



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **135631** (13) **U**

(51) МПК (2019.01)

C07D 487/00

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

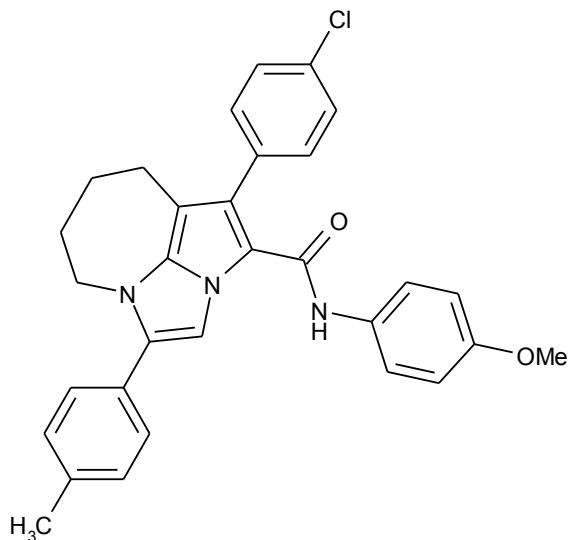
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 00948	(72) Винахідник(и): Демченко Сергій Анатолійович (UA), Федченкова Юлія Анатоліївна (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Демченко Анатолій Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.01.2019	(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2019	(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2019, Бюл.№ 13	

(54) АМІД (4¹-МЕТОКСИФЕНІЛ)-1-(4²-ХЛОРФЕНІЛ)-4-(ПАРА-ТОЛІЛ)-5,6,7,8-ТЕТРАГІДРО-2А,4А-ДІАЗАЦИКЛОПЕНТА[сd]АЗУЛЕН-2-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ВІРУСУ FLU A H1N1 CALIFORNIA/07/2009

(57) Реферат:

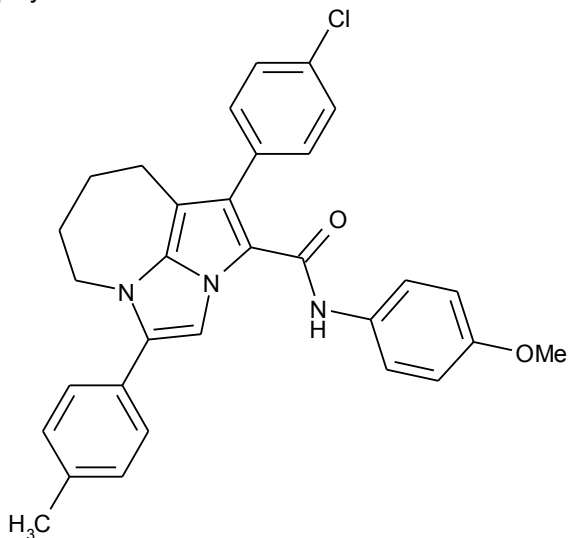
Амід (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазаціклопента[сd]азулен-2-карбонОВОЇ кислоти:



що проявляє антивірусну активність по відношенню до вірусу Flu A H1N1 штаму California/07/2009.

UA 135631 U

Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології засобів, зокрема одержання біологічно активного аміду (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти формули:



5

який виявляє антивірусну активність, що дозволяє передбачити його використання як антивірусний лікарський засіб, а саме для лікування грипу, викликаного вірусом California/07/2009 /H1N1/.

H1N1 є підтипом вірусу грипу А [1]. Штам цього вірусу викликав епідемію іспанки в 1918 році, став причиною спалаху грипу в 2005-2006 та 2009-2010 сезонів. За даними МОЗ, лише за період епідемії на грип та ГРВІ (з жовтня 2009 року по травень 2010 року) в Україні переохворіло понад 7,7 млн. осіб, чи 16,87 % населення країни. Рівень госпіталізації дітей під час епідемії грипу є значно вищим (84 %-93 %), ніж у дорослих [2]. За оцінкою експертів ВООЗ, пандемія 2009/2010 рр. призвела до смерті понад 500 тисяч осіб. За цей період було зафіксовано й 1128 летальних випадків в Україні. Понад 80 % смертей від грипу були зареєстровані у віковій категорії від 18 до 50 років, що характерно для пандемічного каліфорнійського штаму. На тлі супутніх захворювань (ожиріння, цукровий діабет, хронічні захворювання легень, вагітність, хронічні серцево-судинні захворювання тощо) достовірно спостерігається фатальна двобічна геморагічна пневмонія [3].

Вперше вірус А/H1N1 було відкрито в 1931 р. [4] американським вченим Р. Шоупом, який у подальшому віднесено до ендемічного зоонозу [5, 6].

