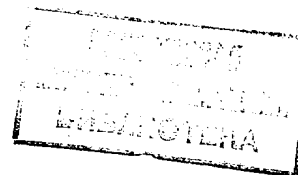




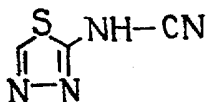
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 4355945/04
(62) 4028736/04 от 15.12.86
(22) 29.06.88
(31) 809669
(32) 16.12.86
(33) US
(46) 07.04.91. Бюл. № 13
(71) Эли Лилли энд Компани (US)
(72) Брент Джеффри Ридер, Вейн Альфред Спитзер, Чун-Е Эрнст Ву, Чарльз Джонсон Пэджет, мл. и Вилльям Биван Блэнчард (US)
(53) 547.794.3.07(088.8)
(56) Патент Великобритании № 1531221, кл. C 2 C 1978.
I. Med. Chem. 1972, v. 15, № 10, p. 1082-1084.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-2-ЦИАНАМИДА ИЛИ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМЫХ СОЛЕЙ
(57) Изобретение относится к гетероциклическим соединениям, в частности

Изобретение касается способа получения нового производного 2-амино-1,3,4-тиадиазола, а именно 1,3,4-тиадиазол-2-цианамида или его фармацевтически приемлемых солей формулы



обладающих противовирусными свойствами.

Цель изобретения - получение нового производного 2-амино-1,3,4-тиа-

2
к получению 1,3,4-тиадиазол-2-циан-амида ф-лы (I): $\text{N}=\text{CH}-\text{S}-\text{C}(\text{NR}_1\text{R}_2)=\text{N}$, где R_1 - H, R_2 - CN, или их фармацевтически приемлемых солей, обладающих противовирусной активностью. Цель - разработка способа получения более активных соединений. Получение ведут реакцией соединения ф-лы $\text{N}=\text{CH}-\text{S}-\text{C}(\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2))(\text{SR}_1)=\text{N}$, где R_1 - алкил C_1-C_6 , с аммиаком. Для получения целевого соединения (I), где R_1 - H, а R_2 - CN, и соединения (I), где R_1 и R_2 образуют $=\text{C}(\text{NH}_2)$, разделяют эти соединения с последующим выделением целевого продукта и при необходимости переводом его в фармацевтически приемлемую соль путем обработки соответствующим органическим или неорганическим основанием. Предпочтительно реакции с аммиаком подвергают соединение, где R_1 - метил, 1 з.п. ф-лы, 4 табл.

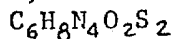
диазола или его фармацевтически приемлемых солей, обладающего фармакологическими преимуществами перед 2-амино-1,3,4-тиадиазолом.

Пример получения 1. Этиловый сложный эфир [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]-карбаминовой кислоты.

В перемешиваемый раствор 19,2 г (190 мл) 2-амино-1,3,4-тиадиазола в 200 мл ацетонитрида добавляют одной порцией 25 г (190 мм) этоксикарбонил изотиоцианата. Реакционную смесь пе-

ремешивают при 24°C в течение шестнадцати часов. Осадок собирают фильтрацией, промывают три раза этилацетатом и сушат, в результате чего получают 35 г (выход 80%) этилового сложного эфира [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометид]карбаминовой кислоты.

Вычислено, %: С 31,02; Н 3,47;
N 24,12.

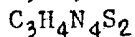


Найдено, %: С 31,32; Н 3,27;
N 24,40.

Пример получения 2.
1,3,4-Тиадиазол-2-илтиомочевина.

Раствор 10 г этилового сложного эфира [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]карбаминовой кислоты (из примера 1) в 150 мл 1 н. раствора гидрата окиси натрия кипятят с обратным холодильником в течение 90 мин. Раствор охлаждают и концентрируют выпариванием при пониженном давлении. Осажденное твердое вещество собирают фильтрацией и растворяют в 20 мл воды. Водный раствор подкисляют добавлением 200 мл 1 н. раствора хлористоводородной кислоты. Продукт собирают фильтрацией и подвергают рекристаллизации из N,N-диметилформамида, в результате чего получают 5 г 1,3,4-тиадиазол-2-илтиомочевины. Температура точки плавления 253°C.

Вычислено, %: С 22,49; Н 2,52;
N 34,97; S 40,02.

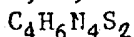


Найдено, %: С 22,73; Н 2,33;
N 34,74; S 40,26.

Пример 1. Метилловый сложный эфир N'-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой кислоты.

