



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118877** (13) **C2**
(51) МПК

C07D 253/02 (2006.01)

C07D 413/04 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 12995**

(22) Дата подання
заявки: **20.12.2016**

(24) Дата, з якої є
чинними права
на винахід: **25.03.2019**

(41) Публікація
відомостей
про заявку: **25.06.2018,**
Бюл.№ 12

(46) Публікація
відомостей
про видачу
патенту: **25.03.2019,**
Бюл.№ 6

(72) Винахідник(и):

Демченко Анатолій Михайлович (UA),
Суховєєв Володимир Володимирович (UA),
Барчина Олена Ігорівна (UA),
Абу Шарк Амжад Ібрагім (UA),
Бобкова Людмила Станіславівна (UA)

(73) Власник(и):

НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ
ГОГОЛЯ,
вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)

(74) Представник:

Москаленко Олег Вадимович

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

II Міжнародна науково-практична конференція "Координаційні сполуки: синтез і властивості": Тези доповідей / за загальною редакцією В.В. Суховєєва. – Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2013. – див. с. 21 Демченко А.М., Ренькас Ю.В., Суховєєв В.В. СИНТЕЗ НОВИХ 2-МОРФОЛІНО-4-ПАРА-ХЛОРАНІЛІНО-6- АРИЛАМІНІВ-1,3,5-ТРИАЗИНУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ АКТИВНОСТІ ЩОДО ВІРУСУ ГРИПУ IVA(H1N1) ШТАМУ California/07/2009

Emin Sarıpinar, Nazmiye Geçen, Kader Sahin, Ersin Yanmaz
Pharmacophore identification and bioactivity prediction for triaminotriazine derivatives by electron conformational-genetic algorithm QSAR method /European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010), p. 4157-4168;

Biswajit Das, Uttam Kumar Mondal, Shyamal Sharma, Pranab Ghosh and Asim Kumar Bothra Molecular Docking of Triazine analogues / Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2012, 4(3):1595-1600

CN1970552 A, 30.05.2007

UA 100048 U; 10.07.2015

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 (24-25 квітня 2014 р., м. Харків) / Редкол. В. П. Черних та ін. – Х. : НФаУ, 2014. – 128 с.: див. с.33 А.М. Демченко, Ю.В. Ренькас, В.В. Суховєєв СИНТЕЗ ТА АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ 2,4-ДІАРИЛАМІНО-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-[1,3,5]ТРИАЗИНВ

UA 67510 U; 27.02.2012

US 2014/0378438 A1; 25.12.2014

GB 1142546 A; 02.12.1969

US 3549757 A; 22.12.1970

Nirali S. Mewada, Dhruvin R. Shah, Harshad P. Lakum, Kishor H. Chikhaliya Synthesis and biological evaluation of novel s-triazine based aryl/heteroaryl entities: Design, rationale and comparative study / Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences (2016) 20, p.8–18

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПОХІДНИХ N-(4¹-ХЛОРФЕНІЛ)-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-N¹-АРИЛ-[1,3,5]ТРИАЗИН-2,4-ДІАМІНУ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ ПРОТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО ВІРУСУ Н3N2 ШТАМУ BRISBANE/10/2007

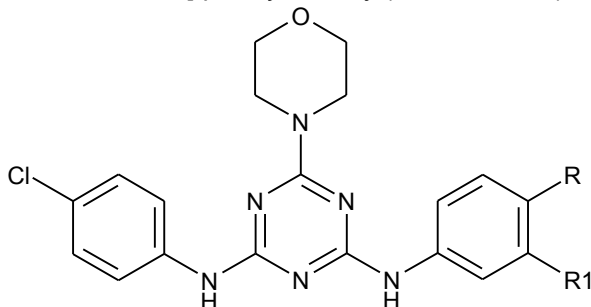
UA 118877 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакологічно активних речовин, що проявляють антивірусну активність, конкретно до N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011880) та 1-{3-[4-хлорфеніламіно]-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно}феніл}етанону (DAM0011882).

Антивірусну активність синтезованих сполук щодо вірусів H1N1 штаму California/07/2009 та H3N2 штаму Brisbane/10/2007 проведено in vitro з використанням клітин MDCK при концентрації від 0,1 до 100 мкг/мл флюоресцентним методом (барвник - нейтральний червоний) та візуально.

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології, зокрема одержання біологічно активних N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011880) та 1-{3-[4¹-хлорфеніламіно]-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно}феніл}етанону (DAM0011882) загальної формули:



5

де RR₁: -O-CH₂-O-(DAM0011880); R = H, R₁=COCH₃ (DAM0011882).

Зазначені сполуки пригнічують віруси грипу H1N1 штаму California/07/2009 та H3N2 штаму Brisbane/10/2007.

