



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **134396** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
C07D 253/065 (2006.01)
C07D 295/00
A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

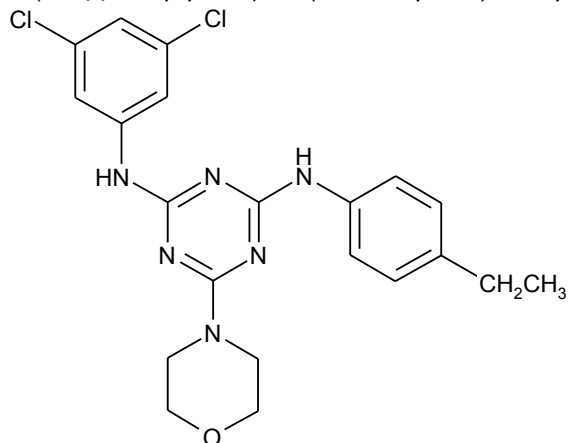
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2018 12954</p> <p>(22) Дата подання заявки: 27.12.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.05.2019</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2019, Бюл.№ 9</p>	<p>(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Барчина Олена Ігорівна (UA), Циганков Сергій Андрійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)</p> <p>(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович</p>
---	--

(54) N-(3,4-ДИХЛОРФЕНІЛ)-N¹-(4¹-ЕТИЛФЕНІЛ)-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-[1,3,5]ТРИАЗИН-2,4-ДІАМІН, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО ВІРУСУ MIDDLE EAST CORONAVIRUS (HCoV-EMC)

(57) Реферат:

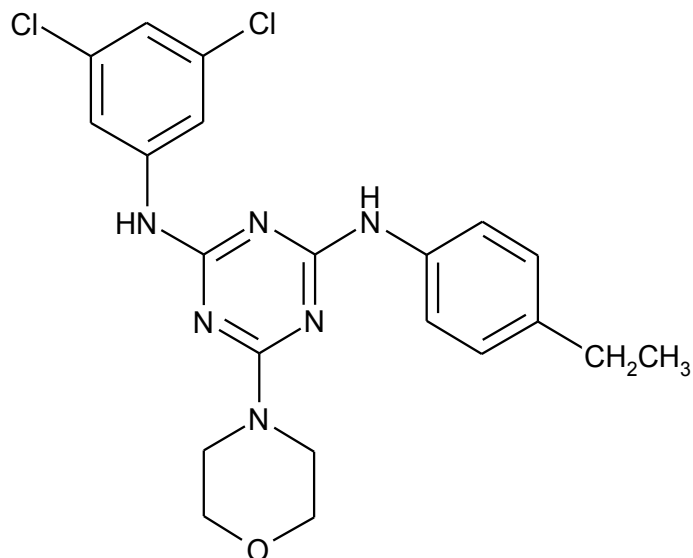
N-(3,4-Дихлорфеніл)-N¹-(4¹-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін,



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

UA 134396 U

Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема одержання біологічно активного N-(3,4-дихлорфеніл)-N¹-(4¹-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну формули:



5

який проявляє протівірусні властивості щодо вірусу HCoV-EMC (або MERS-CoV).

Коронавірус MERS-CoV (від Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) є однопанцюговим вірусом РНК роду Бетакоронавіруси [1]. Він має й інші назви, а саме: EMC /2012 (HCoV-EMC /2012) [2]; БСРС-CoV (від Близькосхідний респіраторний синдром) [3] бетакоронавірус людини 2с EMC тощо [2]. Міжнародним комітетом з таксономії вірусів запропоновано у повній назві цього коронавірусу вказувати й країну походження, номер штаму та рік відкриття, наприклад: MERS-CoV Hu/Jordan-N3/2012 [1].

Найближчими родичами MERS-CoV є віруси BtCoV-HKU4 та BtCoV-HKU5, які поширені серед кажанів роду *Pipistrellus abramus*, геном яких відрізняється від HCoV-EMC лише на 1,8 %. Саме вони могли бути первинним джерелом інфекції [4]. Вважають, що верблюди заразилися від кажанів, а далі - мутуючи, вірус передався й людині [5].

