



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98166** (13) **C2**
(51) МПК (2012.01)
C07D 293/00
C12Q 1/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 05332**
(22) Дата подання заявки: **30.04.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.04.2012**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.01.2011, Бюл.№ 2**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2012, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
**Кривов'яз Андрій Олександрович (UA),
Коваль Галина Миколаївна (UA),
Сливка Михайло Васильович (UA),
Лендел Василь Георгійович (UA)**

(73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД "УЖГОРОДСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ",
вул. Підгірна, 46, м. Ужгород, 88000 (UA)**

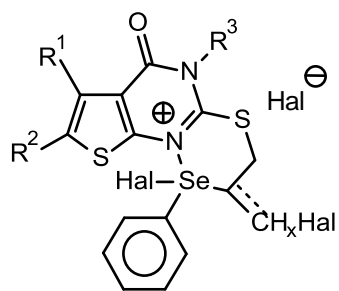
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Russo F., Santagati N.A., Venturini R., Spampinato S. Synthesis and pharmacological activity of 2-alkylthiosubstituted thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ones and 5H-pyrimido[5,4-6]indol-4-one. // Farmazie. - 1990 - Bd. 45. - № 7. - S. 493-495.
Хрипак С.М., Якубец В.И., Мигалина Ю.В., Козьмин А.С., Зефиоров Н.С. Тиазоло (оксазоло) тиено[b]пиримидины: получение из 2-аллилтио-(окси)тиено[2,3-d]пиримидинов и гидролиз. // ХГС. - 1989. - № 3. - с. 413-418.
Авдеева Л.В., Овруцкий В.М., Козлов С.Н. та співав. Скринінг антимікробної активності нових хімічних сполук. Актуальные проблемы медицины и биологии. 2000 г., № 2, с. 298-302.
Sharga B.M., Chapesh A.V., Tindik L.M., Slivka M.V., Plesha M.V., Nikolaychuk V.I., Maga I.M., Chripak S.M. Study of new organic compounds, the derivatives of thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ones and 1,3-thiazolin-4-one for antimicrobial activity against microbes isolated from man, animals and plants and against halobacteria. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія. - В. 22. - 2008. - с. 99-103.

(54) ЗАСТОСУВАННЯ СОЛІ ТІЕНО[3',2':5,6]ПІРИМІДИНО[2,1-b][1,4,3]ТІАСЕЛЕНАЗИН-12-ІО ЯК БАКТЕРИЦИДНОГО АГЕНТА

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування солей тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-іо, загальної формули (I):

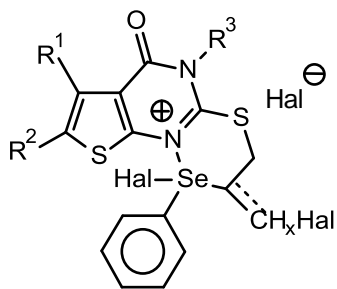
UA 98166 C2



I

для створення нових засобів дезінфекції та як антисептиків для боротьби з патогенними мікроорганізмами, збудниками госпітальних інфекцій.

Винахід стосується органічної хімії, а саме застосування солі тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію загальної формули (I):



I

в якій

$R^1, R^2 \in \text{CH}_3$ або $R^1 + R^2 = (\text{CH}_2)_4$;

$R^3 \in \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$;

$\text{Hal} \in \text{Cl}, \text{Br}$;

----- є одинарним або подвійним зв'язком;

x дорівнює 1 або 2,

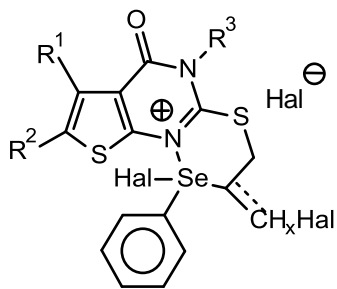
яка демонструє бактерицидну та бактериостатичну активність по відношенню до грампозитивних й грамнегативних мікроорганізмів.

Відомі бактерицидні речовини, які містять в своєму складі фрагмент тієнопіримідину, але вони характеризуються складним багатостадійним синтезом й помірною антимікробною активністю [1, 2].

Найбільш близькими за технічною суттю до сполук, що заявляються, є калієві й натрієві солі 2-меркапто-4-оксотієно[2,3-d]піримідину, які характеризуються низькою токсичністю і які проявляють високу бактерицидну й бактериостатичну активність [3]. Ці солі характеризуються простотою синтезу, низькою токсичністю і є активними лише по відношенню до грампозитивних мікроорганізмів, тобто вони не виявляють антимікробну активність по відношенню до грамнегативних мікроорганізмів.