10 За даними ВООЗ щорічно в світі на сезонний грип хворіє близько одного мільярда людей, а помирає від нього - біля 3 мільйонів населення планети [1]. Вірус грипу H1N1 штаму California/07/2009 є особливо небезпечним для людини. Так, пандемія 2009/2010 рр. призвела до смерті біля 500 тисяч осіб. В Україні було зафіксовано 1128 летальних випадків, або 0,02 % від усіх, хто захворів [2].

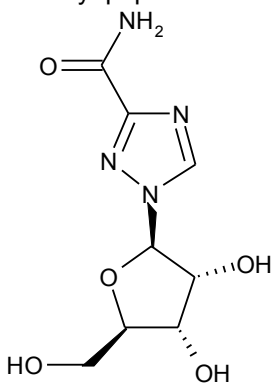
15 Лікування тяжких та середнього ступеня тяжкості випадків направлено на попередження вірусної пневмонії, яка важко протікає та викликає геморагію та дихальну недостатність, а також на профілактику вторинної бактеріальної інфекції, що обумовлює розвиток бактеріальної пневмонії. До ускладнень належать також токсичний геморагічний набряк легень, міокардит, несправжній круп, набряк головного мозку, арахноїдит, поліневрит, радикуліт, невралгії різної локалізації, ендокардит, міозит, нефрит, гломерулонефрит, периферичний висхідний параліч

20

25 м'язів кінцівок тощо [3]. За даними ВООЗ, в сезоні 2008-2009 рр. в більшості країн Європейського регіону переважним збудником епідемічного підйому був штаму Brisbane/10/2007 (H3N2). В Україні головним збудником епідемії грипу в сезоні 2011-2012 років був штаму вірусу грипу A(H3N2), який склав 99 % усіх виділених вірусів грипу у цьому сезоні [4]. Різкий підйом захворюваності супроводжувався появою великого числа тяжких форм та летальних випадків. Він стає все більш розповсюдженим і вбиває по всьому світу тисячі людей на рік.

25

Відомим противірусним препаратом, що використовується для лікування важкої інфекції, викликаній респіраторним синцитіальним вірусом, вірусним гепатитом С тощо є рибавірин. Він активний у формі метаболіту, що має структуру, подібну до нуклеотиду [5]:



30

Серед побічних ефектів рибавіріну є дозозалежна анемія, важка форма якої викликає смерть пацієнта. Рибавірин також є тератогеном для деяких тварин. При захворюваннях нирок, серцево-судинної системи застосовують препарат після ретельного обстеження. Медичному персоналу слід враховувати його потенційну тератогенність [5].

35

В основу винаходу поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з противірусною активністю, що перешкоджають реплікацію вірусів, та які здатні лікувати гострі респіраторно-вірусні інфекції, викликані як вірусами H1N1, штамом California/07/2009, так і H3N2 штамом Brisbane/10/2007.

Таблиця 1

Противірусна активність щодо вірусів грипу H1N1
штаму California/07/2009 та H3N2 штаму Brisbane/10/2007 N-бензо[1,3]
діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011880) та
1-{3-[4¹-хлорфеніламіно)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно]феніл}етанону(ЭAM0011882)

ID	Virus / Strain	EC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	Control Drug	EC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
DAM 0011880	Flu A(H1N1) California/07/09	<0,1	>100	>1000	Рибавірин	1	>320	>320
	Flu A(H1N1) California/07/2009	0,56	>100	>180	Рибавірин	10	>320	>32
	Flu A (H3N2) Brisbane/10/2007	0,33	>100	>300	Рибавірин	4,3	>320	>74
DAM 0011882	Flu A(H1N1) California/07/09	<0,27	1,7	6,3	Рибавірин	10	>320	>32
	Flu A (H3N2) Brisbane/10/2007	0,42	>100	>240	Рибавірин	4,3	>320	>74

1. EC₅₀ - 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. IC₅₀ - це концентрація, при якій інгібіція клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.

3. SI - це індекс селективності, що є показником ефективності препарату, та виражається співвідношенням IC₅₀ до EC₅₀.

Відповідно до результатів скринінгу, наведених у табл. 1, пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009 сполукою (DAM0011880) у пробі за нейтральним червоним виражено ефективною концентрацією EC₅₀, у першому досліді становить 0,1 мкг/мл, а у рибавірину - 1 мкг/мл. Отже, ефективність пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму

California/07/2009 сполукою (DAM0011880) в 10 раз вища, ніж у рибавірину. Поряд з різницею у токсичному впливі на клітини сполуки (DAM0011880) та рибавірину, вираженою концентраціями IC₅₀ (>100 та >320 відповідно), сумарна корисна активність сполуки (DAM0011880) виражена індексом селективності SI перевищує 1000, а у рибавірину - 320, що означає, що DAM0011880 в більш ніж у 3,12 рази ефективніший за рибавірин.