Штам пандемічного H1N1 2009 ("Pandemic (H1N1) 09 Virus") в ЗМІ став відомий як "свинячий грип" людей [1]. У 2009 році в Каліфорнії виділено вірус грипу А/California/04/2009 (H1N1) та А/California /07/2009 (H1N1) [7], який поширюється як повітряно-крапельним, так і контактно-побутовим шляхами.

Сучасні протівірусні лікарські препарати за механізмом дії поділяються на ті, що безпосередньо порушують реплікацію вірусу та ті, що модулюють імунну систему організму-хазяїна. Лікарськими засобами, що зареєстровані в Україні та дозволені до медичного застосування, є Амізон, Амантадин, Арбідол, Занамівір, Інозин пранобекс, Озельтамівір, Римантадин та інші [8-15].

Як аналог протівірусного засобу щодо штаму вірусу California/07/2009/H1N1/ нами вибрано 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній іодид (Амізон) - розробку ДУ "Інституту фармакології та токсикології НАМН України" [11], який має протизапальні, анальгезуючі та жарознижуючі властивості. Анальгезуючий ефект реалізується за участі ретикулярної формації стовбура мозку [12]. Амізон має інтерференогенні властивості, що робить його перспективним для профілактики та лікування різних захворювань вірусної етіології [13], чинить інгібуючий вплив на віруси грипу, підвищує резистентність організму до вірусних інфекцій [14].

Але одноставної думки щодо доведеної ефективності деяких препаратів (Арбідол, Аміксин, Амізон, Кагоцел, Імунофан тощо) як імуномодуляторів з протигрипозною активністю, з позицій доказової медицини нині немає [15].

Як прототип нами вибрано відомий протівірусний препарат Рибавірин, що використовується для лікування інфекції, викликаной респіраторним синцитіальним вірусом, вірусним гепатитом С тощо. Серед побічних ефектів Рибавірину є дозозалежна анемія. При захворюваннях нирок,

серцево-судинної системи застосовувати цей препарат необхідно лише після ретельного обстеження [16].

Тому пошук нових противірусних препаратів є досить актуальним.

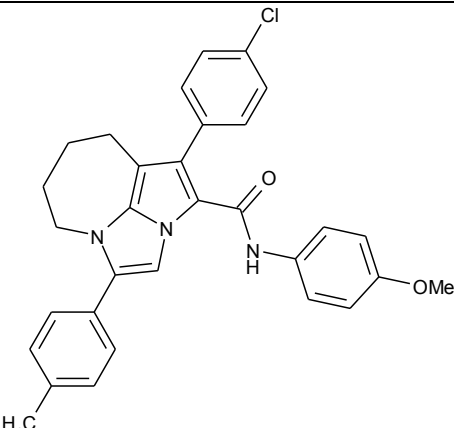
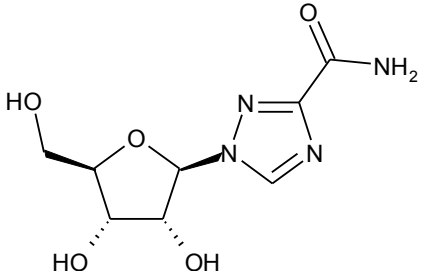
В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з противірусною активністю, що перешкоджають реплікацію вірусу, та які здатні лікувати грип, викликаний вірусом Flu A H1N1.

Як біологічно активну сполуку запропоновано амід (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діаза-циклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти, ефективність якого підтверджено експериментально. В табл. наведено дані противірусної активності заявленої сполуки по відношенню до вірусу Flu A H1N1 California/07/2009, які були проведені в Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama). Ефективність зазначеної сполуки виражали показниками EC₅₀, IC₅₀ та SI, які визначали в досліді in vitro при дії сполук, що попередньо розчиняли в ДМСО в діапазоні концентрацій від 0,1 до 100 мкг/мл. Разом із заявленою сполукою для вивчення противірусної дії нами було передано до Південного дослідного інституту США діючу речовину препарату Амідон - йодид 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію. Проведені дослідження виявили активність цієї субстанції, саме проти вірусу Flu A H1N1 California/07/2009. В умовах експерименту заявлена сполука виявила високу противірусну активність щодо вірусу Flu A H1N1 California/07/2009 (результати наведені в табл.).

