



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116386** (13) **C2**
(51) МПК

C07D 413/04 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 01111</p> <p>(22) Дата подання заявки: 09.02.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.03.2018</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 10.08.2017, Бюл.№ 15</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.03.2018, Бюл.№ 5</p>	<p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA), Ренькас Юлія Віталіївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Кропив'янського, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)</p> <p>(74) Представник: Поприткіна Дурсунгозель Шамирадівна</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: PubChem CID 18580214 (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov); 04.12.2007 р. II Міжнародна науково-практична конференція «Координційні сполуки: синтез і властивості»: Тези доповідей / за заг. редакцією В.В. Суховєєва. – Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2013. – 121 с.; с. 21-22 : Синтез нових 2-мофоліно-4-пара-хлораніліно-6-ариламінів-1,3,5-триазину та дослідження їх активності щодо вірусу грипу IVA(H1N1) California/07/2009 Проблеми синтезу біологічно активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій : матер. Укр. наук.-практ. конф., присвяч. 100-річчю з дня народження д-ра хім. наук, проф.. Павла Олексійовича Петюніна / Редкол. В.П. Черних та ін. – Х.: НФаУ, 2014. – 128 с.; с. 33: Синтез та антивірусна активність 2,4-діариламо-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазинів UA 95732 U; 12.01.2015 UA 67510 U; 27.02.2012</p>
---	---

(54) N-(3-ХЛОР-4-МЕТИЛФЕНІЛ)-N¹-(3¹-ФТОРФЕНІЛ)-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-[1,3,5]ТРИАЗИН-2,4-ДІАМІН, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО ВІРУСУ MIDDLE EAST CORONAVIRUS (HCoV-EMC)

(57) Реферат:

N-(3-Хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін, що проявляє антивірусну активність щодо вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC). Патент на винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакологічно активних речовин, що проявляють антивірусну активність, конкретно до N-(3-хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну. Експериментальне визначення

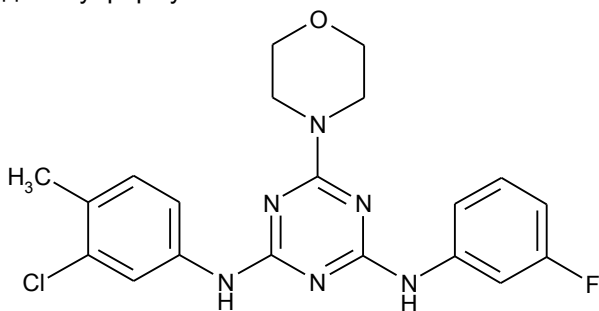
UA 116386 C2

протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIAID) у Південному дослідному інституті СІЛА (Southern Research Institute - SRI, Birmingham, Alabama) під керівництвом проф. Дейла Бернарда з університету штату Юта (Dale Barnard, Utah State University).

Антивірусну активність синтезованого діаміну щодо вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC) оцінювали за барвником нейтральним червоним і за візуальною методикою оцінки. Ефективність зазначеної сполуки виражали показниками EC_{50} , IC_{50} та SI, які визначали в досліджах *in vitro*.

Показано, що пригнічення вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC) сполукою N-(3-хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-мор-фолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміном у пробі за нейтральним червоним EC_{50} становить 0.3 мкг/мл, а візуальною методикою оцінки EC_{50} - 0.42 мкг/мл. Індокси селективності досліджуваної речовини становлять відповідно SI = 13 та SI-10.

Патент на винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема одержання біологічно активного N-(3-хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну формули:



5 який проявляє протівірусні властивості, що дозволяє передбачити можливість його використання у практичній медицині як лікарського засобу для лікування захворювання, викликаного вірусом HCoV-EMC (або MERS-CoV).

З моменту відкриття цього коронавірусу, він був описаний в науковій літературі, базах даних та пресі під різними назвами (наприклад: бетакоронавірус людини 2с EMC, бетакоронавірус людини 2С Йорданський-N3, бетакоронавірус Англії-1 тощо). Але більш вживаними є назви HCoV-EMC/2012 та MERS-CoV [1]. Дослідницька група Міжнародного комітету з таксономії вірусів [2] запропонувала надалі вживати лише одну назву. Після ретельного розгляду і широкого обговорення новий коронавірус названо по аббревіатурі: "Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)". Його повна назва включає також країну походження, номер штаму та рік відкриття, а саме: MERS-CoV Hu/Jordan-N3/2012 [3].

15 Коронавірус HCoV-EMC є особливо небезпечним для людини, оскільки розмножується набагато швидше, ніж вірус SARS. Високий рівень смертності від цієї інфекції означає, що сучасна фармакологія не має ефективних засобів для лікування цих захворювань [4]. Станом на червень 2015 року випадки MERS-CoV були зареєстровані в більш ніж 20 країнах [4]. З вересня 2012 року ВОЗ зафіксовано 1134 випадки зараження коронавірусом. З них 427 виявилися смертельними [5].