У другому досліді пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009 сполукою (DAM0011880) становить 0,56 мкг/мл, тоді як у рибавірину - 10 мкг/мл. Отже, ефективність пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009 сполукою (DAM0011880) в 17,86 рази вища, ніж у рибавірину. Індекс селективності SI сполуки (DAM0011880) > 180, а у рибавірину вона в 5,63 рази менша і складає >32.

Пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009 сполукою (DAM0011882) EC₅₀ становить <0,27 мкг/мл, тоді як у рибавірину воно більша і складає - 10 мкг/мл. Отже, ефективність пригнічення вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009 сполукою (DAM0011880) у 37 разів вища, ніж у рибавірину.

Пригнічення вірусу грипу H3N2 штаму Brisbane/10/2007 сполукою (DAM0011880), що виражено ефективною концентрацією EC₅₀, становить 0,33 мкг/мл, а це в 13 раз вища, ніж у рибавірину, для якого EC₅₀, становить 4,3 мкг/мл. Індекс селективності SI сполуки (DAM0011880) >300, а у рибавірину вона в 4,05 рази менша і складає >74. Для сполуки (DAM0011882) EC₅₀, становить 0,42, тобто в 10,24 рази вища, ніж у рибавірину Індекс селективності SI перевищує рибавірин у 3,24 рази і складає >240.

Такий високий результат дозволяє пропонувати N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін та 1-{3-[4¹-хлорфеніламіно)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно]феніл}етанон як альтернативу рибавірину.

Приклади конкретного виконання

Приклад 1

2,4-Дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин (2) одержано взаємодією ціанурхлориду 1 з морфоліном у ацетоні при 5 °C за методикою [6].

Приклад 2

N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011880): До розчину 4,7 г (0,02 моля) 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 2,55 г (0,02 моля) 4-хлораніліну. Реакційну суміш перемішували при температурі 20 °С 2 години та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Отримували 5,22 г (4-хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(4¹-хлорфеніл)-аміну (2), який без додаткової очистки та ідентифікації розчиняли в 50 мл тетрагідрофурану. До одержаного розчину при перемішуванні додавали 2,21 г (0,016 моль) поташу та 2,20 г (0,016 моля) бензо [1,3]діоксол-5-аміну. Реакційну суміш перемішували 4 години при температурі 40 °С, охолоджували. Осад, що утворився, відфільтровували та кристалізували з етанолу. Вихід становить 4,85 г (71 %). T_{пл.}=222-224 °С. Знайдено, %: N-19,5, Cl - 8,31 C₂₀H₁₉ClN₆O₃. Вираховано, %: N-19,7, Cl - 8.20. Спектр ПМР (DMSO-d₆, TMC): 3,60 (м, 4Н, N(CH₂)₂), 3,73 (м, 4Н, O(CH₂)₂), 5,95 (с, 2Н, OCH₂O), 6,80-7,43 (м, 3Н, ароматичні протони), 7,26 та 7,74 (д-д, 4Н, C₆H₄), 9,22 (уш. с, 1Н, NH), 9,33 (уш. с, 1Н, NH).

Приклад 3

1-{3-[4¹-Хлорфеніламіно)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно]феніл}етанолу (DAM0011882) був одержаний аналогічно сполуці (DAM0011880) з 5,22 г (4-хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(4¹-хлорфеніл)-аміну (2), 2,21 г (0,016 моль) поташу та 2,16 г (0,016 моля) 3-аминоацетофенону. Вихід 5.17 г (76 %). T_{пл.}=228-230 °С (з етанолу). Знайдено, %: N-19,9, Cl - 8,41 C₂₁H₂₁ClN₆O₂. Вираховано, %: N-19,8, Cl - 8,35. Спектр ПМР (DMSO-d₆, TMC): 2,58 (с, 3Н, COCH₃), 3,64 (м, 4Н, N(CH₂)₂), 3,77 (м, 4Н, O(CH₂)₂), 7,42-8,36 (м, 4Н, ароматичні протони), 7,32 та 7,77 (д-д, 4Н, C₆H₄), 9,38 (уш. с, 1Н, NH), 9,46 (уш. с, 1Н, NH).

Приклад 4

Експериментальне визначення противірусної 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).

Для оцінки противірусної активності сполук (DAM0011880) та (DAM0011882) використано методики [7].

Для визначення противірусної активності досліджуваних сполук був проведений тест *in vitro* з використанням клітин MDCK.

