



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123455** (13) **C2**  
(51) МПК (2021.01)  
**C07D 253/065** (2006.01)  
**C07D 295/00**  
**A61P 31/12** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2018 12955</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>27.12.2018</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>08.04.2021</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.07.2020, Бюл.№ 13</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>07.04.2021, Бюл.№ 14</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Барчина Олена Ігорівна (UA), Циганков Сергій Андрійович (UA)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ,</b> вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)</p> <p>(74) Представник: <b>Москаленко Олег Вадимович</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 122175 C2, 25.09.2020 UA 108401 U, 11.07.2016 UA 67510 U, 27.02.2012 UA 95732 U, 12.01.2015 UA 116 386 C2, 12.03.2018 UA 117265 U, 26.06.2017 UA 117204 U, 27.12.2018 UA 86038 U, 10.12.2013 UA 117265, 26.06.2017 Zheng, Mingfang; Xu, Chenghui; Ma, Jianwei; Sun, Yan; Du, Feifei; Liu, Hong; Lin, Liping; Li, Chuan; Ding, Jian; Chen, Kaixian; Jiang, Hualiang, «Synthesis and antitumor evaluation of a novel series of triaminotriazine derivatives», <a href="https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.028">https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.028</a>, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2007, vol. 15, № 4, p. 1815 – 1827</p>
---	---

**(54) N-(3,4-ДИХЛОРФЕНІЛ)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-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)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін, що проявляє антивірусну активність щодо вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC). Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме, до фармакологічно активних речовин, що проявляють антивірусну активність, конкретно до N-(3,4-дихлорфеніл)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну. Експериментальне 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,

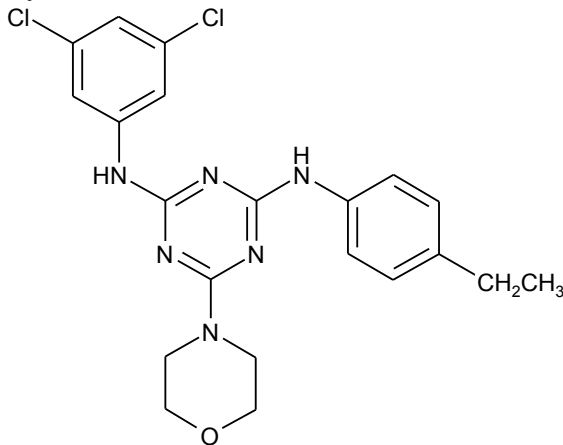
UA 123455 C2

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 EC50, IC50 та SI, які визначали в досліджах *in vitro*.

Показано, що пригнічення вірусу Middle East Coronavirus (HCoV-EMC) сполукою N-(3,4-дихлорфеніл)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін у пробі за нейтральним червоним EC<sub>50</sub> становить 0.32 мкг/мл, а візуальною методикою оцінки EC<sub>50</sub>=0,56 мкг/мл, індекси селективності досліджуваної речовини становлять відповідно SI=27 та SI=12.

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема, одержання біологічно активного N-(3,4-дихлорфеніл)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну формули:



5 який проявляє протівірусні властивості що до вірусу HCoV-EMC (або MERS-CoV).

Коронавірус MERS-CoV (від Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) є одноланцюговим 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].

10 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 МЕРС-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].

25 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.

30 В основу винаходу 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)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (сполука DAM0012327), ефективність якого підтверджується експериментально.

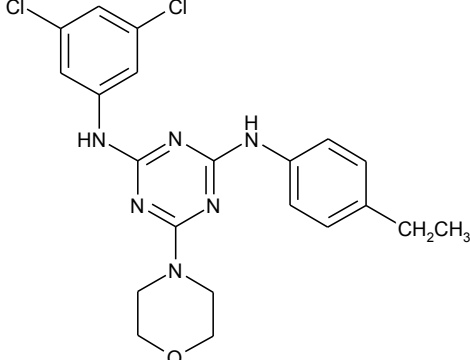
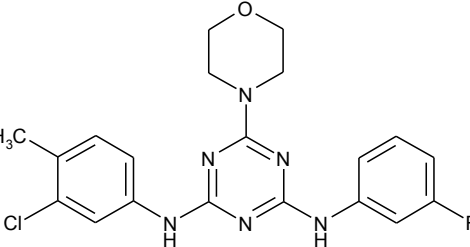
35 Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIAD) у Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama) під керівництвом проф. Дейла Бернарда з університету штату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

40 Найближчим аналогом за структурою та дією проти коронавірусу HCoV-EMC нами обрано N-(3<sup>1</sup>-хлор-4<sup>1</sup>-метилфеніл)-N<sup>1</sup>-(3<sup>1</sup>-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 EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> та SI сполуки DAM0012327 та найближчого аналогу щодо вірусу HCoV-EMC, які визначено в дослідях *in vitro*.

45

Противірусна активність сполуки DAM0012327  
та найближчого аналогу щодо вірусу HCoV-EMC.