Медики відзначають, що вірус поширюється повітряно-крапельним шляхом, як вірус грипу. У хворих спостерігається жар, утруднене дихання, ядуха, кашель. У інфікованих відмовляють нирки, через ураження легень їм важко дихати, а також страждає шлунок [6].

25 В основу патенту на винахід поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з протівірусною активністю, що перешкоджають реплікації вірусу та можуть лікувати хворобу, викликану вірусом HCoV-EMC.

Як біологічно активну сполуку запропоновано N-(3-хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфетл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (сполука DAM0012292), ефективність якого підтверджується експериментально.

30 Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIAD) у Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama) під керівництвом проф. Дейла Бернарда з університету штату Юта (Dale Barnard, Utah State University).

Прототип та аналог за дією на сьогодні проти коронавірусу HCoV-EMC відсутні.

В таблиці 1 наведено експериментальні дані EC₅₀, IC₅₀ та SI сполуки DAM0012292 щодо вірусу HCoV-EMC, які визначено в дослідях in vitro.

Таблиця 1

Протівірусна активність сполуки DAM0012292 щодо вірусу HCoV-EMC.

Структура	Тип вірусу	Методики оцінки	*Концентрацій, мкг/мл		
			EC ₅₀	IC ₅₀	SI
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	0.3	3.9	13
		Візуальна перевірка	0.42	4.2	10

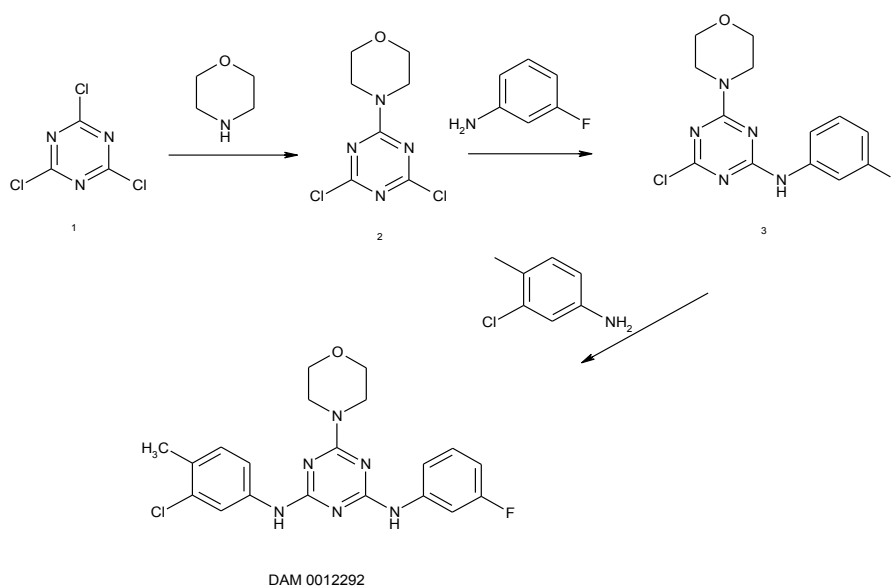
40

* Примітки:

1. EC_{50} - ефективна концентрація, що визначається з кривої доза/ефект і є концентрацією речовини, при якій ефект спостерігається для 50 % популяції після проходження певного часу дії. Виражається у мкг/мл.
2. IC_{50} - концентрація, при якій інгібування клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI - індекс селективності показник ефективності препарату, який виражається співвідношенням IC_{50} до EC_{50} .

Відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу HCoV-EMC сполукою DAM0012292 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC_{50} , становить 0,3-0,42 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює $SI=10-13$.

Заявлений N-(3-Хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0012292) отримують з високим виходом за наведеною схемою:



10

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. 2,4-Дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин (2) був одержаний за методикою [7] взаємодією ціанурхлориду (1) з морфоліном у середовищі ацетону при 5 °С.

15 Приклад 2. N-(3-Хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0012292): до розчину 4,7 г (0,02 моль) 2,4-дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 в 50 мл диметилформаміду при перемішуванні додавали послідовно 2,76 г (0,02 моль) поташу та 2,22 г (0,02 моль) 3-фтораніліну. Реакційну суміш перемішували при температурі 20 °С протягом двох годин та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Отримували 4,96 г (4-хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(3-фторфеніл)-аміну (3), який без додаткової очистки та ідентифікації розчиняли в 50 мл тетрагідрофурану. До одержаного розчину при перемішуванні додавали 2,26 г (0,016 моль) 3-хлор-4-метиланіліну та 2,21 г (0,016 моль) поташу. Реакційну суміш перемішували 4 години при температурі 40 °С, охолоджували та виливали в 150 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували та кристалізували з етанолу. Вихід становить 5,63 г (68 %). $T_{пл}=198-200$ °С. Знайдено, %: N=20,2

25

$C_{20}H_{20}ClFN_6O$. Вирахувано, %: N=20,4.

Спектр ПМР (DMSO- d_6 , TMC): 2,27 (с, 3H, CH₃), 3,66 (м, 4H), 3,75 (м, 4H), 6,74-7,86 (м, 7H, ароматичні протони), 9,40 (с, 1H, NH), 9,47 (с, 1H, NH).

