



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 95565

(13) U

(51) МПК

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/32 (2006.01)

A61K 31/295 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 08183

(22) Дата подання заявки: 21.07.2014

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: 25.12.2014(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 25.12.2014, Бюл.№ 24

(72) Винахідник(и):

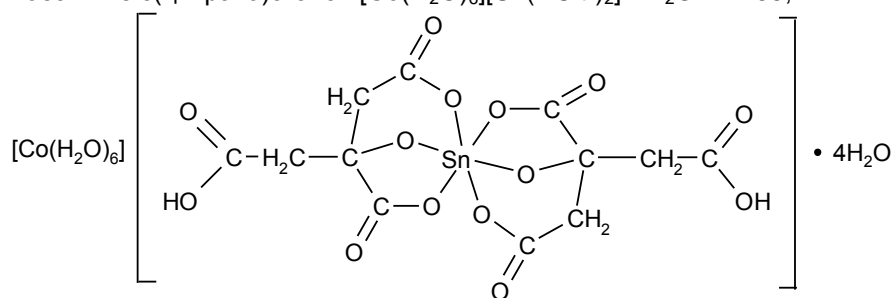
Годован Владлена Володимирівна (UA),
Матюшкіна Марина Володимирівна (UA),
Сейфулліна Інна Йосипівна (UA),
Гридіна Тетяна Леонідівна (UA),
Чебаненко Олена Анатоліївна (UA),
Федчук Ала Семенівна (UA)

(73) Власник(и):

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA),
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "УКРАЇНСЬКИЙ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ
ІНСТИТУТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА" МОЗ
УКРАЇНИ,
вул. Церковна, 2, м. Одеса, 65003 (UA),
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65026 (UA)

(54) КООРДИНАЦІЙНА СПОЛУКА КОБАЛЬТ БІС(ЦИТРАТО)СТАНАТ З ПРОТИГРИПОЗНОЮ ДІЄЮ

(57) Реферат:

Кобальт біс(цитрато)станат $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Sn}(\text{HCitr})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $M=735,7$ 

має протигрипозну дію.

UA 95565 U

Корисна модель належить до області медицини, а саме фармакології, і стосується кобальт біс(цитрато)станату, який має протигрипозну активність і може застосовуватися для лікування грипу.

Грип - гостра антропонозна вірусна інфекція дихальних шляхів, яка реєструється у всіх регіонах планети й проявляється у вигляді сезонних спалахів та епідемій [1]. Щорічні епідемії грипу та післягрипозні ускладнення призводять до загибелі значно більшої кількості людей, ніж від усіх відомих інфекційних захворювань, а також призводять до загострення хронічних захворювань [3]. Протягом 10-15 останніх років віруси грипу птахів в результаті мутацій змінили свої біологічні властивості та набули можливості безпосередньо інфікувати людей і викликати дуже тяжкі клінічні форми захворювання, значний відсоток яких закінчується летально [4]. Нові штами вірусів грипу птахів H5N1, H7N9 та свиней H1N1, які з'явилися в людській популяції, являються небезпечними патогенами для людини. Існує великий ризик виникнення пандемічного штаму вірусу грипу внаслідок реасортації циркулюючих штамів.

Переважає більшість людських ізолятів вірусів грипу швидко набувають стійкості до дії найбільш розповсюджених протигрипозних препаратів - ремантадину, озельтамівіру [5]. З метою запобігання формування резистентності слід не тільки поширювати арсенал протигрипозних засобів, але й застосовувати препарати з різним механізмом протівірусної дії.

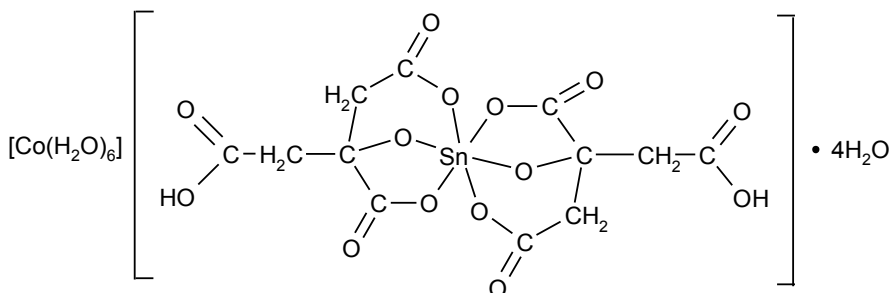
Тому пошук і розробка протівірусних засобів серед сполук з різними складом і структурними характеристиками є вкрай важливим завданням.