Смесь 4,8 г 1,3,4-тиадиазол-2-илтиомочевины (из примера получения 2) в 45 мл 2 н. раствора гидрата окиси натрия, 15 мл этанола и 4 мл метил иодида нагревают до 40°C и поддерживают при этой температуре в течение десяти минут. Смесь подкисляют добавлением 50 мл 1 н. раствора хлористоводородной кислоты. Реакционную смесь концентрируют выпариванием при пониженном давлении. Осажденное твердое вещество собирают фильтрацией и сушат, в результате чего получают 3,02 г метилового сложного эфира N'-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой кислоты. Температура точки плавления 116-117°C.

Вычислено, %: С 27,57; Н 3,47;
N 32,15; S 36,80.

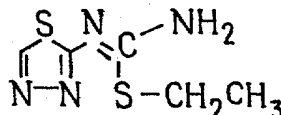


Найдено, %: С 27,78; Н 3,55;
N 31,93; S 36,54.

Н-ЯМР (300 МГц) J (D₆DMCO-Me₄Si) δ: 2,2; (3H S, CH₃); 8,90, шир, с. (2H, NH₂); 9,08, с. (1H, кольцевой H).

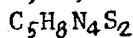
Масс-спектр магнитной индукции (МИ): исходный ион 174.

Пример 2. Сложный этиловый эфир N'-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой кислоты



Раствор 3,2 г (20 мл) 1,3,4-тиадиазол-2-илтиомочевины в 100 мл N,N-диметилформамида, содержащий 1,6 мл (20 мм) этил иодида и 2,12 г (20 мл) карбонат натрия, перемешивают при 24°C в течение двадцати четырех часов. Реакционную смесь фильтруют и фильтрат концентрируют до масла при помощи выпаривания растворителя при пониженном давлении. Масло подвергают хроматографической обработке на колонне, содержащей композицию Уотерса, с использованием для элюирования смеси 75% этил ацетата/гексан (объем/объем). Соответствующие фракции собирают, концентрируют до сухого состояния, в результате чего получают твердое вещество, которое после кристаллизации из диэтилового простого эфира и гексана идентифицируют, как 2,08 г N'-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой кислоты.

Вычислено, %: С 31,90; Н 4,28;
N 29,76; S 34,06.



Найдено, %: С 32,18; Н 4,18;
N 29,59; S 34,08.

ИК (KBr), см⁻¹: 3259,9; 3089,2;
1624,2; 1510,4; 1416,8; 1377,3;
1347,1; 1247,1; 1209,5; 718,5.

Масс-спектр МИ: 188.

Примеры 3-5. Следующие сложные эфиры тиадиазоилкарбамимидотионовой кислоты получают в результате взаимодействия 1,3,4-тиадиазол-2-илтиомочевины с алкилгалогенидом в соответствии с методиками, которые использовали в примерах 1 и 2.

Н-бутиловый сложный эфир N'-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой ки-

слоты, выход 1,68 г, температура точки плавления 40°C.

Масс-спектр МИ: 216.

Хлоргидрат сложного 2-пиридинил-метилового эфира N¹-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамимидотионовой кислоты, выход 3,72 г.

¹H-ЯМР (300 МГц) (D₆ ДМСО/Me₄ Si) δ: 4,64 (с., 2H, CH₂); 7,82 (т., 1H, H пиридина), 7,98 (д., 1H, H пиридина), 8,40 (т., H, H пиридина), 8,79 (д., 1H, H пиридина), 9,11 (с., 1H, кольцевой H).

Масс-спектр МИ: 251.

Цианометилловый сложный эфир N¹-1,3,4-тиадиазол-2-ил-карбамимидотионовой кислоты, выход 1,04 г.

¹H-ЯМР (300 МГц) (d₆ ДМСО/Me₄ Si) δ: 4,14 (с., 2H, CH₂), 9,09 (ш. с., 2H, H₂); 9,15 (с., 1H, кольцевой H).

Масс-спектр МИ: 199.

Пример получения 3. Фениловый сложный эфир [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]-карбаминной кислоты.

Раствор 3,8 г (50 мл) тиодиадата аммония в 100 мл ацетонитрила, содержащий 7,8 г (50 мм) фенил хлорформата, перемешивают при 24°C в течение одного часа. Реакционную смесь фильтруют в суспензию 6,88 г (50 мм) хлоргидрата 2-амино-1,3,4-тиадиазола в 75 мл ацетонитрила и 25 мл окиси пропилена. Реакционную смесь перемешивают в течение двух часов при 24°C, а затем фильтруют, в результате чего получают твердый осадок, идентифицированный как 6,42 г фенилового сложного эфира [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксаметил]-карбаминной кислоты.

