



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123875** (13) **C2**  
(51) МПК**C07D 487/16** (2006.01)**A61K 31/55** (2006.01)**A61P 31/16** (2006.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2019 01416****(22)** Дата подання заявки: **12.02.2019****(24)** Дата, з якої є чинними  
права інтелектуальної  
власності: **17.06.2021****(41)** Публікація відомостей  
про заявку: **25.08.2020, Бюл.№ 16****(46)** Публікація відомостей  
про державну  
реєстрацію: **16.06.2021, Бюл.№ 24****(72)** Винахідник(и):**Демченко Сергій Анатолійович (UA),  
Федченкова Юлія Анатоліївна (UA),  
Суховєєв Володимир Володимирович  
(UA),  
Демченко Анатолій Михайлович (UA)****(73)** Володілець (володільці):  
**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:  
UA 108368 C2; 27.04.2015  
UA 95732 U; 12.01.2015  
UA 115750 C2; 11.12.2017  
UA 115851 C2; 26.12.2017  
UA 117081 C2; 11.06.2018  
Демченко С.А. Синтез і протівірусна  
активність похідних 1-(2,3-  
дигідробензо[1,4]діоксан-6-іл)-3-арил-3-  
гідрокси-2,5,6,7,8,9-3Н- імідазо[1,2-  
а]азапінію та субстанції Амізону / С.А.  
Демченко, Т.А. Бухтіарова, Л.С. Бобкова,  
А.М. Демченко // Фармакологія та лікарська  
токсикологія. – 2018. - № 1(57). – С. 26-31  
Савченкова Л. В. Поиск потенциальных  
антиоксидантов в ряду производных 5,6,7,8-  
тетрагидро-2,2а,8а-триазациклопента. /  
Савченкова Л. В., Оглоблина М. В.,  
Колесников А. В., Глущенко А. В., Демченко  
А. М., Акимова М. С., Рокотянская В. В. //  
Український журнал клінічної та  
лабораторної медицини. – 2010. – Т.5. - №  
2. – С. 63-69  
Демченко А.М. Производные 1,4-диарил-  
5,6,7,8-тетрагидро-2,2а,8а-  
триазациклопента[с,d]азулена. Химия  
гетероциклических соединений. – 2000.-  
№8.- С.1123-1127**(54)** **ФЕНІЛАМІД** **1-(ПАРА-ТОЛІЛ)-4-ФЕНІЛ-5,6,7,8-ТЕТРАГІДРО-2,2а,4а-ТРИАЗАЦИКЛОПЕНТА[cd]АЗУЛЕН-3-КАРБОТІОНОВОЇ КИСЛОТИ, ЩО ПРОЯВЛЯЄ ПРОТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ВІРУСУ FLu A H1N1 CALIFORNIA/07/2009**

UA 123875 C2

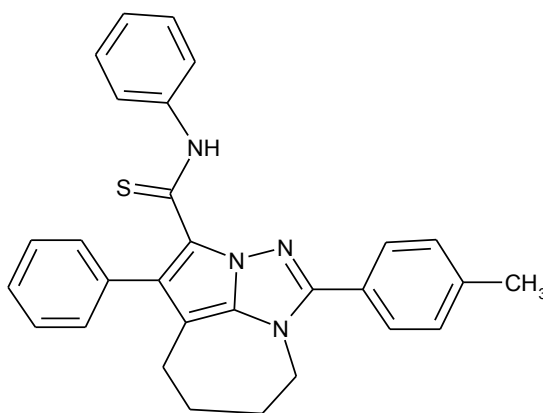
**(57) Реферат:**

Феніламід 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,4а-триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти, що проявляє протівірусну активність відносно вірусу Flu A H1N1 California/07/2009.

