



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122175** (13) **C2**

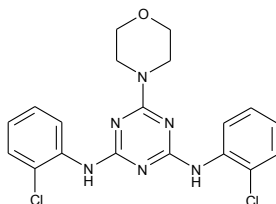
(51) МПК

C07D 251/12 (2006.01)**A61K 31/5375** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2018 11240	(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Барчина Олена Ігорівна (UA), Колесніков Олексій Володимирович (UA), Москаленко Олег Вадимович (UA)
(22) Дата подання заявки: 15.11.2018	(73) Володілець (володільці): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 26.09.2020	(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович
(41) Публікація відомостей про заяву: 25.05.2020, Бюл.№ 10	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Sarpnar E. et al. Pharmacophore identification and bioactivity prediction for triaminotriazine derivatives by electron conformational-genetic algorithm QSAR method// European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, vol. 45, no. 9, p. 4157 – 4168 Zheng M. et al. Synthesis and antitumor evaluation of a novel series of triaminotriazine derivatives// Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2007, vol. 15, no. 4, p. 1815 - 1827 WO 2016204988, A1, 22.12.2016 US 6 335 339, B1, 01.01.2002 UA 108401, U, 11.07.2016 US 20070244110, A1, 18.10.2007
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 25.09.2020, Бюл.№ 18	

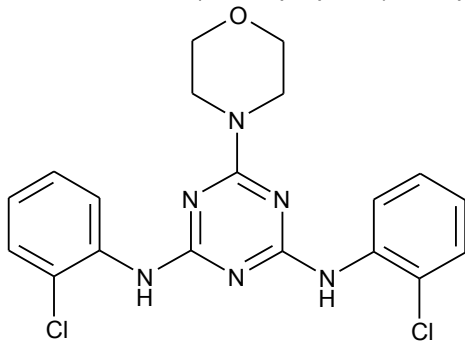
(54) N,N¹-БІС-(2¹-ХЛОРОФЕНІЛ)-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-[1,3,5]ТРИАЗИН-2,4-ДІАМІН, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО ВІРУСУ MIDDLE EAST CORONAVIRUS (НСОV-ЕМС)**(57)** Реферат:

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакологічно активних речовин, що проявляють антивірусну активність, конкретно до N,N¹-біс-(2¹-хлорофеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну, що проявляє антивірусну активність щодо вірусу Middle East Coronavirus (НСоV-ЕМС).



UA 122175 C2

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема, одержання біологічно активного N, N¹-біс-(2¹-хлорофеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5] триазин-2,4-діаміну формули:



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).

Зазначений вірус належить до групи бета-коронавірусів. З початку XXI століття виявлено одинадцять нових вірусів, що викликають гострі респіраторні захворювання людини та тварин [1]. Серед них найбільш небезпечними для людини є MERS-CoV, який є причиною розвитку близькосхідного респіраторного синдрому (БСРС), та SARS-CoV - збудник тяжкого гострого респіраторного синдрому (ТГРС). Обидва вони викликають захворювання органів дихання з високою летальністю [2], але коронавірус HCoV-EMC є особливо небезпечним для людини, оскільки розмножується набагато швидше, ніж вірус SARS. Інкубаційний період MERS-CoV у середньому становить 5,2 доби [3].

Хворі на MERS-CoV-інфекцію, як правило, мають такі клінічні прояви: сухий кашель, озноб, лихоманку, головний біль, задуху та міалгію. В інших пацієнтів спостерігається ангіна, нудота, блювота, запаморочення, виділення мокротиння, діарея та біль у животі, а також фіксуються патологічні зміни на рентгенограмах [4-6].

Лише за 2012-2015 р.р. ВООЗ проінформувала про 1289 лабораторно підтверджених випадків БСРС, спричиненого MERS-CoV, з яких 455 випадків були смертельними (35,3 %) [4]. У осіб з супутніми захворюваннями рівень смертності, пов'язаний з MERS-CoV, може сягати 60-80 % [5]. Високий рівень смертності від цієї інфекції означає, що сучасна фармакологія не має ефективних засобів для лікування цих захворювань.

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

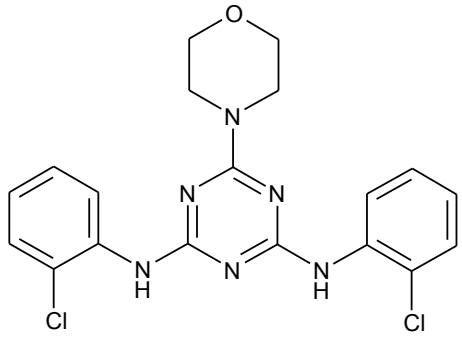
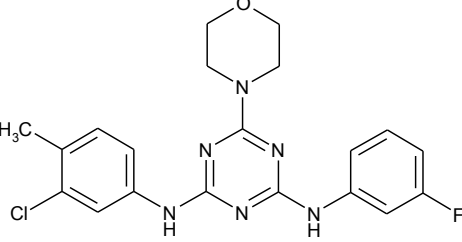
Як біологічно активну сполуку запропоновано N, N¹-біс-(2¹-хлорофеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0014303), ефективність якого підтверджується експериментально.

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

Прототипом за структурою та дією проти коронавірусу HCoV-EMC нами обрано N-(3¹-хлор-4¹-метилфеніл)-N¹-(3-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (патент України на винахід № 116386 від 12.03.2018 р.) [7].

У Табл. 1 наведено експериментальні дані EC₅₀, IC₅₀ та SI сполуки DAM0014303 та прототипу щодо вірусу HCoV-EMC, які визначено в досліджах *in vitro*.

Противірусна активність сполуки DAM0014303 та прототипу щодо вірусу HCoV-EMC.

