДК 547.789.6+547.852.9

С.А.ДЕМЧЕНКО, інженер, М.О.ЛОЗИНСЬКИЙ, д-р. хім. наук, акад. НАН України,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України»,
Інститут органічної хімії НАН України

СИНТЕЗ ТА ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 2-МЕТИЛ-7-ТІЄНІЛ-[1,3]ТІАЗОЛО[4,5-D]- ПРИДАЗИН-4(5H)-ОНИВ

Ключові слова: [1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-они, противірусна активність, H1N1, H3N2, H5N1, Flu B, SARS, індекс селективності

Заміщені [1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-они становлять інтерес як можливі об'єкти хімічних перетворень і як потенційні біологічно-активні речовини. Основним підходом до синтезу цих сполук є конденсація відповідних 5-ароїл-2-метил-1,3-тіазоло-4-карбоксилатів з гідразин-гідратом в етанолі [1, 2] та подальше алкідування заміщеними хлорацетанілідами та бензилхлоридами по амідному атому азоту піридинового циклу. 7-тієнілзаміщені [1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-они були раніше невідомі.

Метою даної роботи було здійснення синтезу речовин з потенційною противірусною активністю в ряду похідних 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-d]піридазин-4(5H)-онів та вивчення впливу синтезованих сполук на віруси H1N1, H3N2, H5N1, Flu B, SARS.

H1N1 – підтип віrusу грипу А (найпоширеніший тип грипу, який спричинює найбільші епідемії), може викликати захворювання як у людей, так і у багатьох тварин. Штам А (H1N1 «Каліфорнія 04/2009») в 2009 р. став найбільш відомим під назвою «свинячий грип» [3]. Висока вірулентність та патогеність цього штаму може бути зумовлена здатністю неструктурованого білка NS1 (що властивий цьому віrusу) інгібувати продукцію інтерферонів типу I інфікованими клітинами [4].

H3N2 є підтиром віrusу, що викликає грип. Віrus грипу H3N2 може інфікувати птахів та ссавців. У птахів, людей та свиней віrus мутував у багато штамів. H3N2 (Гонконгський грип) [5] стає дедалі поширенім під час сезонного грипу, який вбиває по всьому світу тисячі людей на рік. [6].

Підтип **H5N1 (HPAI A(H5N1))** (від англ. *highly pathogenic avian influenza* – високопатогенний «пташиний грип») – віrus грипу А, також відомий як **A(H5N1)** і просто **H5N1**, може викликати захворювання як у людей, так і у багатьох видів тварин. З 2007 р. захворювання, спричинене цим штамом, що пристосований до птахів, стало широко відомо під назвою «пташиний грип» [7].

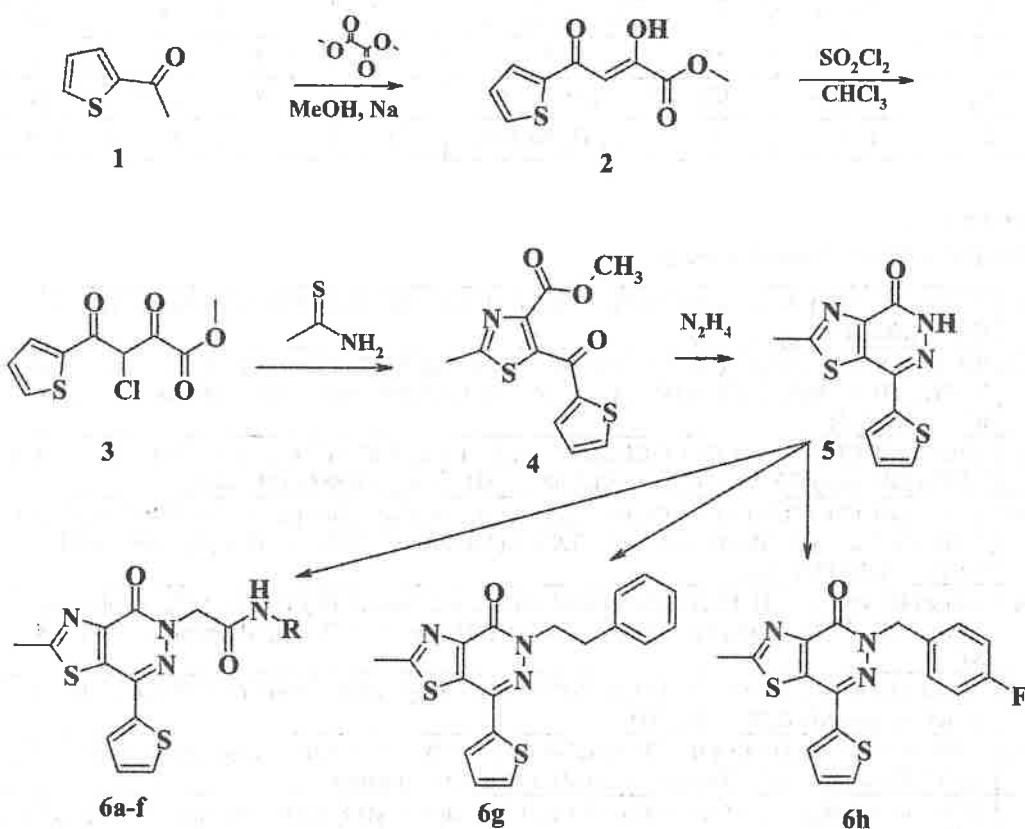
Віrusи грипу типу «B» патогенні тільки для людей та ластоногих [8]. Віrus групи «B» має значно більш стійку структуру і підлягає змінам значно рідше, ніж віrus групи «A». В порівнянні з останнім він викликає менші епідемії, що повторюються в нашій країні раз у 3–4 роки і уражают головним чином дітей.