Приклад 3

Для оцінки протівірусної активності сполуки (DAM0012292) використано наступні методики.

30

А. Стандартна проба: Первинний аналіз активності досліджуваної сполуки за пригніченням вірусу з визначення цитопатичного ефекту.

Аналіз проводять у 96-лункових плоскодонних мікропалетах. Для визначення цитопатичного ефекту кожен з чотирьох розчинів досліджуваної сполуки, що розбавлено до концентрацій 1000, 100, 10, 1 мкг/мл, наносять у три лунки, що містять моношар з досліджуваними клітинами. Через

5 хвилин у лунки засівають розчин з культурою вірусу і інкубують за температури 37 °C протягом часу, за який цитопатичний ефект у досліджуваних пробах розвинеться (зазвичай від 72 до 120 год.). Сполуки, що проявили активність за первинною пробою, піддаються аналогічному аналізу за умови подальшого розбавлення їх концентрацій. Дані виражаються як 50 % ефективної концентрації (EC_{50})- Активність кожної з досліджуваних сполук виражається індексом селективності (SI), що є відношенням IC_{50} до EC_{50} . Позитивним вважається результат, у якому сполука проявила SI порядку 10 і більше.

В. Стандартна проба: Візуальна оцінка за поглинанням барвника нейтрального червоного (NR).

Цей тест проводиться для перевірки пригнічення вірусу (CPE), що отримано в першому тесті за нейтральним червоним, з використанням тієї ж 96-лункової мікропалети, після зчитування з неї результатів CPE. До середовища додають барвник нейтральний червоний. Клітини, не пошкоджені вірусом, вбирають більшу кількість барвника. Результат зчитується оптичним комп'ютеризованим приладом. EC_{50} визначається за кількістю поглинутого барвника.

Методи аналізу цитотоксичності:

А. Візуальне спостереження

Для випробування пригнічення клітин досліджуваною речовиною дві лунки неінфікованих клітин обробляються двома різними концентраціями тестової сполуки і паралельно ставиться тест на двох лунках з інфікованими клітинами, які обробляються тими ж двома концентраціями сполуки.

Одночасно з візуальним визначенням цитопатичного ефекту на інфікованих лунках з клітинами за допомогою мікроскопа для порівняння проводиться візуальний контроль токсичності на предмет виявлення будь-яких змін у зовнішньому вигляді клітин порівняно з неінфікованими клітинами на тій же палеті.

Цитотоксична концентрація 50 % пригнічення клітин визначається з регресійного аналізу одержаних даних щодо токсичності та позначається як IC_{50} .

В. Визначення токсичності за поглинанням барвника нейтрального червоного.

На описаній вище стадії тестування досліджуваної сполуки за барвником нейтральним червоним при визначенні EC_{50} , як кількісної оцінки цитопатичного пригнічення вірусу, на тій же палеті ставляться дві лунки для контролю токсичності, до яких додається нейтральний червоний після чого спектрофотометрично вимірюється інтенсивність забарвлення, за яким проводиться визначення 50 % концентрації пригнічення клітин за нейтральним червоним - IC_{50} .

Джерела інформації:

1. Groot R.J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group / R.J.Groot, S.C.Baker, R.S.Baric et al. // Journal of Virology, 87 (14). P. 7790-7792. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700179/>

2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Режим доступу: <http://ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>.

3. Middle east respiratory syndrome coronavirus. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus.

4. Коронавирусная инфекция (атипичная пневмония): причины, симптомы, диагностика, лечение. Режим доступу: http://ilive.com.ua/health/koronavirusnaya-infekciya-atipichnaya-pnevmoniya-prichiny-simptomy-diagnostika-lechenie_75425i15955.html

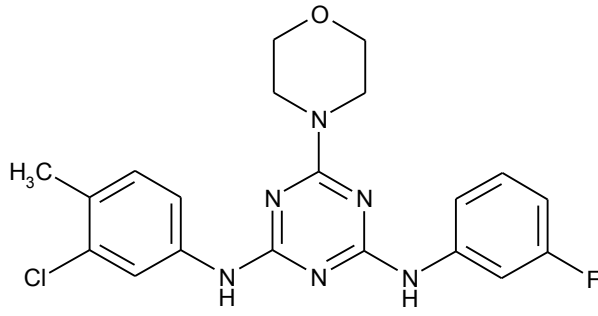
5. У Південній Кореї смертельним коронавірусом близькосхідного респіраторного синдрому (БСРС-КоВ) заразилися 15 осіб. Режим доступу: <http://ua.racurs.ua/news/51342-u-pivdenniy-koreyi-smertelnyy-koronavirus-vra2yv-vje-15-rudey>

6. Смертельный коронавирус псов "косит" Европу: отказывают почки и легкие, режим доступу: <http://ru.tsn.ua/zdorovya/smertelnyy-koronavirus-ncov-kosit-evropu-otkazyvayut-pochki-i-legkie-307599.html>

7. Treatment of prostate cancer, melanoma or hepatic cancer. ZENYAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA Patent: US2007/244110 A1, 2007.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

N-(3-хлор-4-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін:



що проявляє антивірусну активність щодо вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC).

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601