Структура	Тип вірусу	Методики оцінки	* Концентрацій, мкг/мл		
			EC ₅₀	IC ₅₀	SI
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	3.3	>100	>30
		Візуальна перевірка	4.9	>100	>20
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	0.3	3.9	13
		Візуальна перевірка	0.42	4.2	10

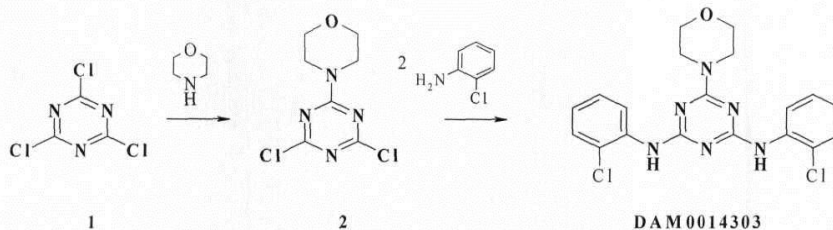
Примітки:

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 DAM0014303 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC₅₀, становить 3.3-4.9 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює SI = >20 - >30, що в 1,5-3,0 рази перевищує прототип.

Заявлений N, N'-біс-(2'-хлорофеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0014303) отримують з високим виходом за наведеною схемою 1:

Схема 1. Синтез N, N'-біс-(2'-хлорофеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4 (DAM0014303).



10

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. 2,4-Дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин (2) був одержаний за методикою [8] взаємодією ціанурхлориду (1) з морфоліном у середовищі ацетону при 5 °С.

15 Приклад 2. N, N'-Біс-(2'-хлорофеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0014303): 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 2.55 г (0.02 моль) 2-хлораніліну. Реакційну суміш перемішували при температурі 20 °С протягом двох годин та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Отримували 4.57 г (4-хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(2-хлорфеніл)-аміну, який без додаткової очистки та ідентифікації розчиняли в 50 мл тетра-гідрофурану. До одержаного

20

розчину при перемішуванні додавали 1.79 г (0.014 моль) 2-хлораніліну та 1.93 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 4.75 г (57 %). $T_{пл}=162-163$ °С. Знайдено, %: Cl=17.2 N=20.2 C₁₉H₁₈Cl₂N₆O. Вирахувано, %: Cl=17.0 N=20.1. Спектр ПМР (DMSO-d₆, TMC): 3.65 (м, 4H), 3.76 (м, 4H), 7.12-7.78 (м, 8H, ароматичні протони), 9.41 (с, 2H, 2NH).

Приклад 3.

Для оцінки протівірусної активності сполуки (DAM0014303) використано наступні методики.

10 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 °С 15 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 (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.

20 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. EC₅₀ визначається за кількістю поглинутого барвника.

Методи аналізу цитотоксичності:

А. Візуальне спостереження

30 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 IC₅₀

40 В. Визначення токсичності за поглинанням барвника нейтрального червоного.

На описаній вище стадії тестування досліджуваної сполуки за барвником нейтральним червоним при визначенні EC₅₀, 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 45 проводиться визначення 50 % концентрації пригнічення клітин за нейтральним червоним – IC₅₀.

Джерела інформації:

1. Дзюблик І.В. Нові коронавіруси людини та захворювання органів дихання / І.В. Дзюблик, О.В. Кукало // Укр. пульмонолог. журнал. 2015, № 4, С. 53-59.

2. Дуда О.К. Коронавірусні інфекції: близькосхідний респіраторний синдром, спричинений MERS-CoV / О.К. Дуда, Л.П. Коцюбайло // Мистецтво лікування № 7-8 (123-124). - 2015. - С. 4-11. Режим доступу: www.health-medix.com

3. Assiri A. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus / Assiri A. McGeer A., Perl T.M. et al. // N. Engl. J. Med. - 2013. -Vol. 369, No 5. - P. 407-416. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23782161>

55 4. Дуда О.К. Коронавірусні інфекції: загроза людству з Близького Сходу спричинена MERS-Cov? / О.К. Дуда, Л.П. Коцюбайло // Актуальна інфектологія. - 2015. - № 3 (8). - С 9-16. Режим доступу: http://www.mif-ua.com/archive/article_print/41432

5. Das K.M. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: What Does a Radiologist Need to Know? / K.M. Das, E. Y. Lee, R.D. Langer, S.G. Larsson // American Journal of Roentgenology. --

2016. - Vol. 206: No 6. - P. 1193-1201. Режим доступу: <https://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.15.15363>

6. Assiri A., Al-Tawfiq J.A., Al-Rabeeah A.A. et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study // *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13:752

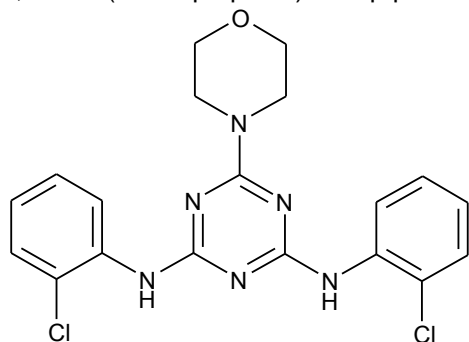
7. Патент на винахід № 116386 Україна, МПК C07D 253/065 C07D 295/00 N-(3'-Хлор-4'-метилфеніл)-N¹-(3'-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін, що проявляє антивірусну активність щодо вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC) / А.М. Демченко, В.В.Суховерев, Л.С. Бобкова, Ю.В. Ренькас - № а201601111; Заявл. 09.02.2016; Опубл.12.03.2018, Бюл. № 5.

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

15

N,N¹-Біс-(2'-хлорофеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін



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

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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