



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93994** (13) **U**  
(51) МПК

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/32** (2006.01)

**A61K 31/295** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

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

(21) Номер заявки: **u 2014 04695**

(22) Дата подання заявки: **05.05.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **27.10.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **27.10.2014, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):

**Годован Владлена Володимирівна (UA),  
Матюшкіна Марина Володимирівна (UA),  
Сейфулліна Інна Йосипівна (UA),  
Гридіна Тетяна Леонідівна (UA),  
Марцинко Олена Едуардівна (UA),  
Мудрик Любов Михайлівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ,  
пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA),  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "УКРАЇНСЬКИЙ  
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ  
ІНСТИТУТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНІКОВА" МОЗ  
УКРАЇНИ,  
вул. Церковна, 2/4, м. Одеса, 65003 (UA),  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА,  
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)**

**(54) КОБАЛЬТ БІС(ЦИТРАТО)ГЕРМАНАТ - ПРОТИГРИПОЗНИЙ ЗАСІБ**

(57) Реферат:

Кобальт біс(цитрато)германат, який має протигрипозну дію.

**UA 93994 U**



Корисна модель належить до біологічно активних речовин (БАР), а саме - кобальт біс(цитрато)германату, яка виявляє протигрипозну активність і може застосовуватись в медицині.

Грип є найбільш масовою інфекцією серед тих, що представляють значну соціально-економічну проблему в міжнародному масштабі. Найважливішими його характеристиками є епідемічна природа та висока смертність в умовах пандемії. Незважаючи на успіхи, досягнуті в області хіміотерапії та вакцинопрофілактики грипу, він залишається важко контрольованою інфекцією внаслідок високої генетичної мінливості і різних довготривалих ускладнень після гострої стадії хвороби. Нові віруси грипу, що з'явилися в людській популяції в останні роки, є небезпечним патогеном людини.

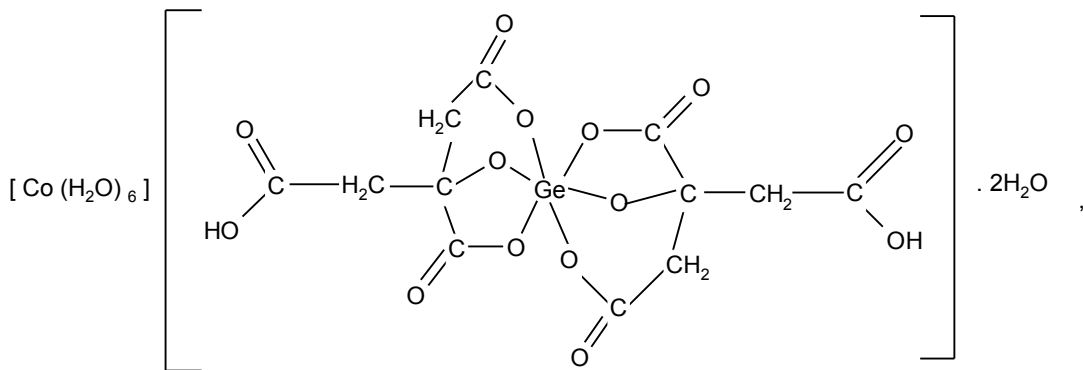
На сьогодні, за рекомендаціями ВООЗ, протигрипозними препаратами першого ряду, ефективними по відношенню до штамів вірусів грипу А, є похідні адамантанового ряду (амантадин, ремантадин). Препаратами другого ряду, ефективними у відношенні вірусів грипу А та В, вважаються інгібітори нейрамінідази (занамівір, озельтамівір) [1]. На жаль, переважна більшість людських ізолятів вірусів грипу набувають стійкості до дії найбільш розповсюджених протигрипозних препаратів - ремантадину, озельтамівіру [2, 3]. У дослідженнях 2013 року, оприлюднених в он-лайн журналі "mBio", наведені результати, які свідчать про те, що ізолят штаму вірусу H7N9, виділений від першого хворого на грип з підтвердженим діагнозом, містить змішану популяцію. Приблизно 35 % віріонів несуть у собі мутацію R292K, яка робить їх нечутливими до інгібіторів нейрамінідази, 65 % віріонів чутливі до цих препаратів. Використання інгібіторів нейрамінідази для лікування пацієнта, інфікованого стійким штамом грипу H7N9, тільки сприяє розмноженню штаму, тобто до посилення розповсюдження саме стійкого штаму.