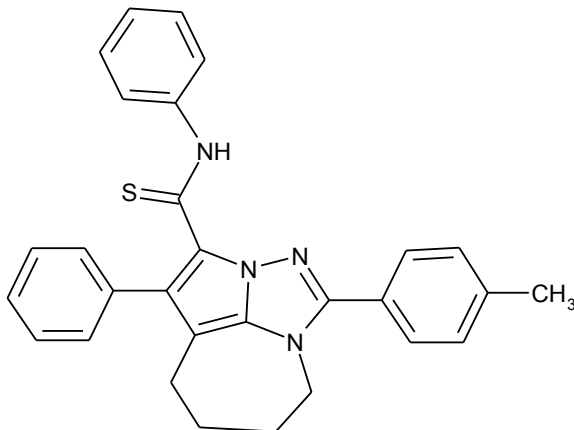
Винахід належить до органічної, фармацевтичної хімії та медицини. Заявлена сполука може бути використана для створення протівірусного препарату щодо штаму вірусу Flu A H1N1 California/07/ 2009. Дослідження проведені в Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama).

Показано, що протівірусна активність феніламіду 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,4а-триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти спостерігається при введенні меншої в 18,5 разів за концентрацію дози в порівнянні з Рибавірином та в 10 разів - у порівнянні з Амізоном. Індекс селективності досліджуваної речовини становить  $SI=200$ . У той же час індекс селективності в тих же умовах для Рибавірину  $SI>37$ , а для Амізону  $SI>2.1$ .

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



Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології засобів, зокрема, одержання біологічно активного феніламіду 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової 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 - штам так званого "свинячого" або "мексиканського" вірусу підтипу А, який досі до кінця не вивчений, та який поширюється як повітряно-крапельним, так і контактно-побутовим шляхами [1-4]. Підтип вірусу грипу А викликав епідемію іспанки в 1918 році [5].

10 На сьогодні ця небезпечна хвороба відома багатьом країнам світу. За даними Центру контролю та профілактики захворювань Сполучених Штатів Америки вперше штам H1N1 був виявлений в США в квітні 2009 року [6]. Цей вірус мав унікальну комбінацію генів, раніше не ідентифікованих ні у тварин, ні у людей. Проведені дослідження виявили схожість генів вірусу H1N1 з вірусом, який ідентифікували у свиней в Північній Америці. Через це в початкових повідомленнях вірус називався вірусом грипу свинячого походження [7, 8]. Згодом, дослідження первинних випадків захворювання людей не виявили впливу на свиней, що свідчило про відсутність взаємозв'язку між цими випадками.

20 За період епідемії 2009-2010 р. в Україні на грип та ГРВІ перехворіло майже 17 % населення країни. Зазначалося [9], що рівень госпіталізації дітей під час епідемії значно вищий за дорослих людей (відповідно 84 % до 93 %).

Під час пандемічного сезону грипу 2009-2010 р.р. спостерігалася значна кількість летальних випадків (до 200 померлих за тиждень). Слід зауважити, що пацієнти зверталися до лікувальних закладів у край тяжкому стані, що призводило до реєстрації добової летальності у 31,6 % випадках.

Дослідження тяжких випадків грипу 2009-2010 рр. показало, що частіше хворіли чоловіки, ніж жінки [10].

Перелічене вище зумовило потребу у проведенні необхідних запобіжних заходів на глобальному та національному рівнях [11].

30 В Україні зареєстровані та дозволені до медичного застосування ряд лікарських засобів, які безпосередньо порушують реплікацію вірусу, а саме: Амізон, Амантадин, Арбідол, Занамівір, Інозин Пранобекс, Озельтамівір, Римантадин та інші [12-16].

В якості аналога противірусного засобу щодо штаму вірусу California/07/2009 /H1N1/ нами обрано 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній іодид (Амізон) - розробку ДУ "Інституту фармакології та токсикології НАМІ України" [13], який має протизапальні, анальгезуючі та жарознижуючі властивості. Анальгезуючий ефект реалізується за участі ретикулярної формації стовбура мозку [14]. Амізон має інтерференогенні властивості, що робить його перспективним для профілактики та лікування різних захворювань вірусної етіології [15], чинить інгібуючий вплив на віруси грипу, підвищує резистентність організму до вірусних інфекцій [16].

40 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 [12].