Важкий гострий респіраторний синдром (ВГРС), більш відомий як атипова пневмонія, або SARS. Перший випадок цього захворювання було зафіксовано в

листопаді 2002 р. в китайській провінції Гуандун [9]. Нині відомо, що збудником атипової пневмонії є коронавірус ВГРС (SARS-CoV), новий вид коронавірусів. Рівень смертності від ВГРС – близько 10 %.

Таким чином, досить важливою проблемою є пошук нових противірусних препаратів з дією на віруси грипу H1N1, H3N2, H5N1, Flu B та SARS.

Об'єктами нашого дослідження були обрані похідні 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів (**6a-h**), які синтезовані алкілюванням 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-ону (**5**) відповідними хлорацетамідами в середовищі диметилформаміду за наявності калію карбонату (див схему).



6a $\text{R}=\text{H}$, **6b** $\text{R}=1,2,3,4\text{-тетрагідрокінолініл}$, **6c** $\text{R}=4^1\text{-метоксифеніл}$,

6d $\text{R}=3^1,4^1\text{-диметоксифеніл}$, **6e** $\text{R}=\text{циклогексіл}$, **6f** $\text{R}=\text{ортого-хлорбензил}$

Синтезовані нові сполуки (**6a-h**, табл. 1) – кристалічні речовини, незабарвлени або жовтуваті розчинні в ДМФА, важкорозчинні у спиртах, нерозчинні у воді та діетиловому етері. Склад і структури всіх синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу (табл. 1) та методом ЯМР ^1H -спектроскопії (табл. 2).

Противірусну активність одержаних похідних 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів (**6a-h**) вивчали у рамках міжнародної наукової програми Південного наукового центру США (SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE, Birmingham, Alabama) [10–12] за методом [13]. Фармакологічний скринінг полягав у дослідженні противірусної активності *in vitro* на 5 штамах патогенних вірусів грипу А та В та SARS (табл. 3). При дослідженні визначали індекси інгібування вірусного цитопатичного ефекту (EC50) та цитотоксичну дію діючих речовин на клітини (IC50). Антивірусну активність кожної протестованої сполуки виражали індексом селективності (SI) – IC50 поділене на EC50. Стандартною процедурою визначення наведених індексів було застосування методу, який полягає у

Таблиця 1

Структурні та фізико-хімічні особливості похідних 2-метил-7-тієніл[1,3]тиазоло[4,5-d]піридин-4(5H)-онів

Сполука	Т.топл., °C	Вихід, %	Емпірична формула	Знайдено, %		Виражувано, %	
				N	S	N	S
6a	281–2	89	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	18.5	21.0	18,3	20,9
6b	198–9	84	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂	13.1	15.0	13,3	15,2
6c	257–9	84	C ₁₉ H ₁₆ N ₄ O ₃ S ₂	13.3	15.4	13,6	15,6
6d	253–4	83	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₂	12.8	14.7	12,7	14,5
6e	263–4	87	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₂ S ₂	14.2	16.3	14,4	16,5
6f	252–3	94	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄ O ₂ S ₂	13.1	14.9	13,0	14,9
6g	158–9	65	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ OS ₂	11.7	18.2	11,9	18,1
6h	171–2	76	C ₁₇ H ₁₂ FN ₃ OS ₂	11.6	17.7	11,8	17,9