Вказано про те, що пошук нових противірусних засобів серед сполук з різними структурними характеристиками є вкрай актуальним. В цьому плані особливу увагу привертають координаційні сполуки металів з біолігандами. Значна частина з них проявляє фармакологічну активність по відношенню до бактерій, що підтверджує перспективність їх використання у медицині [4]. Є всі підстави вважати, що завдяки особливостям структури металокомплексів, просторового розташування функціональних груп, розмірам та іншим характеристикам, вони можуть діяти на вірус різними шляхами: інактивувати вірус, зайнявши на його поверхні активні центри; проникати через клітинну мембрану; перешкоджати розмноженню вірусу в клітині; руйнувати вірус поза клітиною.

Найбільш близьким до заявленого технічного рішення є референс-препарат таміфлю, який містить озельтамівір у вигляді озельтамівіру фосфату та має протигрипозну дію [1]. Однак вказаний препарат є токсичним, виявляє гепатотоксичну (гепатит), нейротоксичну (судоми, делірій, галюцинації) дію, викликає токсичний епідермальний некроліз, анафілактичні та анафілактоїдні реакції тощо.

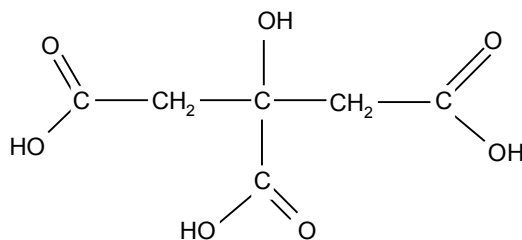
В основу корисної моделі поставлена задача створення нової низькотоксичної різнометальної сполуки кобальту(II)-германію(IV) з лимонною кислотою, що має протигрипозну активність і усуває недоліки існуючих засобів для тієї ж мети.

Поставлена задача вирішується тим, що згідно з корисною моделлю, розроблена нова протигрипозна речовина, а саме кобальт біс(цитрато)германату



яка має протигрипозну дію.

Як вихідні речовини для синтезу сполуки використовували діоксид германію  $\text{GeO}_2$  "ос.ч", ацетат кобальту(II)  $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  "ч.д.а." та лимонну кислоту ( $\text{H}_4\text{Cit}$ ) "ч.ч.":



Синтез кобальт біс(цитрато)германату  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Ge}(\text{HCitr})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  проводили за наступною методикою: в 400 мл гарячої (90 °С) води розчиняли наважки 1,046 г (0,01 моль)  $\text{GeO}_2$  і 4,2 г (0,02 моль) лимонної кислоти, розчин упарювали до об'єму 100 мл (~ 2 год.), охолоджували, додавали 2,49 г (0,01 моль)  $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  при постійному перемішуванні до повного розчинення наважки солі. Отриманий розчин залишали для кристалізації при кімнатній температурі. Через 1-2 доби з розчину випадав рожевий осад координаційної сполуки  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Ge}(\text{HCitr})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , який промивали холодною водою та висушували при температурі 20 °С. Вихід продукту 80 %.

Елементний аналіз сполуки виконаний на напіваавтоматичному C,N,H-аналізаторі [5]. Вміст германію та кобальту при спільній присутності визначали методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою на приладі Optima 2000DV фірми Perkin Elmer, ІЧ спектри поглинання (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) ліганду і комплексу записували на спектрофотометрі Frontier фірми Perkin Elmer [7-9]. Рентгеноструктурний аналіз (PCA) проводили на автоматичному дифрактометрі Bruker SMART APEX II.

За результатами елементного аналізу (обчислено/знайдено%: Ge - 10,53/10,49, Co - 8,54/8,59, C - 20,87/20,93, H - 4,35/4,31) отриманому комплексу відповідає брутто-формула  $\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{O}_{24}\text{GeCo}$ , у комплексі реалізується мольне співвідношення Ge:цитрат: Co=1:2:1. Сполука стійка на повітрі.