Масс-спектр МИ: 280.

Примеры получения 4-6. В соответствии с общей методикой из примера получения 3 получают следующие продукты:

N-гексилловый сложный эфир [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)-тиоксометил]-карбаминной кислоты.

Вычислено, %: C 41,65; H 5,59; N 19,43; S 22,24

C₁₀H₁₆N₄O₂S₂
Найдено, %: C 41,64; H 5,31; N 19,28; S 11,46.

Метилловый сложный эфир [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]-карбаминной кислоты.

Масс-спектр МИ: 218.

Виниловый сложный эфир [(1,3,4-тиадиазол-4-иламино)тиоксометил]-карбаминной кислоты.

Масс-спектр МИ: 230.

Пример получения 7. Этиловый сложный эфир [(метилтио)-(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)метил]-карбаминной кислоты:

Смесь 6,96 г (30 мл) этилового сложного эфира [(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]-карбаминной кислоты, полученного в соответствии с примером получения 1, в 45 мл 1 н.

раствора гидрата окиси натрия, содержащую 9,0 г (4 мл) метил иодида и 15 мл метанола, нагревают до 40°C и поддерживают в течение десяти минут.

Реакционную смесь охлаждают до 5°C и фильтруют. Фильтрованную лепешку промывают водой и сушат на воздухе, в результате чего получают 4,72 г

этилового сложного эфира [(метилтио)-(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)метил]-карбаминной кислоты.

Вычислено, %: C 34,13; H 4,09; N 22,75; S 26,04.

C₇H₁₀N₄O₂S₂

Найдено, %: C 34,41; H 4,84; N 22,91; S 25,94.

Пример получения 8. Этиловый сложный эфир [(этилтио)-(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)-метил]-карбаминной кислоты.

[(1,3,4-Тиадиазол-2-иламино)тиоксометил]-карбаминная кислота (6,96 г) взаимодействует с 4 мл этил иодида в соответствии с методикой из примера получения 7, в результате чего получают 1,83 г этилового сложного эфира [(этилтио)-(1,3,4-тиадиазол-2-иламино)метил]-карбаминной кислоты.

Масс-спектр МИ: 260.

Пример 6. 1,3,4-Тиадиазол-2-цианамид и 1,3,4-тиадиазол-гуанидин.

Смесь 5,0 г метилового эфира N-1,3,4-тиадиазол-2-илкарбамидотиоксидоты (из примера 1) в 50 мл аммиака и 100 мл этанола нагревают в автоклаве при 140°C в течение 14 ч. ТСХ на силикагельных пластинках (66% СН₂Сl₂, 26% MeOH, 8% HOAc) показала два новых пятна, одно из которых идентично 1,3,4-тиадиазол-2-цианамид. Растворитель удаляют выпариванием и неочищенное вещество перемешивают с 200 мл 1 норм. HCl и фильтруют для

удаления нерастворимого 1,3,4-тиадиазол-2-цианамиды.

Выделенное соединение имело следующие характеристики:

FD масс-спектр: 126.

Вычислено, %: С 28,57; Н 1,60; N 44,42; S 25,42.

$C_3H_2N_4S$

Найдено, %: С 28,95; Н 1,80; N 43,60; S 24,87.

Подкисленный фильтрат выпаривают досуха, остаток очищают с помощью жидкостной хроматографии (НР LC), элюируют 90% MeOH/H₂O и получают 1,5 г 1,3,4-тиадиазол-2-гуанидина.

Это соединение имеет следующие характеристики.

1H ЯМР (300 МГц) (D₆ ДМСО (Me₄ Si) δ: 8,37 (шир. с. 4H, NH₂), 9,27 (с, 1H, кольцо);

FD масс-спектр: 144.

Пример 7. К раствору 1,38 г 1,3,4-тиадиазол-2-цианамиды в 10,5 мл 1 норм. едкого натра добавляют 100 мл этанола. Смесь фильтруют, растворитель удаляют из фильтрата, получая масло. Масло кристаллизуют из 20 мл метанола и 100 мл изопропилового спирта, медленно удаляя метанол при помощи выпаривания при пониженном давлении и получают 980 мг натриевой соли 1,3,4-тиадиазол-2-цианамиды.