Задачею винаходу є створення речовин класу тієнопіримідину, а саме конденсованих селеновмісних тієнопіримідинів, які демонструють бактерицидну та бактериостатичну активність по відношенню до всіх прокаріотичних мікроорганізмів, а особливо збудників нозокоміальних госпітальних інфекцій.

Поставлена задача вирішується синтезом солі тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію загальної формули (I):



I

в якій

$R^1, R^2 \in \text{CH}_3$ або $R^1 + R^2 = (\text{CH}_2)_4$;

$R^3 \in \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$;

$\text{Hal} \in \text{Cl}, \text{Br}$;

----- є одинарним або подвійним зв'язком;

x дорівнює 1 або 2,

яка демонструє бактерицидну та бактериостатичну активність по відношенню до грампозитивних й грамнегативних мікроорганізмів, та застосування її як бактерицидного агента.

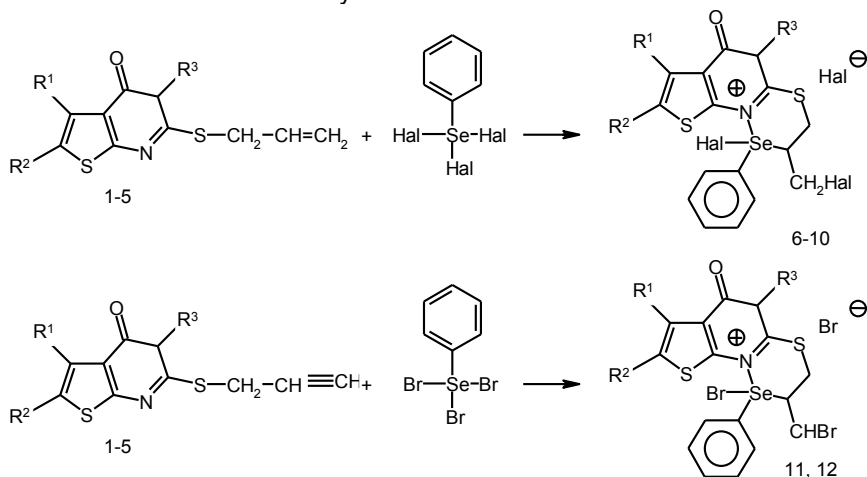
Суть винаходу досягається наступними прикладами:

Приклад 1

Загальна методика одержання похідних 1-галогено-2-галогенометил-1-феніл-6-оксотієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-10-ію галогенідів 6-12.

До розчину 0,015 моль тіоетеру (1-5) (синтез описано в роботі [4]) в 20 мл сухого хлороформу або оцтової кислоти, при перемішуванні, протягом 30 хвилин по краплях додають розчин 0,015 моль фенілселентригалогеніду в 25 мл хлороформу або оцтової кислоти. Перемішування продовжують 4 години при температурі 15-20 °С. Потім до розчину додають 30 мл безводного діетилового етеру. Утворений осад цільового продукту (6-12) відфільтровують, промивають діетиловим етером і сушать у вакуум-ексикаторі над фосфорним ангідридом протягом 2 діб.

Загальна схема синтезу.



$R^1=R^2=CH_3$; $R^1+R^2=(CH_2)_4$; $R^3=H, CH_3, C_6H_5$; $Hal=Cl, Br$.

Склад сполук (6-12) підтверджено даними елементного аналізу; будову доведено методом інфрачервоної спектроскопії (ІЧ) в таблетках калію броміду та методом спектроскопії протонного магнітного резонансу (ПМР) високого розрізнення (300 МГц).

1-Хлор-2-хлорметил-7,8-диметил-1,5-дифеніл-6-оксо-2,3,5,6-тетрагідротієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-10-ію хлорид (6)

Кристали білого кольору. Вихід 72 %, $T_{пл}$ 108-110°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1720. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 2,46 с (6H, 2CH₃, 12); 3,71, 4,12 (2д, 2H, CH₂, 10,5, 12,9); 4,42 (2д), 4,71 (м, 2H, CH₂, 12,6); 6,59 (м, 1H, CH); 7,39-7,95 (м, 10H, 10CH). Знайдено, %: C 46,62; H 3,51; N 4,63. $C_{23}H_{21}Cl_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 46,72; H 3,55; N 4,74.