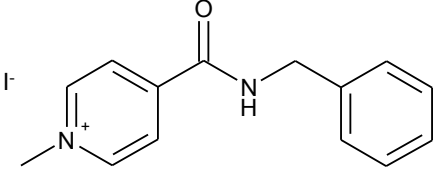
В умовах експерименту сполука, що заявлена, виявила високу противірусну активність щодо вірусу California/07/2009 (H1N1) (результати наведені в табл. 1).

Таблиця 1

Противірусна активність амід
(4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діаза-циклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти 8 щодо вірусу Flu A H1N1 California/07/2009

Сполука	Структура	Тип вірусу	EC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
		Flu A (H1N1) California/07/2009	3,4	>100	>29
Рибавірин		Flu A (H1N1) California/07/2009	8,7	>320	>37

Продовження таблиці 1

Амізон		Flu A (H1N1) California/07/2009	47	>100	>2,1
--------	---	------------------------------------	----	------	------

Примітки:

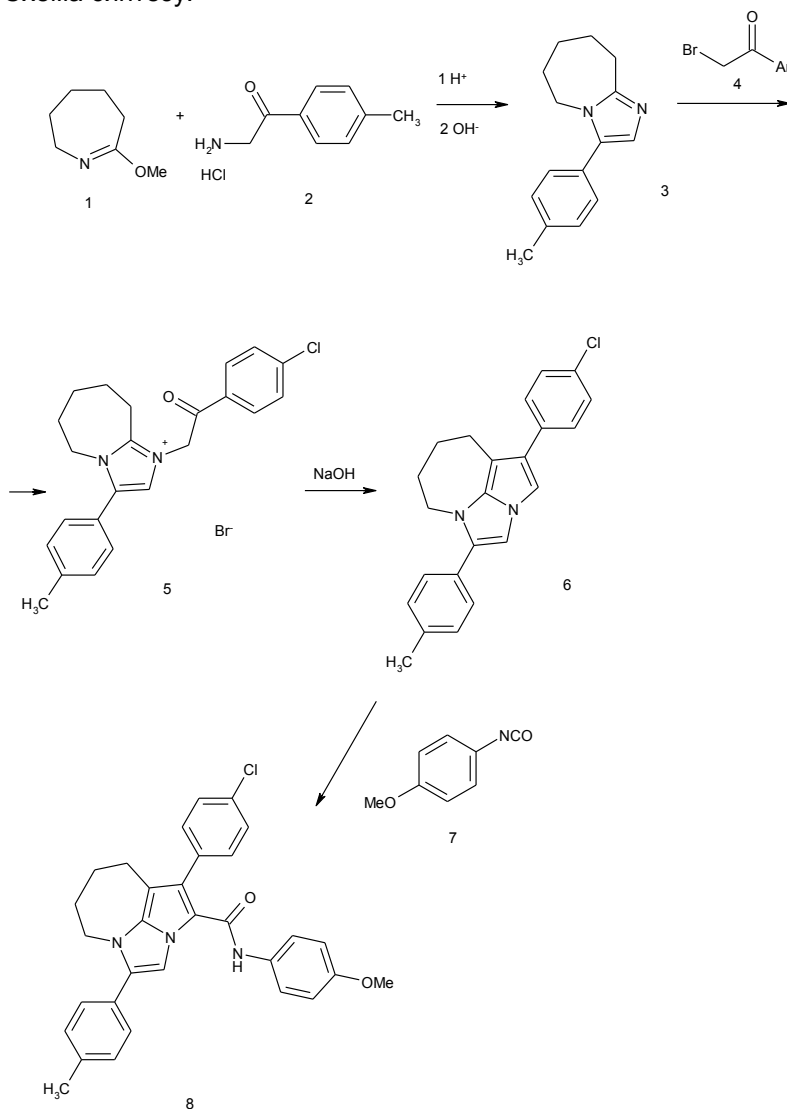
1. EC_{50} - ефективна концентрація, що визначається з кривої доза/ефект і є концентрацією речовини, при якій ефект спостерігається для 50 % популяції після проходження певного часу дії. Виражається у мкг/мл.

2. IC_{50} - концентрація, при якій інгібування клітин речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.

3. SI - індекс селективності, що є показником ефективності препарату, і виражається співвідношенням IC_{50} до EC_{50} .

5 Заявлений амід (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазаацклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти одержано з високим виходом при взаємодії 1-(4-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазаацклопента[сd]азулену та 4-метоксифенілізоціанату в сухому бензені.

Схема синтезу:



Приклади конкретного виконання.

2-Метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепін 1 одержано алкілуванням капролактаму диметилсульфатом за методикою [17]. Хлорідрат α -аміно-4-метилацетофенону одержано за методикою [18] взаємодією α -бром-4-метилацетофенону з гексаметилентетраміном та подальшою обробкою уротропінового комплексу хлоридною кислотою. 3-(4-метилфеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо[1,2-а]азепін 3 було одержано за методикою [19].