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 [6]. Станом на липень 2017 року випадки MERS-CoV були зареєстровані у 27 країнах [7]. До липня 2018 року ВООЗ зафіксовано 2260 лабораторно підтверджених випадків зараження коронавірусом. З них 803 (35,5 %) виявилися летальними [8].

Медики відзначають, що вірус поширюється повітряно-крапельним шляхом, як вірус грипу. Середній інкубаційний період MERS-CoV складає 5,2 доби, а найдовший - до 12 діб [9]. У хворих спостерігається жар, утруднене дихання, ядуха, кашель. У інфікованих відмовляють нирки, через ураження легень їм важко дихати, а також страждає шлунок [1-6]. Клінічними проявами є: патологічні зміни на рентгенограмі; біль у животі; блювота; діарея; міалгії; кровохаркання; задишка; кашель та лихоманка [3]. Зазначений вірус визначений ВООЗ як можлива причина майбутньої епідемії [1, 3]. Тому розробка нових антивірусних засобів щодо MERS-CoV та їх дослідження є особливо актуальними для фармацевтичної хімії.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з протівірусною активністю, що перешкоджають реплікації вірусу HCoV-EMC (MERS-CoV).

Як біологічно активну сполуку запропоновано N-(3,4-дихлорфеніл)-N¹-(4¹-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (сполука DAM0012327), ефективність якого підтверджується експериментально.

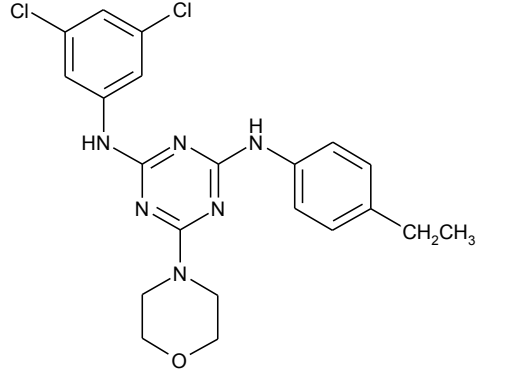
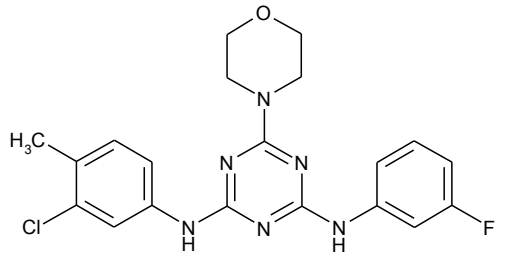
Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIAD) у Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama) під керівництвом проф. Дейла Бернарда з університету штату Юта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

Прототипом за структурою та дією проти коронавірусу HCoV-EMC нами вибрано N-(3¹-хлор-4¹-метилфеніл)-N¹-(3¹-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін [патент України на винахід від 12.03.2018 р.].

В таблиці 1 наведено експериментальні дані EC₅₀, IC₅₀ та SI сполуки DAM0012327 та прототипу щодо вірусу HCoV-EMC, які визначено в досліджах in vitro.

Таблиця 1

Противірусна активність сполуки DAM0012327 та прототипу щодо вірусу HCoV-EMC.

Структура	Тип вірусу	Методики оцінки	*Концентрацій, мкг/мл		
			EC ₅₀	IC ₅₀	SI
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	0.32	8.5	27
		Візуальна перевірка	0.56	6.8	12
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	0.3	3.9	13
		Візуальна перевірка	0.42	4.2	10