Клітини MDCK вирощували в 96-лунковому мікропланшеті до того часу, поки дно кожної лунки не покриється клітинами. Залишкове культуральне середовище повністю видаляли, і кожну лунку двічі промивали фосфатним буфером. У кожну лунку додавали розчин вірусу Flu A (H1N1) California/07/09 або Flu A (H3N2) Brisbane/10/2007, скорегованого до необхідної концентрації. Сполуку DAM 0011880 (або DAM 0011882) та противірусний засіб - рибавірін (Sigma) розчинили в диметилсульфоксиді і, додали до кожної лунки до кінцевої концентрації від 0,1 до 10 мкг/мл. Після культивування протягом 48 годин, клітини MDCK спостерігали в мікроскопі. Після додавання 100 мкл 70 % ацетону кожну лунку витримували при -20 °С протягом 1 год. Після висушування в сушильній шафі додавали 100 мкл 0,4 % (w/v) розчину SRB (сульфородаміну Б), розчиненого в 1 % (v/v) оцтової кислоті. Після 30 хвилин фарбування, розчин SRB, що не зв'язався з клітинами, 4 рази промивали 1 % (v/v) оцтовою кислотою. Після висушування в кожну лунку додавали 100 мкл 10 тМ розчину Tris (pH 10,5) для розчинення забарвлюючої речовини на дні лунки. Для оцінки противірусної активності вимірювали оптичну густину. Клітини, що оброблені тільки DMSO, та клітини, що оброблені DMSO та відповідним вірусом, використовували в якості контрольних груп.

Отже, згідно одержаних результатів, нові біологічно активні сполуки N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(4¹-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0011880) та 1-{3-[4¹-хлорфеніламіно)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]-триазин-2-іл-аміно]феніл}етанол (DAM0011882) можуть бути запропоновані як потенційні противірусні засоби щодо вірусів H1N1 штаму California/07/2009 та H3N2 штаму Brisbane/10/2007.

Джерела інформації:

1. Вакцина для профілактики гриппа. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: https://ru.wikipedia.org/wiki/Вакцина_для_профилактики_гриппа/ - Назва з екрану.

2. Голубка О.С. Оцінка наслідків тяжких форм грипу та летальності серед осіб груп ризику в пандемічному сезоні 2009-2010 років в Україні / О.С. Голубка, О.В. Онищенко, А.П. Міроненко // Профілактична медицина. - 2013. - № 3-4 (21). - С. 55-58.

3. Москалюк В.Д. Діагностика та лікування грипу: сучасні клініко-патогенетичні аспекти / В.Д. Москалюк, А.С. Сидорчук // Інфекційні хвороби. - 2016. - № 2 (84). - С. 5-14.

4. Лейбенко Л.В. Філогенетичний аналіз вірусів грипу людей А(Н₃Н₂), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011-2012 років / Л.В. Лейбенко, В.П. Поліщук, Л.В. Радченко, А.П. Міроненко Л.В. // Мікробіологія і біотехнологія. - 2013. - № 1. С. 37-47.

5. Рибавирин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%B8%D0%B1%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD> / - Назва з екрану.

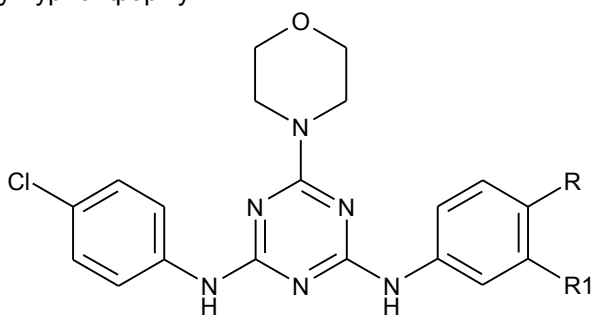
6. Mewada N.S. Synthesis and biological evaluation of novel s-triazine based aryl/heteroaryl entities: Design, rationale and comparative study / N.S. Mewada, D.R. Shah, H.P. Lakum, K.H. Chikhaliya // Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences. - V. 20. - 2016. - P. 8-18. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaubas.2014.08.003/> - Назва з екрану.

7. Standard Operating Procedure for In Vitro Antiviral Screening, Institute for Antiviral Research, Institute of Allergy and Infectious Diseases National Institutes of Health. - <http://www.niaid.nih.gov>.

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування похідних N-(4'-хлорфеніл)-6-морфолін-4-іл-N¹-арил-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну, структурної формули:



20

де RR₁: -O-CH₂-O-; R, R₁: H, COCH₃,

як таких, що проявляють протівірусну активність щодо вірусу H3N2 штаму Brisbane/10/2007.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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