1-Бром-2-бромметил-1,5-дифеніл-6-оксо-2,3,5,6,7,8,9,10-октагідробензо[*b*]тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію бромід (7)

Кристали жовтого кольору. Вихід 73 %, $T_{пл}$ 144-146°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1720. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 1,85 (м, 4H, 2CH₂); 2,87 (м, 4H, 2CH₂); 3,76, 4,05 (2д, 2H, CH₂); 4,31 (д), 4,85 (м, 2H, CH₂); 6,58 (м, 1H, CH); 7,36-7,85 (м, 10H, 10CH). Знайдено, %: C 39,80; H 2,98; N 3,61. $C_{25}H_{23}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 39,99; H 3,07; N 3,73.

1-Бром-2-бромметил-5,7,8-триметил-6-оксо-1-феніл-2,3,5,6-тетрагідротієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-10-ію бромід (8)

Кристали жовтого кольору. Вихід 70 %, $T_{пл}$ 126-128°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1715. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 2,44 (с, 6H, 2CH₃); 3,70 (с, 3H, CH₃); 3,95, 4,02 (д, 2H, CH₂); 4,26 (д), 5,03 (м, 2H, CH₂); 6,49 (м, 1H, CH); 7,28-7,84 (м, 5H, 5CH). Знайдено, %: C 32,54; H 2,68; N 4,10. $C_{18}H_{19}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 32,62; H 2,87; N 4,23.

1-Бром-2-бромметил-7,8-диметил-6-оксо-1-феніл-2,3,5,6-тетрагідротієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-10-ію бромід (9)

Кристали жовтого кольору. Вихід 64 %, $T_{пл}$ 198-200°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1720. Спектр ПМР в $DMCO-D_6$ (δ , м.ч., J, Гц): 2,37 (с, 6H, 2CH₃, 9,3); 3,64, 3,93 (2д, 2H, CH₂); 4,04 (м, 2H, CH₂); 5,47 (м, 1H, CH); 7,25-7,75 (м, 5H, 5CH). Знайдено, %: C 38,54; H 2,81; N 4,03. $C_{23}H_{21}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 38,11; H 2,90; N 3,87.

1-Бром-2-бромметил-6-оксо-1-феніл-2,3,5,6,7,8,9,10-октагідробензо[*b*]тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію бромід (10)

Кристали жовтого кольору. Вихід 72 %, $T_{пл}$ 122-124°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1720. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 1,89 (м, 4H, 2CH₂); 2,84 (м, 4H, 2CH₂); 3,88, 4,16 (2м, 2H, CH₂); 4,73 (м, 2H, CH₂); 5,72 (м, 1H, CH); 7,37 (м, 3H, 3CH); 7,85 (м, 2H, 2CH). Знайдено, %: C 33,60; H 2,66; N 4,05. $C_{19}H_{19}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 33,82; H 2,82; N 4,15.

1-Бром-2-[(Е)-1-бромметиліден]-7,8-диметил-6-оксо-1-феніл-2,3,5,6-тетрагідротієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-б][1,4,3]тіаселеназин-10-ію бромід (11)

Кристали жовтого кольору. Вихід 56 %, $T_{пл}$ 154-156°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1720. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 2,38 (с, 6H, $2CH_3$); 4,96 (ш.с, 2H, CH_2); 7,40 (с, 1H, =CHBr); 7,21-7,50 (м, 5H, 5CH). Знайдено, %: C 31,52; H 2,30; Br 37,09; N 4,29. $C_{17}H_{15}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 31,58; H 2,32; Br 37,15; N 4,33.

1-Бром-2-[(Е)-1-бромометиліден]-1,5-дифеніл-6-оксо-2,3,5,6,7,8,9,10-октагідробензо[б]тієно[3',2':5,6]піримідино[2,1-б][1,4,3]тіаселеназин-12-ію бромід (12)

Кристали жовтого кольору. Вихід 61 %, $T_{пл}$ 156-158°C (хлороформ). ІЧ-спектр (ν , cm^{-1}): 1730. Спектр ПМР в $CDCl_3$ (δ , м.ч., J, Гц): 1,86 (м, 4H, $2CH_2$); 2,76, 2,91 (м, 4H, $2CH_2$); 4,81 (ш.с, 2H, CH_2); 7,48 (с, 1H, =CHBr); 7,30-7,40 (м, 3H, 3CH); 7,60 (м, 5H, 5CH), 7,75 (м 2H, 2CH). Знайдено, %: C 40,05; H 2,76; Br 31,97; N 3,69. $C_{25}H_{21}Br_3N_2OS_2Se$. Розраховано, %: C 40,10; H 2,81; Br 32,08; N 3,74.