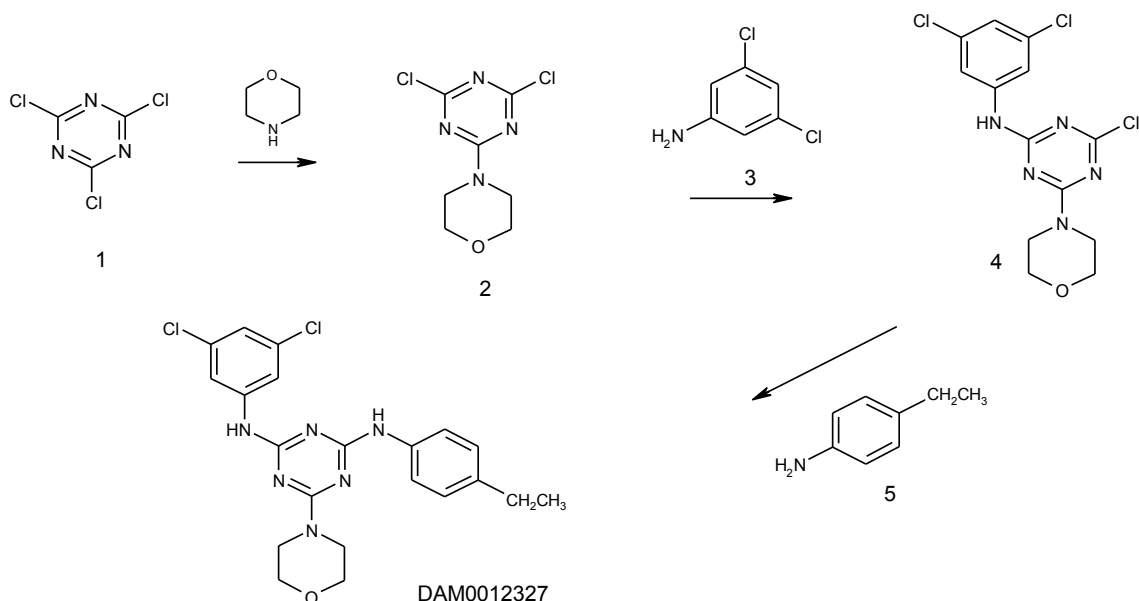
Структура	Тип вірусу	Методики оцінки	*Концентрацій, мкг/мл		
			EC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	SI
	HCoV-EMC	За нейтральним червоним	0.32	8.5	27
	HCoV-EMC	Візуальна перевірка	0.56	6.8	12
		За нейтральним червоним	0.3	3.9	13
		Візуальна перевірка	0.42	4.2	10

## \* Примітки:

1. EC<sub>50</sub> - 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<sub>50</sub> - концентрація, при якій інгібування клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI - індекс селективності - показник ефективності препарату, який виражається співвідношенням IC<sub>50</sub> до EC<sub>50</sub>.

Відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу HCoV-EMC сполукою DAM0012327 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC<sub>50</sub>, становить 0.32-0.56 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює SI=12-27.

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



Приклади конкретного виконання.

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

5 Приклад 2. 4-Хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(3,5-дихлор-феніл)-амін (4): 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 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  $C_{13}H_{12}Cl_3N_5O$ . Вирахувано, %: 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).

10 Приклад 3. N-(3,4-Дихлорфеніл)-K¹-(4¹-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5] триазин-2,4-діамін (DAM0012327): 3.61 г (0.01 моль) (4-хлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-(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  $C_{21}H_{22}Cl_2N_6O$ . Вирахувано, %: Cl=15.9 N=18.9. Спектр ПМР (DMSO- $d_6$ , TMC): 1.18 (т, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.56 (кв, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (м, 4H), 3.75 (м, 4H), 7.10 (с, 1H, CH), 7.14 та 7.56 (д-д, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.85 (с, 2H, ароматичні протони), 9.30 (с, 1H, NH), 9.56 (с, 1H, NH).

Приклад 4.

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

25 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 50 % ефективної концентрації (EC<sub>50</sub>). Активність кожної з досліджуваних сполук виражається індексом селективності (SI), що є відношенням IC<sub>50</sub> до EC<sub>50</sub>. Позитивним вважається результат, у якому сполука проявила SI порядку 10 і більше.

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

40 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub>.

15 В. Визначення токсичності за поглинанням барвника нейтрального червоного.

На описаній вище стадії тестування досліджуваної сполуки за барвником нейтральним червоним при визначенні EC<sub>50</sub>, 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<sub>50</sub>.

Таким чином, відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу HCoV-EMC сполукою DAM0012327 за двома методами оцінювання, виражене концентрацією EC<sub>50</sub>, становить 0.32-0.56 мкг/мл, а її індекс селективності дорівнює SI=12-27 проти SI=10-1 найближчого аналогу 3.

25 Джерела інформації:

1. Middle East respiratory syndrome coronavirus. Режим доступу: [https://en.wikipedia.org/wiki/Middle\\_East\\_respiratory\\_syndrome\\_coronavirus](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](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/koronavirusnaya-infekciya-atipichnaya-pnevmoniya-prichiny-simptomu-diagnostika-lechenie\\_75425i15955.html](http://ilive.com.ua/health/koronavirusnaya-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/>

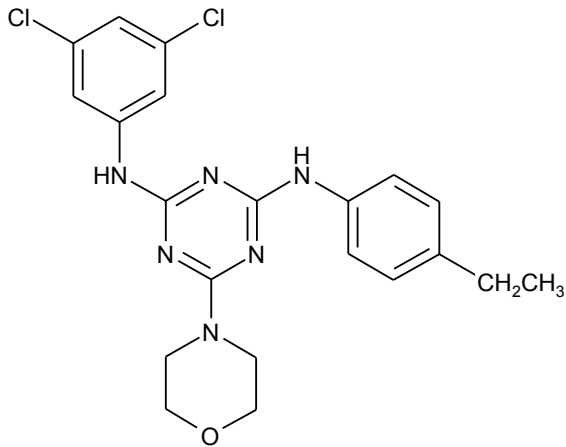
50 9. MERS: emergence of a novel human coronavirus /V.S. Raj, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, B.L. Haagmans //Curr. Opin. Virol. - 2014. - Vol. 5. - P. 58-62.

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

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

55

N-(3,4-дихлорфеніл)-N<sup>1</sup>-(4<sup>1</sup>-етилфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін:



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