Для дослідження в якості препарату порівняння нами було обрано відомий противірусний препарат Рибавірин, що володіє широким спектром активності проти різних ДНК і РНК вірусів, а також має активність щодо вірусного гепатиту С Цей лікарський засіб має безліч протипоказань та побічних ефектів, серед яких: гіперчутливість, вагітність, період лактації, хронічна серцева

недостатність, інфаркт міокарда, ниркова недостатність, тяжка анемія, печінкова недостатність, декомпенсований цироз печінки, аутоімунні захворювання (включаючи аутоімунний гепатит), депресивний стан та вікові обмеження у застосуванні. Тому, застосування цього препарату можливе лише після ретельного обстеження [17].

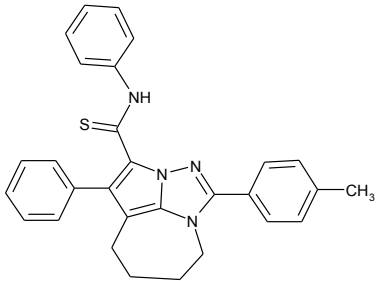
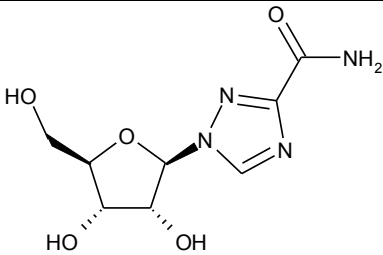
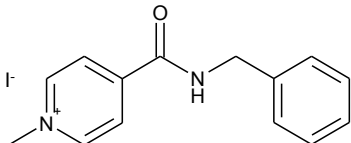
5 Отже, створення нових противірусних лікарських засобів є актуальною задачею фармації.

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

10 В якості біологічно активної сполуки запропоновано феніламід 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазаціклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти, ефективність якого підтверджено експериментально. Противірусну активність заявленої сполуки відносно до вірусу Flu A H1N1 California/07/ 2009 досліджено в Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama). Ефективність зазначеної сполуки виражали показниками EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> та SI, які визначали в досліді in vitro при дії сполук, що  
15 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 Амізон - іодид 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  
20 противірусну активність щодо вірусу Flu A H1N1 California/07/2009 (результати наведено в табл. 1).

Таблиця 1

Противірусна активність феніламідів 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазаціклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти щодо вірусу Flu A H1N1 California/07/2009

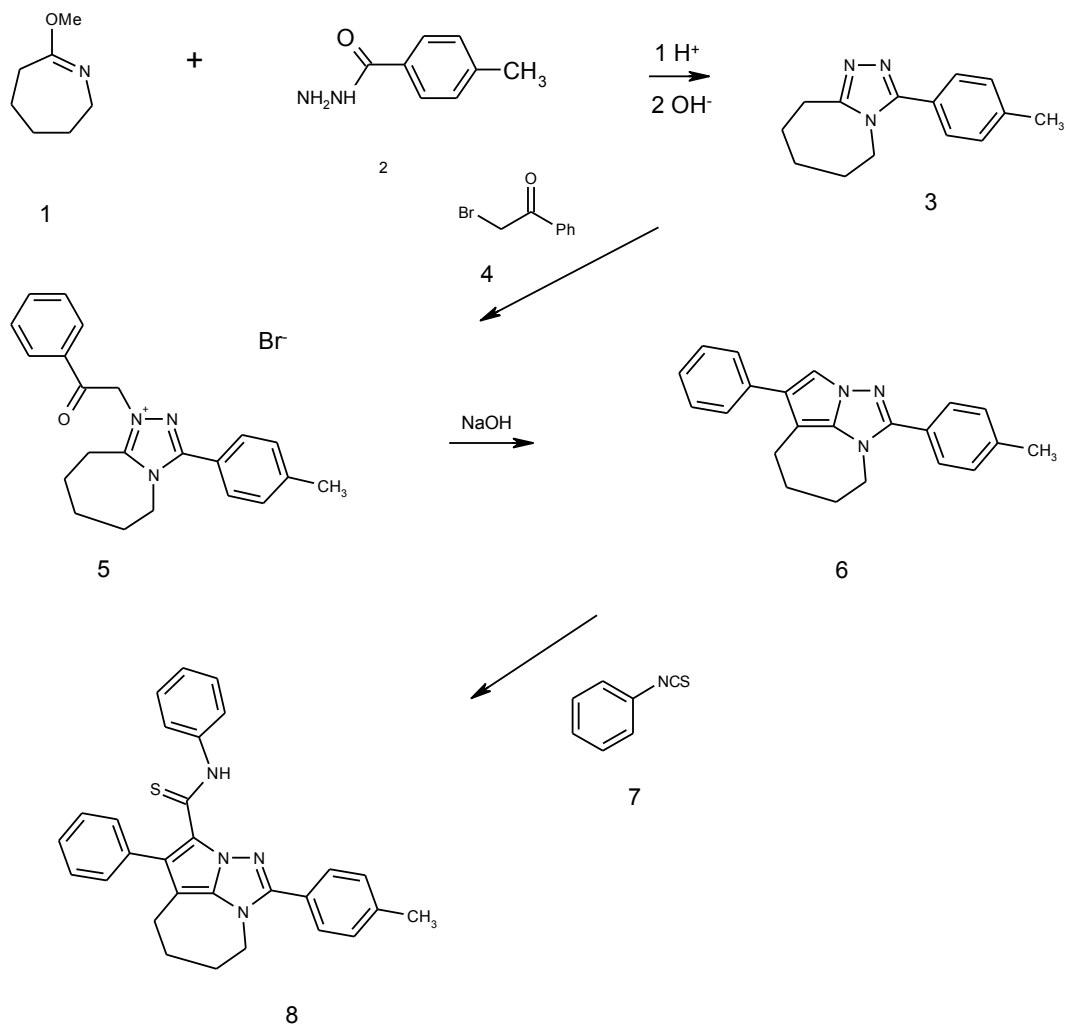
Сполука	Структура	Тип вірусу	EC <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	SI
		Flu A(H1N1) California/07/2009	0.47	97	200
Рибавірин		Flu A(H1N1) California/07/2009	8.7	>320	>37
Амізон		Flu A(H1N1) California/07/2009	47	>100	>2.1