В даний час досить інтенсивно вивчаються властивості металокомплексів з метою виявлення їх біологічних властивостей для створення нових лікарських засобів. Більшість координаційних сполук з іонами металів проявляє фармакологічну активність щодо бактерій. Пошук металокомплексів, які будуть проявляти протівірусну активність, є актуальним, оскільки існує перспектива їх використання у медицині [6]. Є всі підстави вважати, що біологічна активність металокомплексів щодо вірусів реалізується завдяки особливостям складу, структури їх молекул, просторового розташування в них функціональних груп та іншим характеристикам. Металокомплекси 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 (озельтамівір), який належить до інгібіторів вірусного ферменту нейрамінідази та має протигрипозну дію [5]. Однак він є токсичним, викликає головні болі, безсоння, запаморочення, діарею, порушення функції нирок та психічні розлади. Крім цього є свідчення того, що прийом таміфлю в деяких випадках знижує здатність до вироблення власних антитіл до вірусу грипу.

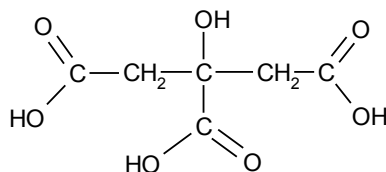
В основу корисної моделі поставлена задача створення нової низькотоксичної різнометальної сполуки кобальту біс(цитрато)станату, який має протигрипозну активність і усуває недоліки існуючих засобів для тієї ж мети.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з корисною моделлю, розроблена нова протигрипозна речовина, а саме кобальт біс(цитрато)станат формули $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Sn}(\text{HCitr})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $M=735,7$



який має протигрипозну активність.

Як вихідні речовини в роботі використовували: тетрахлорид стануму SnCl_4 "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 (H_4Citr) "ч.":



Синтез гетерометалічного кобальт біс(цитрато)станату: у 60 мл гарячої води розчиняли 0,03 моль (6,3 г) лимонної кислоти (вихідна концентрація ліганду повинна бути не менше 0,5 М), додавали 0,015 моль (1,73 мл) тетраклориду стануму і доводили рН розчином аміаку до 1. Отриманий розчин гріли протягом 10 хвилин при температурі 60-70 °С, охолоджували до кімнатної температури і додавали водний розчин $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в мольному співвідношенні Sn:Co=1:2. Через 2 доби випадав осад комплексу $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Sn}(\text{HCitr})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ рожевого кольору. Вихід продукту 65 %.

Нова сполука (порівняння з аналогами) більш активна та менш токсична, токсичність кобальту біс(цитрато)станату складає $\text{LD}_{50}=1836,76$ мг/кг при пероральному прийомі. Відповідно до класифікації і загальних вимог безпеки, сполука належить до малотоксичних (IV клас) [7].

Елементний аналіз сполуки виконаний на напівавтоматичному C, N, H-аналізаторі. Вміст стануму та кобальту визначали методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою на приладі "Optima 2000DV" фірми "Perkin Elmer". ІЧ спектри поглинання (400-4000 cm^{-1}) ліганду і комплексу записували на спектрофотометрі "Frontier" фірми "Perkin Elmer". Рентгеноструктурний аналіз (PCA) проводили на автоматичному дифрактометрі Bruker SMART APEX II.

За даними елементного аналізу (обчислено/знайдено %: Sn - 16,13/16,08, Co - 8,00/7,98, C - 19,56/19,52, H - 4,07/4,12), встановлено брутто-формулу сполуки $\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{O}_{24}\text{SnCo}$, в якій реалізується мольне співвідношення Sn:цитрат:Co=1:2:1.

При терморозкладі комплексу спочатку в інтервалі температур 70-230 °С відбувається дегідратація, після 260 °С - декарбоксилування, окисна деструкція сполуки і утворення кінцевого продукту - суміші CoO і SnO_2 (1000 °С).