Приклад 1. Синтез броміду 1-[2-(4¹-хлорфеніл)-2-оксоетил]-3-(пара-толіл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо[1,2-а]азепінію 5. До розчину 9,04 г (0,04 моль) 3-(пара-толіл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо[1,2-а]азепіну 5 в 150 мл етилацетату при перемішуванні додавали 9,34 г (0,4 моль) α -бром-4-хлорацетофенону. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником 1 годину. Осад, що утворився, відфільтровували та кристалізували з етанолу. Вихід 16,0 г (87 %). $T_{пл.} = 239-240$ °С. Знайдено, %: N 6,16, $C_{23}H_{24}BrClN_2O$. Розраховано, %: N 6,09.

Приклад 2. Синтез 1-(4¹-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазациклопента[сd]азулену 6. До суспензії 4,60 г (0,01 моль) броміду 1-[2-(4¹-хлорфеніл)-2-оксоетил]-3-(пара-толіл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо-[1,2-а]азепінію 5 в 50 мл води приливали 20 мл 5 % розчину NaOH і кип'ятили реакційну суміш 3 години. Після охолодження осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою, сушили. Кристалізували з бензену. Вихід 1,73 г (48 %). $T_{пл.} = 216-218$ °С. Знайдено, %: N 7,62, $C_{23}H_{21}ClN_2$. Розраховано, %: N 7,76.

Приклад 3. Синтез амідру (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти 8. Суміш 1,80 г (0,005 моль) 1-(4¹-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2,4а-діазациклопента[с, d]азулену 6 та 0,75 г (0,005 моль) пара-метоксифенілізоціанату 7 в 50 мл сухого бензену кип'ятили із зворотним холодильником. Після охолодження осад, що утворився, відфільтровували, промивали бенzenом, сушили. Кристалізували з етанолу. Вихід 1,94 г (76 %). $T_{пл.} = 202-204$ °С. Знайдено, %: N 8,41, $C_{31}H_{28}ClN_3O_2$. Розраховано, %: N 8,24. ЯМР ¹H (д, м.ч., DMSO-d₆): 1,93 (м, 2H, CH₂), 2,08 (м, 2H, CH₂), 2,43 (с, 3H, CH₃), 2,55 (т, 2H, CH₂), 3,71 (с, 3H, OCH₃), 3,94 (т, 2H, CH₂), 6,97 (с, 1H, NH), 6,74 та 7,06 (д-д, 4H, C₆H₄, J=9,3 Гц), 7,30 та 7,44 (д-д, 4H, C₆H₄, J=8,3 Гц), 7,48 та 7,56 (д-д, 4H, C₆H₄, J=8,8 Гц), 7,84 (с, 1H, 3-CH).

Приклад 4. Вивчення противірусної активності амідру (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти 8. Моношар культури 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, скорегованого до не обхідної концентрації, сполуку 8 та противірусний засіб - Рибавірин (Sigma), що розчинені в диметилсульфоксиді, додавали у кожну лунку до кінцевої концентрації від 0,1 до 10 мкг/мл. Культивували протягом 48 годин, клітини MDCK спостерігали за допомогою мікроскопа. 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) ацетатній кислоті. Після 30 хвилин фарбування, розчин SRB, що не зв'язався з клітинами, 4 рази промивали 1 % (v/v) ацетатною кислотою. Після висушування в кожну лунку додавали 100 мкл 10 тМ розчину Tris (рН 10,5) для розчинення забарвлюючої речовини на дні лунки. Для оцінки противірусної активності вимірювали оптичну густину.

Як видно з результатів табл. 1, противірусна активність амідру (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діаза-циклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти 8 спостерігається при введенні меншої в 2,56 рази за концентрацію дози в порівнянні з Рибавірином та в 13,8 рази - у порівнянні з Амізоном. Індекс селективності досліджуваної речовини становить >29 при IC₅₀ >100 мкг/мл. У той же час індекс селективності препарату порівняння >37 при IC₅₀ >320 мкг/мл. Слід відмітити, що якби IC₅₀ для цих двох сполук був би однаковим, то SI для амідру (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а, 4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти 8 був би в тричі більшим та становив би SI>92,8.

Таким чином, запропонована нова сполука, яка може бути використана при створенні нового препарату, активного проти вірусу Flu A H1N1 California/07/2009, який включає більш високу противірусну активність, ніж препарати порівняння Амізон та Рибавірин.