Термічний розклад комплексу має складний ступінчастий характер. На першому етапі в інтервалі 60-240 °С спостерігається ендотермічний ефект, пов'язаний з видаленням 10 молекул кристалізаційної та координованої води. Подальший термоліз (після 260 °С) супроводжується чотирма екзоефектами, при яких відбувається декарбоксилювання та подальша окисна термодеструкція. Кінцевими продуктами глибокого термічного розпаду (1000 °С) є суміш оксидів металів, що входять до складу заявленого препарату.

В ІЧ-спектрі комплексу наявні смуги  $\nu(\text{C}=\text{O})=1706 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})=255 \text{ cm}^{-1}$ , дві  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  (1672; 1599  $\text{cm}^{-1}$ ) і дві  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  (1420; 1360  $\text{cm}^{-1}$ ), дві  $\nu(\text{Ge}-\text{O})=670, 634 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta(\text{H}_2\text{O})=1639 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho(\text{H}_2\text{O})=730 \text{ cm}^{-1}$  та  $\omega(\text{H}_2\text{O})=470 \text{ cm}^{-1}$  коливань, які є характерними для гексааквакомплексів 3d-металів, а також  $\nu(\text{C}-\text{O})$  (1072  $\text{cm}^{-1}$ ) алкогольного типу [5] (при відсутності деформаційних коливань C-OH).

За результатами PCA [5], сполука побудована з центросиметричних октаедричних катіонів  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , аніонів  $[\text{Ge}(\text{HCitr})_2]^{2-}$  та кристалізаційних молекул води. У кристалах комплексні катіони і аніони об'єднані безпосередньо між собою і через кристалізаційні молекули води водневими зв'язками в тривимірний каркас.

Визначена гостра токсичність нової сполуки у щурів при пероральному прийомі,  $\text{LD}_{50}=1748,86 \text{ мг/кг}$ . Відповідно до класифікації і загальних вимог безпеки, вона належить до малотоксичних (IV клас) [6].

Токсичність БАР також визначали за її впливом на життєдіяльність культури інфузорій *Colpoda steinii* виробництва підприємства "Відродження-М". Критерієм визначення токсичності був час від початку дії досліджуваного зразку на культуру інфузорій *Colpoda steinii* до загибелі більшості (90 % і більше) інфузорій, яка констатується на підставі повного припинення руху інфузорій та наявності їх розпаду. У контрольній пробі всі інфузорії повинні залишатися рухливими.

Крім того, проводили визначення токсичності досліджуваної сполуки на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів. Розведення БАР на глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі вносили до лунок полістиролових панелей, де розміщували фрагменти хоріон-алантоїсних оболонок на шкаралупі, використовуючи по 4 лунки на одне розведення. Контролем були лунки, що містили фрагменти хоріон-алантоїсних оболонок на шкаралупі і глюкозо-желатинове підтримуюче середовище. Панелі розміщували в термостаті при 37 °С та перевіряли стан клітинного шару протягом 48 год., відмічаючи наявність чи відсутність дегенерації клітин ХАО візуально. Мінімальною токсичною дозою була найменша концентрація БАР, що викликала загибель 50 та більше відсотків фрагментів ХАО.

Протигрипозну активність досліджуваної сполуки *in vitro* вивчали по відношенню до штамів вірусу грипу людини А/Гонконг/1/68 (H3N2) і А/PR/8/34 (H1N1), а також вірусу грипу птахів H5N3. Використовували культуру тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-12 добових курячих ембріонів, оскільки цю культуру можна вважати найбільш наближеною до рівня цілого організму, яким є курячий ембріон. Використання культури тканини ХАО є більш економічним методом у порівнянні з використанням курячих ембріонів для визначення протівірусної дії препаратів.

Вплив БАР на репродукцію вірусів грипу досліджували, розчиняючи його у глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі. Після доведення рН розчинів до фізіологічного значення рН 7,2-7,4 визначали протигрипозну активність сполуки. Вірусомісну рідину (ВВР) з попередньо визначеним інфекційним титром розводили у глюкозо-желатиновому середовищі, який містив (дослід) або не містив (контроль) досліджувану БАР. Для інфікування фрагментів хоріон-алантоїсних оболонок, прикріплених до шкаралупи та розміщених у лунках полістиролових панелей, використовували розведення ВВР на глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі ХАО не нижче за 100 ТІД<sub>50</sub> (дози, яка викликає інфікування 50 та більше відсотків фрагментів тканини ХАО). Після термостатування протягом 24 год. при 37 °С контрольні та дослідні зразки окремо поєднувались і в них визначали титр інфекційного вірусу.

