



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **101090**

(13) **U**

(51) МПК

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/32** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2015 02140**

(22) Дата подання заявки: **11.03.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.08.2015**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.08.2015, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

**Сейфулліна Інна Йосипівна (UA),  
Марцинко Олена Едуардівна (UA),  
Чебаненко Олена Анатоліївна (UA),  
Гридіна Тетяна Леонідівна (UA),  
Мудрик Любов Михайлівна (UA),  
Федчук Алла Семенівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА,  
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)**

**(54) АРГЕНТУМ БІС(ЦИТРАТО)ГЕРМАНАТ З ПРОТИГРИПОЗНОЮ АКТИВНІСТЮ**

(57) Реферат:

Аргентум біс(цитрато)германат з протигрипозною активністю, як координаційний полімер з різними металами і карбоксилатним лігандом. В молекулі містить два біометали (германій, аргентум) і біологічно активний ліганд (лимонна кислота) з формулою  $\{[Ag_2Ge(HCitr)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O\}_n$  і будовою.

**UA 101090 U**



Корисна модель належить до координаційних полімерів, а саме до аргентум біс(цитрато)германату, що виявляє противірусну активність та може використовуватись в фармацевтичній промисловості для розробки протигрипозних препаратів.

Стратегія розробки нових, більш ефективних протимікробних засобів за рахунок введення певних іонів до молекулярної структури з утворенням комплексів, дозволяє вирішувати проблеми фармакології. В даний час виявлено, що металокомплекси виявляють певний рівень активності у відношенні грибів, бактерій, вірусів. Дуже важливим є те, що до металокомплексів виявляються чутливими навіть резистентні форми мікроорганізмів.

Сполуки, що містять іони аргентуму (срібла) достатньо давно використовують в медицині в якості протимікробних засобів. Це такі відомі препарати, як ляпіс (аргентум нітрат), протаргол, коларгол, що застосовують зовнішньо для обробки ран, лікування кон'юнктивітів, екзем; перорально в комплексі засобів для лікування респіраторних інфекцій, гастроентеритів, дизентерії та ін. Протимікробна активність срібла пов'язана з біохімічною, каталітичною та комплексуютьною дією іонів срібла на бактеріальні білки, ферменти, мембранні структури [1]. Суттєвим є той факт, що токсичність цих сполук для вищих організмів на 5-6 порядків менша, ніж для нижчих (простіших, бактерій, вірусів). Тобто, концентрації срібловміщуючих сполук, що викликають загибель мікроорганізмів, не спричиняють токсичного впливу на людину.

Фармакокінетика срібла добре досліджена. Срібло не накопичується значною мірою у внутрішніх органах та середовищі організму, ані при однократному, ані при багаторазовому застосуванні. Період виведення з організму складає 48-72 години.

Загальним недоліком препаратів срібла, як у вигляді колоїдних розчинів, так і з використанням металічного срібла, є низька агрегаційна стійкість розчинів, а також недостатня біодоступність його іонів [1]. Ці недоліки можна усунути, якщо вводити аргентум у вигляді металокомплексів.

Біологічно важливий мікроелемент германій необхідний для забезпечення нормальної життєдіяльності організму. Його сполуки характеризуються широким спектром біологічної дії: протипухлинної, імуномодуючої, противірусної, антиоксидантної, тощо [2].

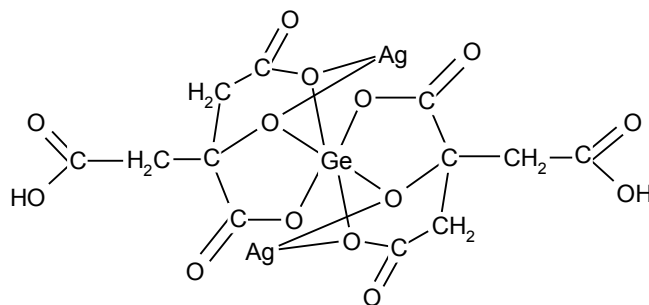
Пандемії та епідемії грипу завжди спричиняли значні ушкодження здоров'ю населення. На протязі двадцятого сторіччя було зареєстровано три пандемії грипу А людей: 1918, 1957 та 1968 років, які були викликані різними антигенними підтипами (H1N1, H2N2 та H3N2 відповідно) і призвели до загибелі значної кількості людей [3, 4]. Саме тому пошук нових противірусних засобів серед сполук з різними структурними характеристиками є вкрай актуальним завданням науковців. Пошук металокомплексів, які будуть проявляти противірусну активність, підтверджує перспективність їх використання у медицині.