Джерела інформації:

1. H1N1. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/H1N1>. - Назва з екрана.

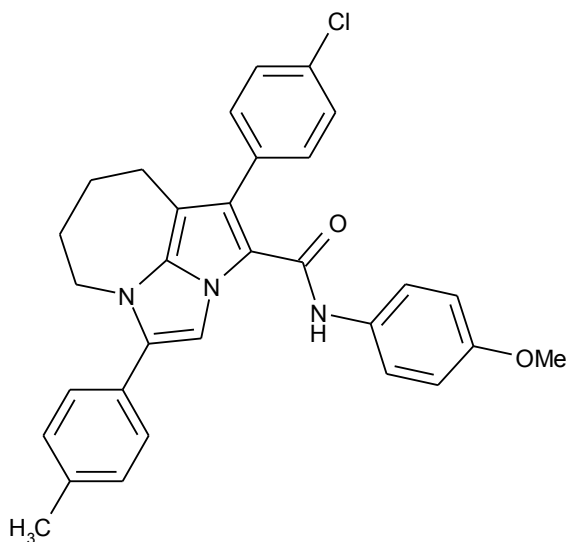
2. В Україні чекають щонайменше три штами гриппу. Режим доступу: <https://www.unian.ua/society/409702-v-ukrajini-chekayut-schonaymenshe-tri-shtami-gripu.html>. - Назва з екрана.

3. 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.
4. Shope R.E. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology // J Exp Med, 1931. - 54. - 373-385.
- 5 5. Dacso C.C. et al. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections // J Clin Microbio. - 1984. - № 20. - P. 833-835.
6. Myers K.P. et al. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? // Clin Infect Dis. - 2006. - № 42. - P. 14-20.
- 10 7. Bartlett J.G. 2009 H1N1 Influenza-Just the Facts: What's New and What to Expect // Published: 09/25/2009 Available at <http://www.medscape.com/>.
8. Emergence of novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team. The New England Journal of Medicine 2009; 10:1-10.
9. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). - 2009. - № 58. - P. 433-435.
- 15 10. Вікторов О.П. Противірусні лікарські засоби при лікуванні грипу: ефективність та безпека / О.П. Вікторов, В.П. Широбоков, О.В. Матвєєва та ін. // Український медичний часопис. - 2010. - № 2 (76). - С. 7-12. Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/3006/protivirusni-likarski-zasobi-pri-likuvanni-gripu-efektivnist-ta-bezpeka> - Назва з екрана.
- 20 11. Патент на винахід UA 6752. 4-(n-Бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид - знеболюючий засіб з інтерференогенними, протизапальними та жарознижуючими властивостями / Трінус Ф.П., Даниленко В.П., Бухтіарова Т.А. та ін. Опубл. 29.12.1994. Бюл. № 8-1.
12. Амізон. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ift.org.ua/uk/node/91> - Назва з екрана.
- 25 13. Эффективность Амизона в лечении и профилактике вирусных инфекций (к 10-летию применения препарата в клинической практике). Режим доступу: http://farmak.ua/publication/effektivnost-_amizona_v_lechenii_i_profilaktike_virusnyh_infektsiy_-k_10-etiyu_primeneniya_preparata_v_klinicheskoy_praktike.
- 30 14. Нормативно-директивні документи МОЗ України, Амізон - Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=20298> - Назва з екрана.
15. 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.
16. Рибавирин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%D0%B8%D0%B1%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD/> - Назва з екрана.
- 35 17. Граник В.Г., Жидкова А.М., Курятов Н.С. и др. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом // ХГС. - 1973. - № 11. - С. 1532-1535.
- 40 18. You Reiteng. Синтез хлоргидрата α-аминоацетофенона и его пара-замещенных производных // Хуисюе шицзи. Chem. Reagents. - 1986. - 8, № 5. - P. 302-325. Цит по: РЖХимия.- 1987. - 13Ж182.
19. Claxton G.P., Grisar J.M., Martin J., Wiech N.L. Cyclization of lactimide ketones to imidazo[1,2-a]azacycloalkanes with hypoglycemic activity // J. Med. Chem. - 1974. - 17, № 3. - P. 364-367.
- 45

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Амід (4¹-метоксифеніл)-1-(4²-хлорфеніл)-4-(пара-толіл)-5,6,7,8-тетрагідро-2а,4а-діазациклопента[сd]азулен-2-карбонової кислоти:

50



що проявляє антивірусну активність по відношенню до вірусу Flu A H1N1 штаму California/07/2009.

5

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