1H ЯМР (300 МГц) (D₆ ДМСО (Me₄ Si) δ: 8,68 (с, 1H, кольцо H);

FD масс-спектр: 126

Вычислено, %: С 24,33; Н 0,68; N 37,83; S 21,65.

C_3HN_4SNa

Найдено, %: С 24,59; Н 0,87; N 38,06; S 21,90.

Как было установлено, тиадиазол или его соли обладают противовирусной активностью в стандартных испытаниях и, таким образом, могут быть использованы для лечения или профилактики заболеваний, которые вызываются разнообразными вирусами и широко распространены. К общим вирусам, против которых, как было установлено, тиадиазолы являются активными, относятся все испытанные штаммы А и В гриппа, включая такие штаммы гриппа, как А-Энн-Эрбор, А-Гонг-Конг, В-Великие Озера, В-Тайвань, В-Сингапур, А-Бразилия, А-Техас, А-Фукушина, В-Мэри-Лэнд и т.п. К другим вирусам, против которых можно использовать

предложенный способ, относятся Парагрипп. Респираторные Синциальные Вирусы, различные штаммы Лишая I и II, вирусы ЕСnO и Vaccinia, кори, Semlini Forest, а также те вирусы, которые приводят к синдрому приобретенного иммунного дефицита.

Тиадиазоловые противовирусные агенты проявляли свою активность против упомянутых вирусов как в лабораторных условиях, так и при испытании на живом организме. Особенно детально исследована их активность в живом организме против гриппа А-Энн-Эрбор.

Соединения, являющиеся предметом изобретения, были испытаны на живом организме против самых разнообразных штаммов гриппа, при этом использовали процедуру анализа гриппа у мышей и были получены хорошие результаты. В табл. 1 указана активность соединения из примера получения 2 в широком диапазоне доз при применении его стоматическим способом вместе с кормом к мышам, зараженным различными штаммами гриппа А и В, причем указано количество животных, оставшихся в живых через 10 дн. в каждой испытываемой группе.

Исследование по уменьшению пятен обеспечивает количественную оценку ингибиторов размножения вирусов в культуре клеток ткани в лабораторной системе.

В этом испытании восприимчивые МДСК-клетки выращивали в 25 см² колбах Фалькон при 37°C в среде 199 вместе с 5% инактивированной сыворотки плода теленка (СПТ) пенициллином (300 ед./мл) и стрептомицином (300 мкг/мл). После образования слившихся монослоев среду для выращивания извлекали и в каждую колбу добавляли 0,3 мл разбавленного соответствующим образом вируса. После адсорбции в течение одного часа при комнатной температуре на поверхности с зараженными клетками наносили равные части 1% Агара и 2% Среда 199, 2,5% СПТ, пенициллин и стрептомицин, варьируя при этом концентрации испытываемого соединения, содержащегося в агаровом покрывающем слое. Эти соединения растворяли в диметилсульфоокиси (ДМСО) в концентрации 10000 мкг/мл, а затем порцию

разбавляли до необходимой концентрации при помощи смеси агаровой среды. Колбы инкубировали до тех пор, пока контрольные колбы не указывали на оптимальный размер пятна (2-10 мм). Раствор, содержащий 10% формалина и 2% ацетата натрия, добавляли в каждую колбу с тем, чтобы инактивировать вирус и зафиксировать лист с клетками на пластиковой поверхности. Пятна считали после окрашивания окружающих клетки областей кристаллическим фиолетовым красителем. Результаты, полученные для колб дублетов для каждой концентрации, усредняли и сравнивали с контрольными колбами. Ингибирование образования пластинок на 50% (I_{50}) оценивали при помощи нанесения на график всех результатов с ингибированием в процентах в области от 10 до 90. Результаты, полученные для трех штаммов гриппа (активность *in vitro* относительно вирусов гриппа I_{50} , мкг/мл) представлены в табл. 2.

Для использования в лабораторных условиях эти соединения могут быть добавлены в культуру ткани с целью подавления роста вируса в ней.

Данные *in vivo*, сравнивающие активность *in vivo* 2-амино-1,3,4-тиадиазола, 1,3,4-тиадиазол-2-цианамида и натриевой соли 1,3,4-тиадиазол-2-цианамида против вирусов гриппа Энн-Арбора и Гонконг-В, получены и проанализированы с использованием описанной методики.