Таблиця 2

Спектральні дані синтезованих сполук

6a	2,765 с (3H, CH ₃), 4,621 с (2H, CH ₂), 7,235 д (1H, thiенyl), 7,657 т (1H, thiенyl), 7,854 д (1H, thiенyl), 9,256 упс.с (2H, NH)
6b	2,25 м (2H, CH ₂), 2,835 с (3H, CH ₃), 2,978 т (2H, CH ₂), 3,765 т (2H, CH ₂), 4,543 с (2H, CH ₂), 7,345 д (1H, thiенyl), 7,456 д (1H, aryl), 7,768 м (3H, thiенyl+aryl), 7,945 м (2H, thiенyl+aryl), 9,34 с (1H, NH)
6c	2,845 с (3H, CH ₃), 3,767 с (3H, OCH ₃), 4,51 с (2H, CH ₂), 6,87 д (2H, aryl), 7,198 д (1H, thiенyl), 7,545 д (2H, aryl), 7,745 т (1H, thiенyl), 7,987 д (1H, thiенyl), 8,887 с (1H, NH)
6d	2,801 с (3H, CH ₃), 3,981 с (3H, OCH ₃), 3,995 с (3H, OCH ₃), 4,48 с (2H, CH ₂), 6,967 д (1H, aryl), 7,101 д (1H, aryl), 7,145 д (1H, thiенyl), 7,655 т (1H, thiенyl), 7,655 с (1H, aryl), 7,789 д (1H, thiенyl), 8,56 с (1H, NH)
6e	1,56 м (4H, cyclohexyl), 1,767 м (6H, cyclohexyl), 2,812 с (3H, CH ₃), 3,734 м (1H, cyclohexyl), 4,456 с (2H, CH ₂), 7,255 д (1H, thiенyl), 7,755 т (1H, thiенyl), 7,987 д (1H, thiенyl), 9,012 (1H, NH)
6f	2,765 с (3H, CH ₃), 4,654 с (2H, CH ₂), 7,167 м (4H, thiенyl+aryl), 7,656 т (1H, thiенyl), 7,976 м (2H, thiенyl+aryl), 8,88 с (1H, NH)
6g	2,799 с (3H, CH ₃), 3,011 т (2H, CH ₂), 4,45 т (2H, CH ₂), 7,101 м (2H, thiенyl+aryl), 7,455 м (2H, aryl) 7,678 м (2H, aryl) 7,78 т (1H, thiенyl), 7,864 д (1H, thiенyl)
6h	2,678 с (3H, CH ₃), 4,89 с (2H, CH ₂), 7,23 м (3H, thiенyl+aryl) 7,599 м (3H, thiенyl+aryl), 7,877 д (1H, thiенyl)

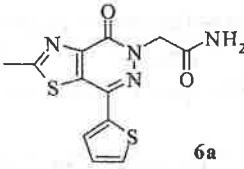
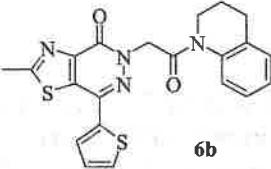
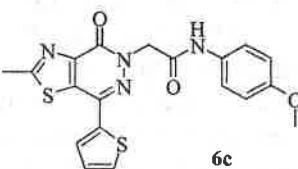
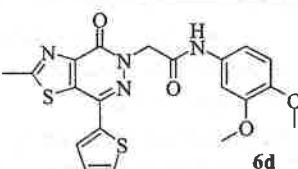
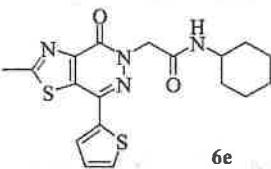
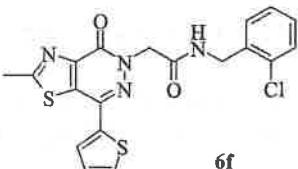
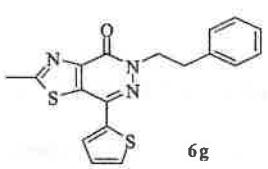
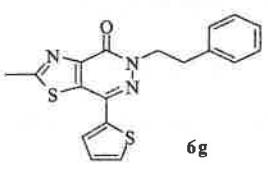
зміні у поглинанні нейтрального червоного барвника (NR) живими, зруйнованими та інфікованими клітинами.