Відомі етіотропні хіміотерапевтичні засоби проти грипу за рекомендаціями ВООЗ - це похідні адамантанового ряду (амантадин, ремантадин) [5]. Недоліком цих препаратів є суттєві обмеження при застосуванні: серцева недостатність, артеріальна гіпотензія, психомоторне збудження, захворювання печінки та нирок, вагітність та годування груддю.

Як противірусні засоби використовують також інгібітори нейрамінідази (занамівір, озельтамівір) [5], недоліком яких є алергічні реакції. До того ж, переважна більшість людських ізолятів вірусів грипу набувають стійкості до дії цих найбільш розповсюджених протигрипозних препаратів - ремантадину, озельтамівіру [6, 7].

Найбільш близьким за протигрипозною дією є препарат таміфлю (прототип), який є органічною сполукою, що не містить іону металу. Недоліком цього препарату є ціла низка побічних дій (печінкова недостатність, екзема, бронхоспазм, токсичний епідермальний некроліз, носова кровотеча та ін.), що обумовлені його підвищеною токсичністю.

В основу корисної моделі поставлена задача створення сполуки з низькою токсичністю та вираженою противірусною активністю. Поставлена задача вирішується аргентум біс(цитрато)германатом з протигрипозною активністю, який є координаційним полімером з різними металами і карбоксилатним лігандом та відрізняється наявністю в молекулі двох біометалів (германій, аргентум) і біологічно активного ліганду (лимонна кислота) з формулою  $\{[Ag_2Ge(HCitr)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O\}_n$  і будовою:



Поставлена задача вирішується тим, що одержання аргентум біс(цитрато)германату здійснюється наступним чином: до суміші наважок 1.046 г (0.01 моль) діоксиду германію  $\text{GeO}_2$  (99.999 %, Aldrich) і 4.2 г (0.02 моль) моногідрату лимонної кислоти  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (99 %, Aldrich) додають 400 мл води, кип'ятять до повного розчинення реагентів і упарюють на водяній бані до об'єму 25 мл (~ 4 години, 80 °C). Потім в охолоджений до кімнатної температури розчин при постійному перемішуванні вносять 3.4 г (0.02 моль) аргентум нітрату  $\text{AgNO}_3$ . Осад білого кольору, що випав через три доби відокремлюють на фільтрі Шотта, промивають холодною водою і сушать на повітрі при 20-25 °C. Вихід продукту 60 %.

Ідентифікацію та дослідження фізико-хімічних властивостей аргентум біс(цитрато)германату проводили на кафедрі загальної хімії та полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова. Вміст металів визначали методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою на приладі Optima 2000 DV фірми Perkin Elmer, карбону та гідрогену - за допомогою напівавтоматичного C, N, H-аналізатора.

Знайдено, %: C 19.44; H 2.39; Ge 9.80; Ag 29.33.

Для  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{18}\text{Ag}_2\text{Ge}$  розраховано, %: C 19.50; H 2.44; Ge 9.83; Ag 29.25.

ІЧ спектр поглинання ( $400\text{-}4000\text{ см}^{-1}$ ) комплексу у вигляді таблеток з KBr записували на спектрофотометрі Frontier фірми Perkin Elmer. ІЧ-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3442  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ , 1702  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1681, 1598  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , 1644  $\delta(\text{H}_2\text{O})$ , 1450, 1404  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , 662, 628, 588  $\nu(\text{Ge}-\text{O})$ .