Титрування вірусу грипу після впливу на нього досліджуваної сполуки проводили в культурі тканини ХАО, визначаючи найбільше розведення ВВР, при якому відбувається репродукція вірусу. Тобто, десятикратними розведеннями цих зразків інфікували фрагменти ХАО, розміщені в лунках полістиролових панелей. Полістиролові панелі розміщували в термостаті при 37 °С. Після 48 год. термостатування визначали наявність вірусу в лунках за результатами реакції гемаглютинації (РГА).

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

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

де L - початкове розведення у досліді;

d - різниця між послідовними lg розведень;

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

При дослідженні максимальної переносимої концентрації (МПК) кобальт біс(цитрато)германату на культурі інфузорій *Colpoda steinii* та тканинній культурі ХАО виявлено, що показник для цих моделей становив 7 мг/мл. Тому для визначення протигрипозної активності нової БАР відносно штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО були відібрані наступні концентрації: 6535 мкг/мл, 3270 мкг/мл, 1635 мкг/мл та 654 мкг/мл. Результати досліджень, а саме вплив препарату на репродукцію штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО, наведені в таблиці 1.

Крім того, в таблиці 1 наведені дані порівняння протигрипозної дії референс-препарату таміфлю фірми виробника Хоффманн-Ля Рош (Швейцарія), міжнародна назва - осельтамівір. Концентрація таміфлю складала 410 мкг/мл, що відповідає  $1 \times 10^{-3}$  М. Однак вказаний препарат виявляв токсичну дію на культурі інфузорій *Colpoda steinii* у концентрації 410 мкг/мл ( $1 \times 10^{-3}$  М), а на тканинній культурі ХАО - 1000 мкг/мл ( $0,25 \times 10^{-2}$  М). Тож максимально переносимі концентрації референс-препарату були значно нижчими, ніж МПК кобальт біс(цитрато)германату на цих моделях (7 мг/мл).

Таблиця 1

Речовини	Молярна маса, г/моль	Досліджувана концентрація, мкг/мл (відповідно в Молях)	Пригнічення репродукції вірусу H3N2 в lg
Кобальт біс(цитрато)германат [Co(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] [Ge(HCitr) <sub>2</sub> ]·4H <sub>2</sub> O	653,6	6535 мкг/мл ( $1 \times 10^{-2}$ М)	5,25
		3270 мкг/мл ( $5 \times 10^{-3}$ М)	5,17
		1635 мкг/мл ( $2,5 \times 10^{-3}$ М)	4,83
		654 мкг/мл ( $1 \times 10^{-3}$ М)	1,63
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл ( $1 \times 10^{-3}$ М)	4,17

Одержані результати досліджень свідчать, що нова БАР у концентраціях 6535 мкг/мл та 3270 мкг/мл повністю пригнічувала репродукцію штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО в порівнянні з контролем. У концентрації 1635 мкг/мл кобальт біс(цитрато)германат пригнічував репродукцію вірусу грипу навіть більше ніж референс-препарат (таміфлю) - 4,83 lg TID<sub>50</sub> проти 4,17 lg - відповідно. В концентрації 654 мкг/мл (1×10<sup>-3</sup> М), БАР також пригнічувала репродукцію вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО на 1,63 lg TID<sub>50</sub>.