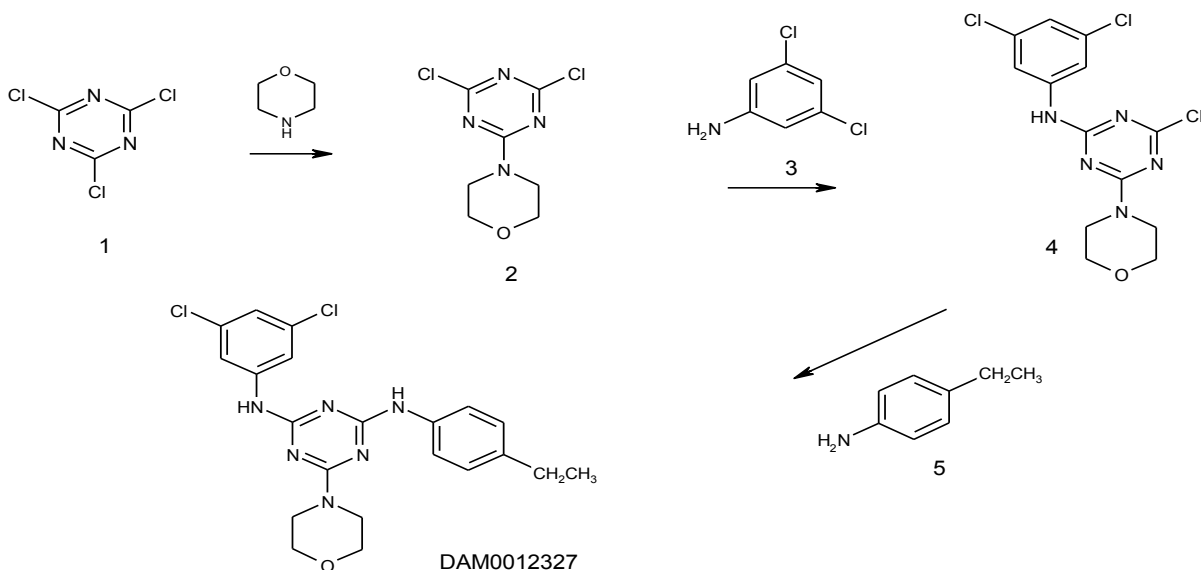
* Примітки:

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 - концентрація, при якій інгібування клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI - індекс селективності - показник ефективності препарату, який виражається співвідношенням IC₅₀ до EC₅₀.

Відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу HCoV-EMC сполукою DAM0012327 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC₅₀, становить 0.32-0.56 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює SI=12-27.

10

Заявлений N-(3,4-дихлорфеніл)-N¹-(4¹-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0012327) отримують з високим виходом за наведеною схемою:



Приклади конкретного виконання.

5 Приклад 1. 2,4-Дихлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин (2) був одержаний за методикою [10] взаємодією ціанурхлориду (1) з морфоліном у середовищі ацетону при 5 °С.

10 Приклад 2. 4-Хлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2-їл-(3,5-дихлор-феніл)-амін (4): до розчину 4.7 г (0.02 моль) 2,4-дихлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазину 2 в 50 мл диметилформаміду при перемішуванні додавали послідовно 2.76 г (0.02 моль) поташу та 3.24 г (0.02 моль) 3,5-дихлораніліну 3. Реакційну суміш перемішували при температурі 20 °С протягом двох годин та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Вихід 5.48 г (76 %) $T_{пл.}=223-224$ °С (з етанолу). Знайдено, %: Cl=29.2 N=19.6 $C_{13}H_{12}Cl_3N_5O$. Вираховано, %: Cl=29.5 N=19.4. Спектр ПМР (DMSO- d_6 , TMC): 3.61-3.80 (м, 8H, морфолін), 7.15 (с, 1H, CH), 7.83 (с, 2H, ароматичні протони), 9.67 (с, 1H, NH).

15 Приклад 3. N-(3,4-Дихлорфеніл)-N'-(4-етилфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0012327): 3.61 г (0.01 моль) (4-хлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2-їл)-(3,5-дихлорфеніл)-аміну 4, розчиняли в 50 мл тетрагідрофурану. До одержаного розчину при перемішуванні додавали 1.21 г (0.01 моль) 4-етиланіліну та 1.38 г (0.01 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 3.60 г (81 %). $T_{пл.}=140-141$ °С. Знайдено, %: Cl=15.6 N=18.7 $C_{21}H_{22}Cl_2N_6O$. Вираховано, %: Cl=15.9 N=18.9. Спектр ПМР (DMSO- d_6 , TMC): 1.18 (т, 3H, CH₃), 2.56 (кв, 2H, CH₂), 3.66 (м, 4H), 3.75 (м, 4H), 7.10 (с, 1H, CH), 7.14 та 7.56 (д-д, 4H, C₆H₄), 7.85 (с, 2H, ароматичні протони), 9.30 (с, 1H, NH), 9.56 (с, 1H, NH).