В ІЧ-спектрі комплексу спостерігали інтенсивні смуги  $\nu(\text{H}_2\text{O})$  і  $\delta(\text{H}_2\text{O})$ , що узгоджується з присутністю в його складі відповідно кристалізаційних і координованих молекул води. Зсув смуги  $\delta(\text{C}=\text{O})=1702\text{ см}^{-1}$  в спектрі комплексу в порівнянні зі спектром молекули ліганду ( $1720\text{ см}^{-1}$ ), а також поява смуг асиметричних і симетричних валентних коливань карбоксилатних іонів, свідчили про те, що всі  $\text{COOH}$  і  $\text{COO}^-$  групи координовані германієм та аргентумом. Наявність в молекулі комплексу моно- і бідентатно зв'язаних карбоксилатних груп також знайшло відображення в його ІЧ-спектрі: розраховано два значення  $\Delta\nu=\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-) = 277$  і  $148\text{ см}^{-1}$ .

Процедурі визначення рівня противірусної активності щодо вірусів грипу людини та птахів передувало визначення рівня токсичності аргентум біс(цитрато)германату за допомогою інфузорій *Colpoda steinii* (виробник ООО "Відродження М", м. Одеса), оскільки у цьому випадку визначається можливий рівень токсичності водночас як на клітинному, так і на рівні цілого організму. Після визначення нетоксичної дози препарату на культурі інфузорій *Colpoda steinii*, токсичність цієї концентрації аргентум біс(цитрато)германату досліджували на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів та з використанням культури клітин MDCK [8]. За мінімальну токсичну дозу аргентум біс(цитрато)германату на культурі тканин ХАО приймали найменшу концентрацію сполуки, що викликала загибель 50 та більше відсотків фрагментів ХАО. За максимально переносиму концентрацію (МПК) сполуки на культурі клітин MDCK приймали її найбільшу кількість, яка не викликала цитопатичної дегенерації клітин.

Протигрипозну активність аргентум біс(цитрато)германату досліджували у відношенні до штамів вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) і А/PR/8/34 (H1N1), а також вірусу грипу птахів H5N3, з використанням культури тканини ХАО, оскільки цю культуру можна вважати найбільш наближеною до рівня цілого організму, яким є курячий ембріон. Крім того, використання культури тканини ХАО є більш економічним методом у порівнянні з використанням курячих ембріонів для визначення противірусної дії препаратів.

Аргентум біс(цитрато)германат розчиняли у глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі. Після доведення рН розчину до фізіологічного значення рН 7,2-7,4 визначали протигрипозну активність препарату. Вірус-вміщуючу рідину, з попередньо визначеним інфекційним титром, розводили у глюкозо-желатиновому середовищі, що містила (дослід) або не містила досліджувану сполуку (контроль). Фрагменти ХАО, прикріплені до шкаралупи та розміщені у лунках полістиролових панелей, інфікували розведеннями вірус-вміщуючої рідини

на глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі ХАО не нижче за 100 ТІД<sub>50</sub> (доза, яка викликає інфікування 50 та більше відсотків фрагментів тканини ХАО).

Після 24 годин термостатування при 37 °С контрольні та дослідні зразки окремо поєднувались, і в них визначали титр інфекційного вірусу. Тобто, визначали найбільше розведення вірус-вміщуючої рідини, при якому відбувається репродукція вірусу. З цієї метою десятикратними розведеннями цих зразків інфікували фрагменти ХАО, розміщені в лунках полістиролових панелей. Панелі розташовували в термостаті при 37 °С. Після 48 годин термостатування наявність вірусу в лунках визначали за результатами реакції гемаглютинації (РГА) [9].

Оцінку противірусної активності аргентум біс(цитрато)германату з використанням методу гальмування розвитку вірус-індукованого цитопатичного ефекту проводили відповідно до загально прийнятої методики [9]. Моношарову культуру клітин MDCK, яку вирощували на протязі 24 годин у 96-лункових планшетах, двічі відмивали від ростового середовища розчином Хенкса. В лунки вносили серійні десятикратні розведення вірус-вміщуючої рідини на підтримуючому середовищі, яке містило (дослід) або не містило (контроль) досліджувану сполуку. Оцінку противірусної активності проводили через 48 годин за РГА.

Розрахунок ТІД<sub>50</sub> в експериментах in vitro проводили за методом Кербера в модифікації І.П. Ашмаріна за формулою [10]:

$$\lg TID_{50} = L - d(S - 0,5),$$

де L - початкове розведення у досліді;

d - різниця між послідовними lg розведень;

S - сума пропорцій тест-об'єктів, які дали позитивний результат.