Тому для визначення протівірусної активності кобальт біс(цитрато)германату по відношенню до штаму вірусу грипу А/PR/8/34 (H1N1) та вірусу грипу птахів H5N3 на тканинній культурі ХАО було відібрано концентрацію 654 мкг/мл (1×10<sup>-3</sup> М) (табл. 2). У цій концентрації нова сполука пригнічувала репродукцію штаму вірусу грипу А/PR/8/34 (H1N1) на 4,17 lg TID<sub>50</sub>, що дорівнює результату впливу на цей штам референс-препарату (таміфлю) у дозі 410 мкг/мл (1×10<sup>-3</sup> М). Пригнічувальна дія сполуки спостерігалась і по відношенню до вірусу грипу птахів H5N3 - 3,67 lg TID<sub>50</sub> проти 3,75 lg - відповідно. У таблиці 2 наданий вплив БАР на репродукцію вірусу грипу людини А/PR/8/34 (H1N1) та вірусу грипу птахів H5N3 на тканинній культурі ХАО.

Таблиця 2

Речовини	Молярна маса, г/моль	Досліджувана концентрація, мкг/мл (відповідно в Молях)	Пригнічення репродукції вірусу H1N1 в lg	Пригнічення репродукції вірусу H5N3 в lg
Кобальт біс(цитрато)германат [Co(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ][Ge(HCitr) <sub>2</sub> ]·4H <sub>2</sub> O	653,6	654 мкг/мл (1×10 <sup>-3</sup> М)	4,17	3,67
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл (1×10 <sup>-3</sup> М)	4,17	3,75

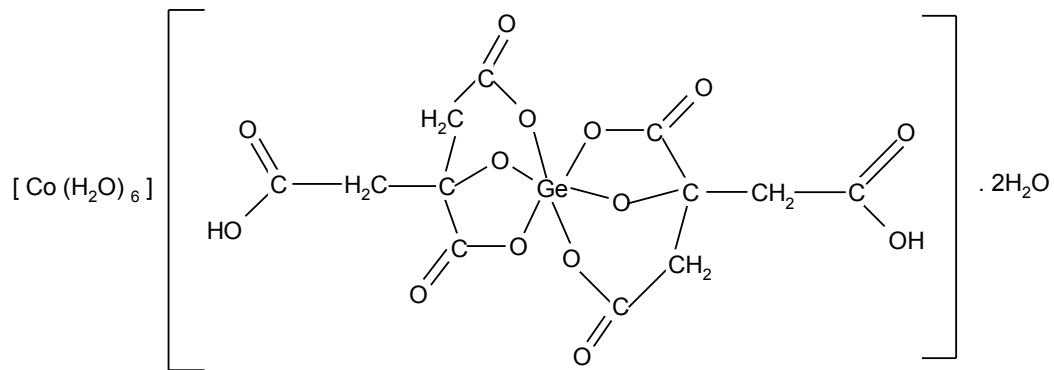
Таким чином, у порівнянні з найближчим аналогом, заявлене технічне рішення - новий вітчизняний засіб кобальт біс(цитрато)германат проявляє виразну протівірусну активність у відношенні вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), а також вірусу грипу птахів H5N3 на тканинній культурі ХАО. Крім того він виявляє значно меншу токсичність, що дає перспективу для подальшого дослідження та впровадження в медичну практику.

Джерела інформації:

1. 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\\_20090820/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html)
2. Bright R.A. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States / R.A. Bright, D. Shay, B. Shu [et al.] // Journal of the American Medical Association. 2006; vol. 295 (doi: 10.1001/jama.295.8.joc60020).
3. 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; 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; 58: 969-72.
4. Михасько Т.А., Дубовик Б.В., Шадыро О.И., Полозов Г.И. // Мед. новости. 2002. № 4. С. 81.
5. Марцинко Е.Э., Миначева Л.Х., Песарогло А.Г., Сейфуллина И.И. и др. Бис(цитрато)германаты двухвалентных 3d-металлов (Fe, Co, Ni, Cu, Zn). кристаллическая и молекулярная структура [Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>][Ge(HCit)<sub>2</sub>]·4H<sub>2</sub>O // Журн. неорган. химии. - 2011. - Т. 56, № 8. - С. 1247-1253.
6. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. Рекомендации/ под. ред. чл.-кор. АМН Украины А.В. Стефанова - К.: Авіцена, 2002 - 567 с.
7. 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-патентотримувач Український наук.-досл. Протичумний ін.-т, ТОВ "Відродження М". - № u200512542; заявл. 26.12.05; опубл. 17.07.06, Бюл. № 7.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Кобальт біс(цитрато)германат



5 який має протигрипозну дію.

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

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

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