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 речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI – індекс селективності, що є показником ефективності препарату, і виражається співвідношенням IC<sub>50</sub> до EC<sub>50</sub>.

Заявлений феніламід одержано з високим виходом при взаємодії 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазаціклопента[сd]азулену та фенілізотіоціанату в сухому бензені.

5 Схема синтезу феніламідів 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазаціклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти:



Приклади конкретного виконання.

2-Метокси-3,4,5,6-тетрагідро-7Н-азепін 1 одержано алкілуванням капролактаму диметилсульфатом за методикою [18]. 3-(пара-толіл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-  
 5 а]азепін 3 був одержаний за методикою [19]. 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазациклопента[сd]азулен 6 одержаний за методикою [20].

Приклад 1. Синтез феніламіду 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-  
 10 триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти 8. Суміш 1.64 г (0.005 моль) 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазациклопента[сd]азулену 6 та 0.676 г (0.005 моль) фенілізотіоціанату 7 в 50 мл сухого бензену кип'ятили із зворотним холодильником. Після охолодження осад, що утворився, відфільтрували, промивали бензеном, сушили. Кристалізували з етанолу. Вихід 1.69 г (73 %). Т<sub>пл.</sub>=196-198 °С. Знайдено, %:

15 N 12.4, C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>S. Розраховано, %: N 12.1. ЯМР <sup>1</sup>H (δ, м.ч., DMSO-d<sub>6</sub>): 1.97 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.09 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.19 (т, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.97 (с, 1H, NH), 7.10-7.76 (м, 14H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>+C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>+C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 10.7 (с, 1H, NH).

Приклад 4. Вивчення протівірусної активності феніламіду 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової 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 протівірусний 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 мікроскопу. 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 протівірусної активності вимірювали оптичну густину.

Як видно з результатів табл. 1, протівірусна активність феніламід 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 4а-триазаціклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти 8 спостерігається при введенні меншої в 18.5 рази за концентрацію дози ЕС<sub>50</sub> У порівнянні із Рибавірином, та в 10 разів - у порівнянні з Амізоном. Індекс селективності досліджуваної речовини становить SI=200. В той час, як у Рибавірині SI>37, а у Амізону SI>2.1.

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

Джерела інформації:

1. Dacso C.C. et al. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections //J Clin Microbio. - N 20. -1984. - P. 833-835.