Максимальна переносима концентрація аргентум біс(цитрато)германату на культурі інфузорій *Colpoda steinii* була 738 мкг/мл. На тканинній культурі ХАО та культурі клітин MDCK сполука проявляла токсичну дію у концентраціях 738 мкг/мл та 73,8 мкг/мл відповідно. Тому для визначення протигрипозної активності сполуки у відношенні штамів вірусу грипу людини А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) та вірусу грипу птахів H5N3 на культурі тканини ХАО була відібрана доза 36,9 мкг/мл. Результати досліджень у порівнянні з протигрипозною дією референс-препарату таміфлю (фірма виробник Хоффманн-Ля Рош (Швейцарія), міжнародна назва - осельтамівір) (табл. 1).

Таблица 1

Препарат	Молярна маса, г/моль	Діюча доза, мкг/мл (відповідно в моль/л)	Пригнічення репродукції вірусу (в lg)		
			H3N2	H1N1	H5N3
аргентум біс(цитрато)германат $\{[Ag_2Ge(HCitr)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O\}_n$	738,6	36,9 мкг/мл ( $5 \times 10^{-5}$ М)	0,83	2,92	2,42
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410,0	410,0 мкг/мл ( $1 \times 10^{-3}$ М)	4,17	4,17	3,75

Результати дослідження свідчать про те, що сполука у концентрації 36,9 мкг/мл пригнічувала репродукцію штаму вірусу грипу людини А/Гонконг/1/68 (H3N2) на культурі тканини ХАО незначною мірою на 0,83 lg ТІД<sub>50</sub>. Тоді як референс-препарат (Таміфлю) в кінцевій концентрації 410 мкг/мл пригнічував репродукцію вірусу повністю на 4,17 lg ТІД<sub>50</sub>.

У відношенні штаму вірусу грипу людини А/PR/8/34 (H1N1) аргентум біс(цитрато)германат у тій же концентрації 36,9 мкг/мл статистично достовірно у порівнянні з контролем пригнічував репродукцію на 2,92 lg ТІД<sub>50</sub>. При цьому референс-препарат (таміфлю) у кінцевій концентрації 410 мкг/мл пригнічував репродукцію вірусу повністю на 4,17 lg ТІД<sub>50</sub>. Тобто, у концентрації в десять разів нижче, ніж у референс-препарату, аргентум біс(цитрато)германат проявляв антивірусну активність у два рази нижче.

У тій же концентрації 36,9 мкг/мл у відношенні штаму пташиного грипу H5N3 отримані результати (табл. 1), які демонструють, що аргентум біс(цитрато)германат статистично достовірно у порівнянні з контролем пригнічував репродукцію на 2,42 lg ТІД<sub>50</sub>. При цьому референс-препарат (таміфлю) у кінцевій концентрації 410 мкг/мл пригнічував репродукцію вірусу повністю на 3,75 lg ТІД<sub>50</sub>. Слід зазначити, що у концентрації в десять разів нижче, ніж у референс-препарату, досліджувана комплексна сполука проявляла протигрипозну активність на 1,33 lg ТІД<sub>50</sub> нижче.

Аналогічним чином аргентум біс(цитрато)германат діяв і на моделі клітинної культури (MDCK). Оскільки його МПК на цій моделі була нижчою (73,8 мкг/мл), протигрипозну дію речовини вивчали у концентрації 36,9 мкг/мл (табл. 2).

Репродукція вірусу грипу людини штаму А/Гонконг/1/68 (H3N2) пригнічувалась під впливом аргентум біс(цитрато)германату на 3,9 lg TID<sub>50</sub> проти дії референс-препарату, яка складала 4,33 lg TID<sub>50</sub>. У відношенні штаму А/PR/8/34 (H1N1) інгібування репродукції було дещо нижчим і складало 1,2 lg TID<sub>50</sub> проти дії референс-препарату, а саме 3,33 lg TID<sub>50</sub>. Але в обох випадках гальмування репродукції було статично значущим.