Результати ІЧ-спектроскопії коригують з даними термогравіметрії. В них присутні смуги, що відповідають коливанням карбонілу і карбоксилатних іонів, характерних для нерівноцінних карбоксильних груп: вакантної $\nu(\text{C}=\text{O}) \sim 1722 \text{ cm}^{-1}$ і зв'язаних $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) = 1692, 1599 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-) = 1418, 1360 \text{ cm}^{-1}$. Зафіксовано також смуги коливань $\nu(\text{Sn}-\text{O}) = 550 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{Co}-\text{O}) = 499 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{C}-\text{O}) = 1078 \text{ cm}^{-1}$ та $5(\text{H}_2\text{O}) = 1639 \text{ cm}^{-1}$.

За даними PCA, сполука побудована з центросиметричних октаедричних катіонів $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, аніонів $[\text{Sn}(\text{HCitr})_2]^{2-}$ 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 [8].

Перед вивченням протівірусної активності кобальт біс(цитрато)станату визначали ступінь токсичності сполуки на клітинних моделях, на яких у подальшому планувалось дослідження специфічної дії проти вірусів грипу людини та птахів.

Для попередньої оцінки токсичності препарату використовували біотестування 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 [9]. Вказаний спосіб був запатентований як корисна модель для визначення ступеня цитотоксичності біологічно активних препаратів і фармакологічних сполук. Критерієм визначення токсичності є 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. В контрольній пробі всі інфузорії повинні залишатися рухливими.

Було визначено й рівень токсичності кобальт біс(цитрато)станату на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів. Готували розведення препарату на глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі, вносили їх 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, а також глюкозо-желатинове підтримуюче середовище. Панелі розміщували в термостаті при 37 °С та перевіряли стан клітинного шару протягом 48 годин, відмічаючи наявність чи відсутність дегенерації клітин ХАО візуально. Мінімальною токсичною дозою була найменша концентрація сполуки, що викликала загибель 50 та більше відсотків фрагментів ХАО.

Також визначали максимально переносиму концентрацію (МПК) кобальт біс(цитрато)станату з використанням культури клітин MDCK. В дослідях застосовували не менш десяти рядів лунок у плашках з культурою клітин для кожного розведення препарату в поживному середовищі. Плашки з культурами клітин інкубували при 37 °С з подачею 5 % CO₂ протягом 5 днів. Щодня

проводили вивчення дослідних та контрольних культур з метою встановлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД). За максимально переносиму концентрацію (МПК) сполуки приймали його найбільшу кількість, яка не викликала дегенерацію клітин.

Протигрипозну активність кобальт біс(цитрато)станату 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 хоріоанлантоїсних оболонок (ХАО) 11-12 добових курячих ембріонів, оскільки цю культуру можна вважати найбільш наближеною до рівня цілого організму, яким є курячий ембріон. Крім цього, використання культури тканини ХАО є більш економічним методом у порівнянні з використанням курячих ембріонів для визначення протівірусної дії препаратів.

Кобальт біс(цитрато)станат 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 ТІД₅₀ (доза, 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. Тобто, визначали найбільше розведення вірус-вміщуючої рідини, при якому відбувається репродукція вірусу. З цією 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).

Розрахунок ТІД₅₀ (доза, яка викликає інфікування 50 та більше відсотків фрагментів тканини ХАО) в експериментах *in vitro* проводили за методом Кербера в модифікації 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, які дали позитивний результат.

Оцінку протівірусної активності препарату з використанням методу гальмування розвитку вірус-індукованого цитопатичного ефекту проводили відповідно до загально прийнятої методики. Моношарову культуру клітин MDCK, яку вирощували протягом 24 год. у 96-лункових планшетах, двічі відмивали від ростового середовища фізіологічним розчином. В лунки вносили серійні десятикратні розведення вірус-вміщувальної рідини на підтримуючому середовищі, яке містило (дослід) або не містило (контроль) досліджувану сполуку. Оцінку протівірусної активності проводили через 48 год. за реакцією гемаглютинації з використанням курячих еритроцитів.

Виявлено, що максимальна переносима концентрація кобальту біс(цитрато)станату (МПК) на культурі інфузорій *Colpoda steinii*, тканинній культурі ХАО та культурі клітин MDCK була 7 мг/мл, 7 мг/мл та 368 мкг/мл, відповідно. Тому для визначення протигрипозної активності сполуки у відношенні штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО були відібрані наступні дози: 7000 мкг/мл, 3500 мкг/мл та 735 мкг/мл. Результати досліджень наведені в таблиці 1. Крім цього, в таблиці 1 наведені дані порівняння протигрипозної дії референс-препарата таміфлю фірми виробника Хоффманн-Ля Рош (Швейцарія), міжнародна назва - осельтамівір.