25 Приклад 4.

Для оцінки противірусної активності сполуки (DAM0012327) використано наступні методики.

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

30 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 °С протягом часу, за який цитопатичний ефект у досліджуваних пробах розвинеться (зазвичай від 72 до 120 год.). Сполуки, що проявили активність за первинною пробю, піддаються аналогічному аналізу за умови подальшого розбавлення їх концентрацій. Дані виражаються як 35 50 % ефективної концентрації (EC₅₀). Активність кожної з досліджуваних сполук виражається індексом селективності (SI), що є відношенням IC₅₀ до EC₅₀. Позитивним вважається результат, у якому сполука проявила SI порядку 10 і більше.

40 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

5 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.

10 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} .

15 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 20 проводиться визначення 50 % концентрації пригнічення клітин за нейтральним червоним - IC_{50} .

Таким чином, відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу HCoV-EMC сполукою DAM0012327 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC_{50} , становить 0.32-0.56 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює $SI=12-27$ проти $SI=10-13$ найближчого аналога.

25 Джерела інформації:

1. Middle East respiratory syndrome coronavirus. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Middle_East_respiratory_syndrome_coronavirus

2. 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/>

3. Дуда О.К. Коронавірусні інфекції: загроза людству з близького сходу спричинена MERS-CoV? /О.К. Дуда, Л.П. Коцюбайло // "Актуальна інфектологія", - № 3 (8). - 2015. С. 9-16.

4. Гриневич О.Й. Коронавірус: проблеми та перспективи /О.Й. Гриневич, І.Г. Маркович //Український медичний часопис, № 3 (95) - V/VI 2013 г. Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/59691/koronavirus-problemi-ta-perspektivi>

5. Ничик Н.А. Близькосхідний респіраторний синдром / Н.А. Ничик, Н.Г. Завіднюк, Н.Ф. Федчишин. //Інфекційні хвороби. - 2014. - № 4. - С. 71-75. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/InfKhvor_2014_4_18

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

45 7. WHO MERS-CoV Global Summary and Assessment of Risk, August 2018 (WHO/MERS/RA/August18). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Режим доступу: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/risk-assessment-july-2017.pdf>

8. MERS-CoV news archive. Режим доступу: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/news-archive/en/>

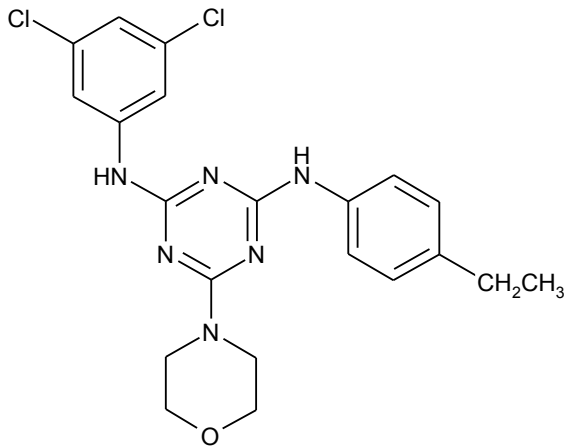
50 9. MERS: emergence of a novel human corona virus /V.S. Raj, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, B.L. Haagmans //Curr. Opin. Virol. - 2014. - Vol. 5. - P. 58-62.

10. Treatment of prostate cancer, melanoma or hepatic cancer. ZENYAKU KOGYO KABUSHIKIKAIISHA Patent: US2007/244110 A1, 2007

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55

$N-(3,4\text{-Дихлорфеніл})\text{-}N^1\text{-}(4^1\text{-етилфеніл})\text{-}6\text{-морфолін-}4\text{-іл-}[1,3,5]\text{триазин-}2,4\text{-діамін}$,



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

Комп'ютерна верстка В. Юкін

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