Таблиця 2

Препарат	Молярна маса, г/моль	Максимальна нетоксична доза препарату на MDCK	Діюча доза препарату	Пригнічення репродукції вірусу H3N2B Ig	Пригнічення репродукції вірусу H1N1 Big
аргентум біс(цитрато)германат {[Ag <sub>2</sub> Ge(HCitr) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]}·2H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	738,6	73,8 мкг/мл (10 <sup>-4</sup> М)	36,9 мкг/мл (5×10 <sup>-5</sup> М)	3,9	1,2
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл (1×10 <sup>-3</sup> М)	205 мкг/мл (0,5×10 <sup>-3</sup> М)	4,33	3,33

Таким чином, у порівнянні з прототипом, заявлений препарат - аргентум біс(цитрато)германат виявляє виражену противірусну активність у відношенні вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), а також вірусу грипу птахів H5N3 на обох застосованих моделях. Слід зазначити, що його ефективна доза в 5-10 разів нижча, ніж референс-препарату таміфлю. Це дає перспективу для подальшого дослідження цієї речовини на тваринних моделях та з метою подальшого впровадження в медичну практику.

Джерела інформації:

1. Шкиль Н.А. Антимикробные свойства, фармакотоксикологические характеристики и терапевтическая эффективность препарата арговит при желудочно-кишечных болезнях телят / Н.А. Шкиль, В.А. Бурмистров, М.Ю. Соколов // Научный журнал КубГАУ. - 2011. - № 68(04).

2. Менчиков Л.Г. Биологическая активность органических соединений германия (обзор) / Л.Г. Менчиков, М.А. Игнатенко // Химико-фармацевтический журнал. - 2012. - Т. 46, № 11. - с. 3-6.

3. Kilbourne E. Influenza Pandemic of the 20th Century [Text] / E.Kilbourne // Emerging Inf. Dis. - 2006. - Vol. 12. - № 1. - P. 9-14.

4. Weekly Epidemiological Report N211, April 2009 [electronic resource] -Access mode: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru/index.html>.

5. WHO (2010 February) WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses. [Electron resource].

Access mode: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_use\\_antivirals](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals) 20090820/en/index.html.

6. Gubareva LV, Hayden FG. M2 and neuraminidase inhibitors: anti-influenza activity, mechanisms of resistance and clinical effectiveness. In: Kawaoka Y, editor. Influenza virology: current topics. Wymondham, United Kingdom: Caister Press. - 2006. - P. 169-202.

7. Center of Disease Control and Prevention. Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis-North Carolina, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2009. - Vol. 58. - P. 969-72.

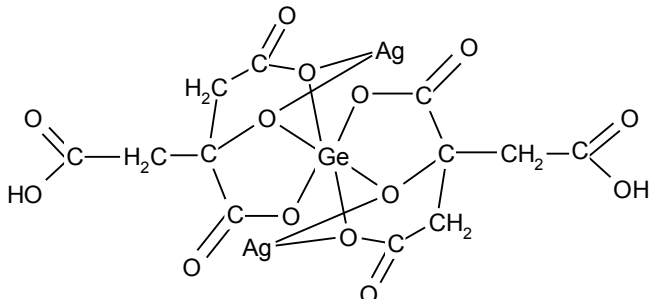
8. Пат. 15629 А Україна, МПК G01N 33/15, C12Q 1/18. Спосіб оцінки ступеня цитотоксичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів / Лозицький В.П., Григорашева І.М., Федчук А.С. [та ін.]; заявник-патентоутримувач Український наук. - досл. Протичумний ін.-т, ТОВ "Відродження М". - № u200512542; заявл. 26.12.05; опубл. 17.07.06, Бюл. № 7.

9. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. Рекомендации / под. ред. чл.-кор. АМН Украины А.В. Стефанова - К.: Авіцена, 2002. - 567 с.

10. Ашмарин И.П. Вычисление ЕД<sub>50</sub> при малом числе подопытных животных / И.П. Ашмарин // Ж. микробиол. - 1959. - № 2. - С. 102-108.

# ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Аргентум біс(цитрато)германат з протигрипозною активністю, як координаційний полімер з різними металами і карбоксилатним лігандом, який **відрізняється** тим, що в молекулі містить два біометали (германій, аргентум) і біологічно активний ліганд (лимонна кислота) з формулою  $\{[Ag_2Ge(HCitr)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O\}_n$  і будовою:



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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