Таблиця 1

Речовини	Молярна маса, г/моль	Досліджувана концентрація, мкг/мл (відповідно в Молях)	Пригнічення репродукції вірусу H3N2 в lg
Кобальт біс(цитрато)станат [Co(H ₂ O) ₆][Sn(HCitr) ₂ ·4H ₂ O]	735	7000 мкг/мл (1×10^{-2} М)	4,33
		3500 мкг/мл ($0,5 \times 10^{-2}$ М)	2,5
		735 мкг/мл (1×10^{-3} М)	1,75
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл (1×10^{-3} М)	4,17

5 Результати дослідження свідчать про те, що сполука у концентрації 7000 мкг/мл повністю пригнічувала репродукцію штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканинній культурі ХАО в порівнянні з контролем. У концентраціях 3500 мкг/мл та 735 мкг/мл кобальт біс(цитрато)станат статистично значуще пригнічував репродукцію вірусу грипу - на 2,5 та 1,75 lg TID₅₀, відповідно. Референс-препарат (Таміфлю) в кінцевій концентрації 410 мкг/мл пригнічував репродукцію вірусу повністю на 4,17 lg TID₅₀.

10 Враховуючи отримані у відношенні штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H3N2) результати, були вибрані наступні концентрації для визначення антивірусної активності кобальт біс(цитрато)станату проти штаму вірусу грипу А/PR/8/34 (H1N1): 1750 мкг/мл, 184 мкг/мл, 410 мкг/мл. Наведені в таблиці 2 результати свідчать про те, що сполука у концентраціях 1750 мкг/мл та 184 мкг/мл значною мірою пригнічувала репродукцію вірусу - на 3,08 та 3,33 lg TID₅₀, відповідно. При цьому референс-препарат (таміфлю) у кінцевій концентрації 410 мкг/мл

15 пригнічував репродукцію вірусу повністю на 4,17 lg TID₅₀.

Таблиця 2

Речовини	Молярна маса, г/моль	Досліджувана концентрація, мкг/мл (відповідно в Молях)	Пригнічення репродукції вірусу H3N2 в lg
Кобальт біс(цитрато)станат [Co(H ₂ O) ₆][Sn(HCitr) ₂ ·4H ₂ O]	735	1750 мкг/мл ($0,25 \times 10^{-2}$ М)	3,08
		184 мкг/мл ($0,75 \times 10^{-3}$ М)	3,33
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл (1×10^{-3} М)	4,17

20 У відношенні штаму пташиного грипу H5N3 отримані результати (табл. 3), які свідчать про протівірусну активність кобальт біс(цитрато)станату на рівні референс-препарату (таміфлю).

Таблиця 3

Речовини	Молярна маса, г/моль	Досліджувана концентрація, мкг/мл (відповідно в Молях)	Пригнічення репродукції вірусу H5N3 в lg
Кобальт біс(цитрато)станат [Co(H ₂ O) ₆][Sn(HCitr) ₂ ·4H ₂ O]	735	1750 мкг/мл ($0,25 \times 10^{-2}$ М)	4,25
		368 мкг/мл ($0,5 \times 10^{-3}$ М)	4,08
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	410 мкг/мл (1×10^{-3} М)	3,75

У концентраціях 1750 мкг/мл та 368 мкг/мл сполука повністю пригнічувала репродукцію штаму вірусу грипу птахів H5N3 на тканинній культурі ХАО - на 4,25 та 4,08 lg TID₅₀, відповідно, в той час, як дія таміфлю у кінцевій концентрації 410 мкг/мл була на рівні 3,75 lg TID₅₀.

25 Аналогічним чином кобальт біс(цитрато)станат діяв і на моделі клітинної культури (MDCK). Оскільки його МПК на цій моделі була нижчою (368 мкг/мл), протигрипозну дію речовини вивчали саме у цій концентрації (табл. 4).