Для дослідження бактерицидної та бактеріостатичної активності синтезованих сполук (6-12) по відношенню до запатентованих музейних штамів грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, які зберігаються на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, з курсом інфекційних хвороб медичного факультету ДВНЗ УжНУ використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Sarcina flava*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922; *Bacillus subtilis* 934; *Klebsiella pneumoniae* 5056, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Candida albicans* ATCC 663-885, та 34 клінічні ізоляти з множинною стійкістю до антибіотиків, серед яких 9 належали до *Staphylococcus* spp., 17 - *Klebsiella* spp., 5 - *Escherichia coli*, 3 - *Pseudomonas aeruginosa*. Синьогнійну паличку культивували на м'ясо-пептонному агарі (МПА), для культивування кишкової палички застосовували середовище Ендо, грампозитивні кокові - на жовтково-яєчному агарі (ЖСА), кандиди вирощували на середовищі Сабуро [5].

Для визначення чутливості мікроорганізмів до нових синтезованих речовин використовували метод двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі, яке є оптимальним для росту тест-мікроорганізмів [6]. Під час дослідів ставили контроль середовища на стерильність, контроль розчинника. Досліди проводили у 3-х повторях, отримані результати обробляли математично.

Оптимальний час дії вказаної речовини за певних концентрацій визначали через 15 та 30 хвилин шляхом висіву на чашки Петрі з середовищем МПА, ЖСА, Сабуро чи Ендо за методом Yould [7]. Мікробне число (МЧ) визначали за числом колонієутворювальних одиниць (КУО/мл), тобто враховувалися всі бактерії, що вижили після такої обробки і виростили на чашці з агаром через 24 години інкубації при температурі 37°C за методом [5].

Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) сполук (6-12) щодо грампозитивних й грамнегативних мікроорганізмів визначали методом розведень в агаризованому середовищі. Мінімальною пригнічувальною концентрацією вважали ту найменшу концентрацію сполук в середовищі, за якої ріст мікроорганізмів на МПА був відсутній. Суспензії добових тест-культур готували у стерильному фізіологічному розчині NaCl концентрацією 10^9 кл/мл та в об'ємі 0,3 мл вносили у ямки реплікатора, після чого висівали паралельно на три чашки Петрі відповідно до схеми експерименту. Результати обраховували через 24 години культивування бактерій за температури 37°C. Як контроль використовували середовище МПА без додавання синтезованих сполук (6-12).

Результати порівняльної оцінки чутливості культур - представників грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів - представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Антимікробна активність сполук (6-12) щодо грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів (КУО)

Вид бактерій	Сполука						
	6	7	8	9	10	11	12
Грампозитивні мікроорганізми							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	27	17	260	12	38	8
<i>Staphylococcus albus</i>	0	5	0	185	18	12	1
<i>Sarcina flava</i>	0	4	0	6	2	6	7
<i>Candida albicans</i> ATCC 653-885	18	42	13	92	34	10	94
<i>Bacillus subtilis</i> 934	CP	CP	CP	CP	CP	410	375
Грамнегативні мікроорганізми							
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5056	7	CP	159	57	5	2	8
<i>Klebsiella oxytoca</i> A TCC 13182	0	CP	92	32	2	11	16
<i>Pseudom. aeruginosa</i> ATCC 27853	268	0	0	204	54	48	18
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21	CP	6	0	16	106	130

Примітка: у таблиці наведено зведені дані після висіву культури на 3-х чашках Петрі; концентрація сполук (6-12) складає 300 мкг/мл; Е - еталон порівняння - ДМСО; СР - суцільний ріст бактерій.

Як видно з таблиці 2, всі сполуки (6-12) виявили високий антимікробний ефект по відношенню до сапрофітних мікроорганізмів - *Sarcina flava*. Для грибка роду *Candida*, який є стійким навіть до антибіотиків III-IV покоління сполуки (6, 8, 11), виявили теж високу активність.