2. 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/>.

3. 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.

4. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). N 58. - 2009. - P. 433-435.

5. H1N1. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/H1N1>.

6. The 2009 H1N1 Pandemic: Summary Highlights, April 2009-April 2010. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://www.cdc.gov/HINIFLU/cdcresponse.htm>

7. Myers K.P. et al. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? //Clin Infect Dis. - N 42. - 2006. - P. 14-20.

8. Shope R. E. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology //J ExpMed, 1931; 54: 373-385.

9. В Україні чекають щонайменше три штами грипу. Режим доступу: <https://www.unian.ua/society/409702-v-ukrajini-cheKayut-schonaYmenshe-tri-shtami-gripu.html>.

10. 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.

11. Вікторов О.П. Протівірусні лікарські засоби при лікуванні грипу: ефективність та безпека /О.П. Вікторов, В.П. Ширококов, О.В. Матвєєва та ін... //Український медичний часопис № 2(76). - 2010. - С. 7-12. Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/article/3006/protivirusni-likarski-zasobi-pri-likuvarmi-gripu-efektivnist-ta-bezpeka>

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

13. Патент на винахід UA 6752. 4-(п-Бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид - знеболюючий засіб з інтерферогенними, протизапальними та жарознижуючими властивостями /Трінус Ф.П., Даниленко В.П., Бухтіарова Т.А. та інш. Опубл. 29.12.1994. Бюл. № 8-1.

14. Амізон. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ift.org.ua/uk/node/91>

15. Эффективность Амизона в лечении и профилактике вирусных инфекций (к 10-летию применения препарата в клинической практике). [Електронний ресурс]. - Режим доступу: [http://farmak.ua/publication/effektivnost-amizona\\_v\\_lechenii\\_i\\_profilaktike\\_virusnyh\\_infektsiy\\_k\\_10-etiyu\\_primeneniya\\_preparata\\_v\\_klinicheskoy\\_praktike](http://farmak.ua/publication/effektivnost-amizona_v_lechenii_i_profilaktike_virusnyh_infektsiy_k_10-etiyu_primeneniya_preparata_v_klinicheskoy_praktike)

16. Нормативно-директивні документи МОЗ України, Амізон. - [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?icH20298>

17. Рибавірин - официальная инструкция по применению - [Електронний ресурс]. - Режим доступу: [https://medi.ru/instrukciya/ribavirin\\_1672/](https://medi.ru/instrukciya/ribavirin_1672/)

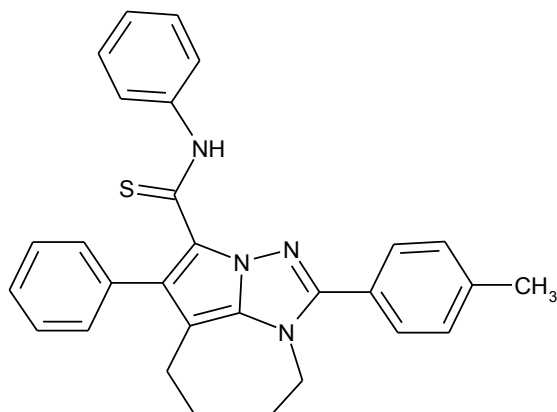
18. Граник В.Г. Ацетали лактамов. VII. Исследование алкилирования N-метиллактамов и лактимных эфиров диметилсульфатом /В.Г. Граник, А.М. Жидкова, Н.С. Курятов и др. //ХГС. - 1973. - № 11. - С. 1532-1535.

19. S. Petersen, E. Tietze. Reaktionen cyclischer lactimather mit acylierten hydrazinderivaten //Chem. Ber. - 1957. - V. 90, Is. 6. - P. 909-921.

20. Демченко А.М. Производные 1,4-диарил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а, 8а-триазаціклопента [сd]азулена //ХГС. - 2000. - № 8. – С. 1123-1127.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Феніламід 1-(пара-толіл)-4-феніл-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,4а-триазациклопента[сd]азулен-3-карботіонової кислоти:



5

що проявляє протівірусну активність відносно вірусу Flu A H1N1 California/07/2009.