Таблиця 4

Препарат	Молекулярна маса	Максимальна нетоксична доза препарату на MDCK	Діюча доза препарату	Пригнічення репродукції вірусу H3N2 в Ig	Пригнічення репродукції вірусу H1N1 в Ig
Кобальт біс(цитрато)станат [Co(H ₂ O) ₆][Sn(HCit) ₂]·4H ₂ O	735	0,5×10 ⁻³ М (368 мкг/мл)	0,5×10 ⁻³ М	2,2	1,6
Таміфлю (озельтамівір) - референс-препарат	410	1×10 ⁻³ М (410 мкг/мл)	0,5×10 ⁻³ М (205 мкг/мл)	4,33	3,33

Репродукція вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) пригнічувалась на 2,2 lg ТІД₅₀ проти дії референс-препарату, яка складала 4,33 lg ТІД₅₀. У відношенні штаму А/PR/8/34 (H1N1) інгібування репродукції було дещо нижчим і складало 1,6 lg ТІД₅₀ проти дії референс-препарату, а саме 3,33 lg ТІД₅₀. Але в обох випадках гальмування репродукції було статично значущим.

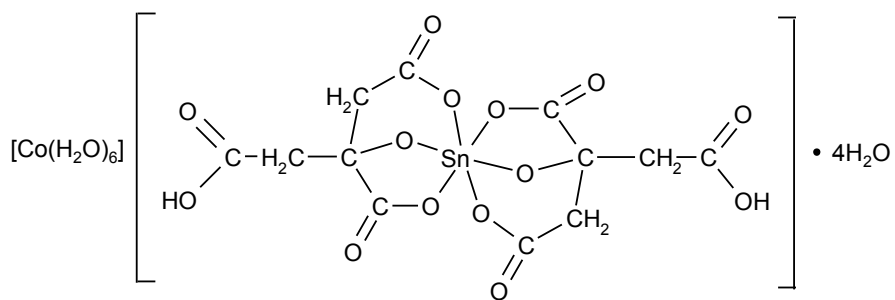
Таким чином, у порівнянні з прототипом, заявлене технічне рішення - новий вітчизняний засіб кобальт біс(цитрато)станат виявляє виразну противірусну активність у відношенні вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), а також вірусу грипу птахів H5N3 на обох застосованих моделях. Крім цього він виявляє значно меншу токсичність, що дає перспективу для подальшого дослідження та впровадження в медичну практику.

Джерела інформації:

1. Карпунин Г.И. Грипп / Г.И. Карпунин (Руководство для врачей) - СПб.: Гиппократ, 2001. - 360с.
2. Risk factors of influenza transmission in households / C. Viboud, P.Y. Bolle, S. Cauchemez [et al.] // Br. J. Gen. Prac. - 2004. - № 54 (506). - P. 684-689.
3. Sturm-Ramirez K.M. Re-emerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks / K.M. Sturm-Ramirez, T.Ellis, B.Bousfield [et al.] // J.Virol. - 2004. - № 78. - P. 4892-4901.
4. Whitley R. J. Oral oseltamivir treatment in children / R.J. Whitley, F.G. Hayden, K.S. Reisinger // Ped. Inf. Dis. - 2001. - № 2. - P. 127-133.
5. 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).
6. Ершов Ф.И. Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях. / Ершов Ф.И., Романцов М.Г - М.: "Гэотар-Медиа", 2007. - 320с.
7. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. Рекомендации / под. ред. чл.- кор. АМН Украины А.В. Стефанова - К.: Авіцена. 2002. - 567 с.
8. Марцинко Е.Э., Миначева Л.Х., Чебаненко Е.А., Сейфуллина И.И. и др. Условия образования гетерометаллических комплексов в системах GeC14 (SnC14) - лимонная кислота - M(CH₃COO)₂ - H₂O. Кристаллическая и молекулярная структура [M(H₂O)₆][Ge(HCit)₂]·4H₂O (M=Mg, Mn, Co, Cu, Zn) и [M(H₂O)₆][Sn(HCit)₂]·4H₂O (M=Mg, Co, Ni) // Журн. неорган. химии. - 2013. - Т. 58, № 5. - С. 588-595.
9. 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". - №u2005 12542; заявл. 26.12.05; опубл. 17.07.06, Бюл. №7.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Кобальт біс(цитрато)станат [Co(H₂O)₆][Sn(HCit)₂]·4H₂O M=735,7



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