В табл. 3 описаны активность *in vivo* указанных трех соединений по отношению к гриппу Энн-Эрбор-А. Столбец 1 этой таблицы раскрывает проверяемое соединение. Столбцы 2 и 3 описывают способ, используемый для введения проверяемого соединения, и вводимую дозу соответственно. Столбцы 5 и 6 описывают результаты, выра-

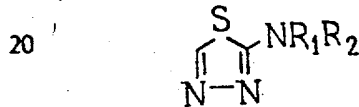
женные в виде R и RA (индекс относительной активности: 5 - наиболее активное, 1 - наименее активное).

В табл. 4 описана активность *in vivo* двух из трех соединений относительно гриппа Гонконг-В. Информация в столбцах таблицы та же, что в табл. 3.

10 Соединения изобретения характеризуются низкой степенью токсичности к живым организмам.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

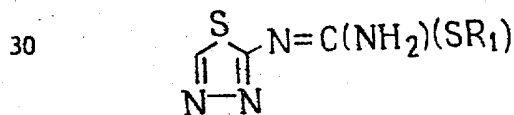
15 1. Способ получения 1,3,4-тиадиазол-2-цианамида формулы



где R_1 - H,

R_2 - CN,

25 или его фармацевтически приемлемых солей, отличающийся тем, что соединение формулы

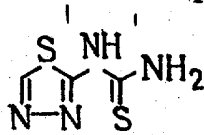


где R_1 - алкил C_1-C_6 ,

35 подвергают реакции с аммиаком для получения целевого соединения (I), где R_1 - H, а R_2 - CN, и соединения (I), где R_1 и R_2 образуют $-\text{C}(\text{NH}_2)_2$, и разделяют эти соединения с последующим выделением целевого продукта или переводом в его в фармацевтически приемлемую соль путем взаимодействия с соответствующим органическим или неорганическим основанием.

45 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакции с аммиаком подвергают соединение формулы (II), где R_1 - метил.

Т а б л и ц а 1



Штамм гриппа	Конт- роль	Доза, мг/кг/день			
		15	30	60	120
В-Великие Озера	3/36	11/18	16/18	17/18	18/18
В-Тайвань	1/36	4/18	16/18	18/18	18/18
В-Мэрилэнд	13/50	-	-	19/20	20/20
В-Гонг-Конг	4/50	-	-	10/20	16/20
А-Энн-Эрбор	0/50	-	-	20/20	20/20
А-Техас	8/36	5/18	8/18	12/18	16/18
А-Бразилия	10/28	5/15	5/15	12/18	14/18

П р и м е ч а н и е: (-) означает, что данный уровень дозы не был подвергнут испытанию.

Т а б л и ц а 2

Соединение А	(NWS)	П-Энн- Арбор	В-Great. Lake
Пример получе- ния 1	(43)	>50	-
Пример получе- ния 2	(3,5)	-	3,0
Пример 1	(18,6)	-	18,0
Пример 2	(9,8)	-	9,8
Пример 3	(21,3)	0,85	-
1,3,4-Тиادي- азол-2-циан- амид	-	0,85	-
Натриевая соль 1,3,4- тиадиазол-2- цианамида	0,58	0,70	0,32
1,3,4-Тиادي- азол-2-гуани- дин	-	0,04	0,3

Т а б л и ц а 3

Соединение	Способ введения	Доза (мг соединения/ кг опытного животного)	Р, %	RA
1	2	3	4	5

2-Амино-1,3,4- тиадиазол	Оральный	160	24,0	2
	Внутрибрюшинный	320	20,0	1
Натриевая соль 1,3,4-тиадиазол	Оральный	40	95,0	5
	"-	20	42,2	3

Продолжение табл.3

1	2	3	4	5
2-цианамид	-"-	2	36,5	2
	-"-	1	18,3	1
	Внутрибрюшинный	250	100,0	5
	-"-	150	100,0	5
	-"-	100	96,0	5
1,3,4-Тиадиазол- 2-цианамид	-"-	50	94,1	5
	Пищевой	100	100,0	5
	-"-	50	100,0	5
	-"-	25	72,0	5
	-"-	12,5	67,0	4
-"-	6,3	9,0	1	

Т а б л и ц а 4

Соединение	Способ введения	Доза (мг соединения/кг опытного животного)	P, %	RA
2-Амино-1,3,4- тиадиазол	Пищевой	400	21,5	2
	Оральный	320	98,0	5
	-"-	160	96,0	5
Натриевая соль 1,3,4-тиадиазол- 2-цианамид	Оральный	8	100,0	5
	-"-	2	89,7	5

Составитель И.Федосеева

Редактор В.Данко

Техред Л.Олейник

Корректор Т.Малец

Заказ 1023

Тираж 243

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101