Експериментальна хімічна частина

Усі розчинники та реагенти (від Aldrich та Acros) використовували без додаткового очищення. Контроль за ходом реакції та чистотою синтезованих сполук проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol», F–254, 1x10 см, елюенти суміші хлороформ – метанол і етилацетат – гексан (9:1 та 1:1 v/v відповідно) із застосуванням УФ-детектора з довжиною хвилі опромінення 254 та 356 нм. Температури топлення вимірювали на малогабаритному нагрівальному столі зі спостережним пристроєм РНМК 05 («VEB Analytik», Dresden). Спектри 1Н ЯМР знімали на спектрометрі «Varian Gemini 400» MHz (внутрішній стандарт – TMC, розчинник – DMSO-d6). Хроматомас-спектрометричний аналіз (LC/MSD) проведено на приладі серії «Agilent 1100» (США) з використанням хімічного методу іонізації. За даними аналізу, чистота всіх одержаних зразків завжди перевищувала 95 %.

Таблиця 3

Противірусна активність синтезованих сполук

Сполука	Virus	Strain	EC50	IC50	SI
 6a	Flu A (H1N1)	California/07/2009	>100	>100	0
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>100	>100	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	36	>100	>2.8
	Flu B	Florida/4/2006	32	>100	>3.1
	SARS	Urbani	>100	>100	0
 6b	Flu A (H1N1)	California/07/2009	39	>100	>2.6
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>100	>100	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	31	>100	>3.2
	Flu B	Florida/4/2006	32	>100	>3.1
	SARS	Urbani	72	>100	>1.4
 6c	Flu A (H1N1)	California/07/2009	32	>100	>3.1
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	35	>100	>2.9
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	13	>100	>8.0
	Flu B	Florida/4/2006	31	>100	>3.2
	SARS	Urbani	>100	>100	0
 6d	Flu A (H1N1)	California/07/2009	>100	>100	0
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>100	>100	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	12	>100	>8.3
	Flu B	Florida/4/2006	34	>100	>2.9
	SARS	Urbani	>43	43	0
 6e	Flu A (H1N1)	California/07/2009	>100	>100	0
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>58	58	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	33	67	2
	Flu B	Florida/4/2006	32	>100	>3.1
	SARS	Urbani	43	82	1.8
 6f	Flu A (H1N1)	California/07/2009	33	>100	>3.0
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	54	>100	>1.9
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	27	>100	>3.7
	Flu B	Florida/4/2006	31	>100	>3.2
	SARS	Urbani	38	>100	>2.6
 6g	Flu A (H1N1)	California/07/2009	36	>100	>2.8
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>100	>100	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	21	>100	>4.8
	Flu B	Florida/4/2006	32	>100	>3.1
	SARS	Urbani	>100	>100	0
 6g	Flu A (H1N1)	California/07/2009	>100	>100	0
	Flu A (H3N2)	Brisbane/10/2007	>100	>100	0
	Flu A (H5N1)	Vietnam/1203/2004H	31	>100	>3.2
	Flu B	Florida/4/2006	33	>100	>3
	SARS	Urbani	>100	>100	0

Сполуку **5** було отримано за методикою, наведеною в роботі [14].

Загальна методика синтезу 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів (6a-h)

0,001 моль (0,249 г) сполуки **5** розчиняли в 10 мл сухого ДМФ. Додавали 0,002 моль (0,276 г) карбонату калію. Потім додавали 0,001 моль алкілуючого реагенту. Нагрівали на водяній бані протягом 2 год. Охолоджували і виливали в 100 мл охолодженої води. Осад, що утворювався, відфільтровували, промивали гарячою водою. Перекристалізовували із суміші ДМФ:етанол (1:1).

Температури топлення та спектральні дані отриманих речовин наведено в таблицях 1 та 2.

Обговорення результатів

Аналіз результатів противірусної активності 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів (**6a-h**) свідчить про те, що всі вони мають низьку цитотоксичність ($IC_{50} > 100$ мкг/мл) по відношенню до культур клітин. Найбільш активними речовинами відносно до штаму вірусу **H1N1** виявились сполуки **6b**, **6c**, **6f** та **6g** з індексами селективності > 2.6 ; > 3.1 ; > 3.0 та > 2.8 відповідно. Щодо Гонконгського грипу **H3N2** активність виявили лише сполуки **6c** та **6f** з індексами селективності > 2.9 та > 1.9 відповідно. Проти «пташиного грипу» **H5N1** активними виявились усі без винятку сполуки з індексами селективності > 2.8 , > 3.2 , > 8.0 , > 8.3 , > 2 , > 3.7 , > 4.8 та > 3.2 відповідно. Слід відзначити, що введення в базову молекулу 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів електронодонорних замісників веде до різкого збільшення противірусної дії (сполуки **6c** та **6d**). Вірус групи «В» уражається всіма протестованими сполуками в досить малих концентраціях ($EC_{50} = 31-34$ мкг/мл) з середнім індексом селективності > 3.1 .