Сполуки (9, 12) проявили помірну бактерицидну дію, затримуючи ріст на одну добу і МЧ виявилось відповідно 92 й 94 колонієутворювальних одиниць в 1 мл. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - паличка синьо-зеленого гною, виявилась на 100 % чутливою до сполук (7, 8), бактериостатичну дію (МЧ 54) проявили також речовини (10, 11, 12), негативний результат відмічено при дії сполук (6, 9), де МЧ становило 268 та 204 колонієутворювальних одиниць в 1 мл. Речовина (7) виявилась нейтральною для росту і розмноження *Escherichia coli* ATCC 25922, сполука (9) повністю пригнітила ріст даних бактерій, а речовини (6, 8, 10) виявили високу бактерицидну дію. Капсульні бактерії роду *Klebsiella* виявилися стійкими до дії на них сполуки (7); високочутливими з МЧ відповідно 2 та 0, виявились речовини (6, 10) для *Klebsiella oxytoca* з МЧ 15 та 7. Для *Klebsiella pneumoniae* 5056 високу бактериостатичну дію також проявили речовини (11, 12). Для золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) високу бактерицидну дію проявили сполуки (6, 12), а для білого стафілокока (*Staphylococcus albus*) аналогічну дію проявили сполуки (6, 7, 8, 10). Речовина (9) виявила низьку антимікробну дію по відношенню до обох видів стафілококів. Споріві бактерії *Bacillus subtilis* 934 виявились зовсім нечутливими щодо даних концентрацій дослідних речовин. Як бачимо дія сполук (6-12) на різні штами є не однаковою за ступенем пригнічення життєдіяльності мікроорганізмів, але спостерігається загальна закономірність щодо дії даних речовин на збудників одного й того ж виду. Більшість з них має широкий спектр антимікробної активності, активно пригнічує ріст музейних штамів і клінічних ізолятів умовно патогенних мікроорганізмів з множинною стійкістю до антибіотиків. В результаті цього постає питання про розробку комплексних лікарських препаратів, адже в лікарнях дані мікроорганізми перебувають в основному в складі стійких мікробних ценозів, про що свідчать проведені нами дослідження.

Таким чином, позитивний ефект винаходу полягає в розширенні асортименту антимікробних препаратів, які демонструють високу активність по відношенню до прокаріотних мікроорганізмів, як музейних так і свіжовиділених штамів. Пропоновані сполуки можуть бути застосовані для створення нових засобів дезінфекції, як антисептики для боротьби з патогенними мікроорганізмами, збудниками госпітальних інфекцій.

Джерела інформації:

1. El-Feky S.A., Abd El-Samii Z.K., Jaeda M.I. Thieno[2,3-d]pyrimidines as potential antimicrobial agents. // Zhonghua Yaoxue Zazhi. - 1993. - Vol. 45. - № 1. - P. 15-20.

2. Russo F., Santagati N.A., Venturini R., Spampinato S. Synthesis and pharmacological activity of 2-alkylthiosubstituted thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ones and 5H-pyrimido[5,4-b]indol-4-one. // Pharmazie. - 1990 - Bd. 45. - № 7. - S. 493-495.

3. Sharga B.M., Chapesh A.V., Tindik L.M., Slivka M.V., Plesha M.V., Nikolaychuk V.I., Maga I.M., Chripak S.M. Study of new organic compounds, the derivatives of thieno[2,3-d]pyrimidin-4-ones and 1,3-thiazolin-4-one for antimicrobial activity against microbes isolated from man, animals and plants and against halobacteria. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія. - В. 22. - 2008. - с. 99-103. - Прототип.

4. Хрипак С.М., Якубец В.И., Мигалина Ю.В., Козьмин А.С., Зефилов Н.С. Тиазоло (оксазоло) тиено[б]пиримидины: получение из 2-аллилтио-(окси)тиено[2,3-д]пиримидинов и гидролиз. // ХГС. - 1989. - № 3. - с. 413-418.

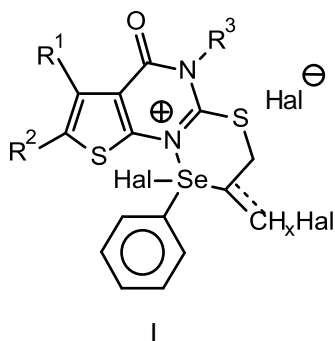
5. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. - М.: Медицина, 1982. - 264 с.

6. Авдеева Л.В., Овруцкий В.М., Козлов С.Н. та співав. Скринінг антимікробної активності нових хімічних сполук. Актуальные проблемы медицины и биологии. 2000 г., № 2, с. 298-302.

7. Yauld J.P. Quantity and anality in the diagnosis or ururory troot infection. // Brit. J. Urol. - 1965. - V. 37, № 1. - P. 7-12.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування солі тієно[3',2':5,6]піримидино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію загальної формули (I):



в якій

R¹, R² є CH₃ або R¹+R²=(CH₂)₄;

R³ є H, CH₃, C₆H₅;

Hal є Cl, Br;

----- є одинарним або подвійним зв'язком;

x дорівнює 1 або 2,

як бактерицидного та бактеріостатичного агента по відношенню до грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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