Активними щодо вірусу атипової пневмонії виявилися лише чотири сполуки: **6b**, **6c**, **6e** та **6f** з індексами селективності > 1.4 , > 3.2 , > 1.8 та > 2.6 відповідно. Слід зазначити, що активною проти всіх штамів вірусів виявилася лише одна сполука **6f** з орто-хлорбензильним замісником.

Висновки

1. Синтезовано ряд нових похідних 2-метил-7-тієніл-[1,3]тіазоло[4,5-*d*]піридазин-4(5*H*)-онів.
2. Вивчено противірусну активність синтезованих сполук на штамах вірусів грипу **H1N1**, **H3N2**, **H5N1**, Flu B та SARS.
3. Показано, що сполуки **6c** та **6d** виявилися найбільш активними проти «пташиного грипу» **H5N1** та рекомендуються для подальшого вивчення противірусної активності.

1. Adam McCluskey at al. // Australian journal of chemistry. – 2000, 53(11 & 12), 905-908.
2. Makki, Mohamad S. I.; Faidallah, Hassan M. // Journal of Chinese Chemical Society (Taipei). – 1996; 43; 5; 433–438.
3. Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B. // The New England journal of medicine. – 2009, Jun 18; 360 (25), 2605-15.
4. Haye K., Burmakina S., Moran T., Garc a-Sastre A., Fernandez-Sesma A. // The Journal of Virology. – 2009, 83 (13), 6849-62.
5. Coleman, Marion T.; Dowdle, Walter R.; Pereira, Helio G.; Schild, Geoffrey C.; Chang, W. K. // The Lancet. – 1968, 292 (7583), 1384–1386.
6. Kahar-Bador M., Nathan A.M., Soo M.H., Mohd Noor S., AbuBakar S., Lum L.C.S., Syed Hassan S., Sam I.C. // Singapore Medical Journal. – 2009, 50 (3), e112

7. Li K.S. et al. // Nature. — 2004, 430, (6996), 209–213.
8. Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. // Science. — 2000, 288 (5468), 1051–3.
9. Smith R.D. // Social Science and Medicine. — 2006, 63 (12), 3113–3123.
10. Severson W.E., McDowell M.I., Ananthan S., Chung D.H., Rasmussen L., Sosa M.I., White E.L., Noah J., Jonsson C.B. // Journal of Biomolecular Screening. — 2008, 13, 879–87.
11. Noah J.W., Severson W., Noah D.L., Rasmussen L., White E.L. and Jonsson C.B. // Antiviral Research. — 2007, 73, 50–9.
12. Severson W. E., Shindo N., Sosa M.I., Fletcher III T.M., White E.L., Ananthan S., and C.B. // Journal of Biomolecular Screening. — 2007, 12, 33–40.
13. Smee, D.F., Morrison A., Barnard D., and Sidwell R.L. // Journal of Virological Methods. — 2002, 106, 71–79.
14. Демченко С.А., Смольский О.С., Лозинський М.О. // Фармацевтичний журнал. — 2009. — № 3. — С. 59–64.

Надійшла до редакції 20.10.2010.

С.А.Демченко, М.О.Лозинский

СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 2-МЕТИЛ-7-ТИЕНИЛ-[1,3]ТИАЗОЛО[4,5-D]-ПИРИДАЗИН-4(5H)-ОНОВ

Ключевые слова: [1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазин-4(5H)-оны; противовирусная активность, H1N1, H3N2, H5N1, Flu B, SARS, индекс селективности

Синтезированы новые производные 2-метил-7-тиенил-[1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазин-4(5H)-оны. Изучена противовирусная активность синтезированных соединений на штаммах вирусов гриппа H1N1, H3N2, H5N1, Flu B и SARS. Показано, что соединения 6c и 6d оказались наиболее активными против «птичьего гриппа» H5N1 и рекомендуются для дальнейшего изучения противовирусной активности.

S.A.Demchenko, M.O.Lozinskii

SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF 2-METHYL-7-THIENYL-[1,3]THIAZOLO[4,5-D]PYRIDAZIN-4(5H)-ONES

Key words: [1,3]thiazolo[4,5-d]piridazine-4(5H)-ones; antiviral activity, H1N1, H3N2; H5N1; Flu B, SARS; selectivity index

SUMMARY

There were new 2-methyl-7-thienyl-[1,3]thiazolo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-ones synthesised. It was studied their antiviral activity against viruses H1N1, H3N2, H5N1, Flu B and SARS. It was found that compounds 6c and 6d show high antiviral activity against H1N1 and are recommended for further investigations.