



УКРАЇНА

(19) UA (11) 90864 (13) C2  
(51) МПК (2009)  
A61K 31/426  
C07D 277/44 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

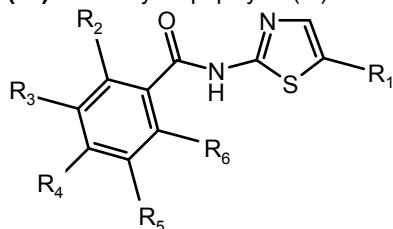
## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ГАЛОГЕНІЗОВАНІ ПОХІДНІ БЕНЗАМІДУ

1

(21) а200702713  
(22) 06.09.2005  
(24) 10.06.2010  
(86) PCT/US2005/031868, 06.09.2005  
(31) 60/608,354  
(32) 09.09.2004  
(33) US  
(46) 10.06.2010, Бюл.№ 11, 2010 р.  
(72) РОССІНЬОЛЬ ЖАН ФРАНСУА, US  
(73) РОМАРК ЛЕБОРАТОРІЗ, Л.К., US  
(56) WO 2003103665 A1  
US 2004/0259877 A1  
GB 1 276 663  
US 3 736 330  
WO 00/26202 A  
EP 1 277 729 A  
WO 2005/070891 A  
WO 95/28393 A

(57) 1. Сполука формули (III):



, (III)

де

R<sub>1</sub> - атом галогену, а

R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>, незалежно, - гідроген, гідроксил, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил, ацилоксил, -C(O)R<sub>7</sub>, де R<sub>7</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> не є гідрогеном.

2. Сполука за п. 1, де принаймні один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> - гідроксил.

3. Сполука за п. 2, де вказаний принаймні один гідроксил знаходиться в орто-положенні.

4. Сполука за п. 2, де інші з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> є гідрогенами.

5. Сполука за п. 1, де принаймні два з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> не є гідрогенами.

6. Сполука за п. 1, де один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> - гідроксил, а інші з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>, незалежно, - гідроген, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил, ацилоксил (переважно ацетоксил або пропіонокси), -C(O)R<sub>7</sub>, де R<sub>7</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, або є ароматич-

2

ними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

7. Сполука за п. 1, де один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> - гідроксил, а принаймні один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил, ацилоксил, -C(O)R<sub>7</sub>, де R<sub>7</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

8. Сполука за п. 1, де вказаний ацилоксил є ацетоксиком або пропіонкислом, а вказаною ароматичною групою є феніл або бензил, котрі можуть бути надалі заміщеними.

9. Сполука за п. 1, де R<sub>1</sub> - Br або Cl.

10. Сполука за п. 1, де R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> охоплюють не більше одного ацилоксилу.

11. Сполука за п. 1, де два суміжних R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> разом утворюють бензильне кільце.

12. Сполука за п. 1, де один з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub> - гідроксил, а інші з R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>, незалежно, - гідроген, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил, ацилоксил або -C(O)R<sub>7</sub>, де R<sub>7</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

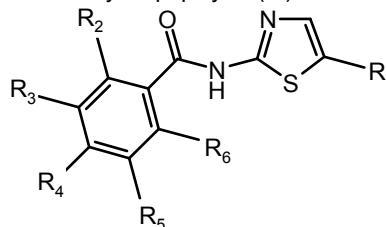
13. Сполука за п. 1, вибрана з групи:

2-(ацетолілокси)-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4820);

2-(ацетолілокси)-5-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4821) та

2-(ацетолілокси)-5-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4822).

14. Сполука формули (III):



, (III)

де:

R<sub>1</sub> - галоген,

R<sub>2</sub> - OR<sub>8</sub>, де R<sub>8</sub> - -C(O)R<sub>10</sub>, де R<sub>10</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, а

R<sub>3</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл або -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил,

R<sub>4</sub>-R<sub>6</sub>, незалежно, - гідроген, гідроксил, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксил, ацилоксил, галоген, -C(O)R<sub>7</sub>, де R<sub>7</sub> - -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

15. Сполука за п. 14, де R<sub>1</sub> - Cl або Br.

(13) C2

(11) 90864

(19) UA

16. Сполука за п. 14, де  $R_8$  -  $-C(O)R_{10}$ , де  $R_{10}$  - метил, етил, пропіл або бутіл, у тому числі її ізомери.

17. Сполука за п. 14, де  $R_9$  - метил або метоксил.

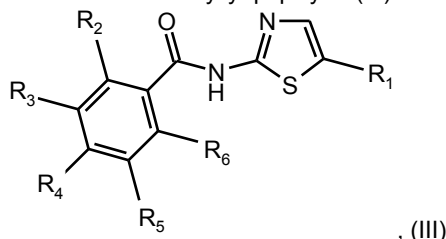
18. Сполука за п. 14, вибрана з групи:

2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4803);

2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-хлор-2-тіазоліл)бензамід (RM4804) та

2-(ацетолілокси)-3-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4806).

19. Фармацевтична композиція, що містить як активний засіб сполуку формули (III):

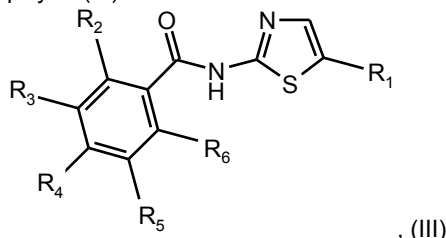


де

$R_1$  - атом галогену, а

$R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  не є гідрогеном.

20. Спосіб лікування вірусних інфекцій, при якому вводять ефективну кількість фармацевтичної композиції, що містить як активний засіб сполуку формули (III):



де

$R_1$  - атом галогену, а

$R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $-C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил, нітро, галоген,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, особі, яка цього потребує.

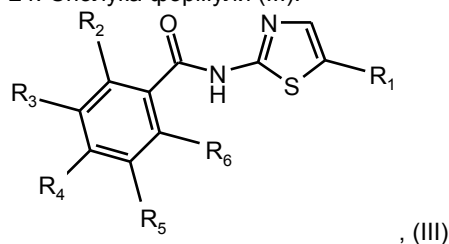
21. Спосіб за п. 20, де  $R_1$  - атом галогену, а  $R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  не є гідрогеном.

22. Спосіб за п. 20, де  $R_1$  - атом галогену, а  $R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил, галоген, нітро, -

$C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні два з  $R_2$ - $R_6$  не є гідрогенами, а принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - гідроксил або ацилоксил.

23. Спосіб за п. 20, де  $R_1$  - атом галогену, а  $R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  не є гідрогеном.

24. Сполука формули (III):



де

$R_1$  - атом галогену, а

$R_2$ - $R_6$ , незалежно, - гідроген, галоген, нітро, гідроксил,  $-C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки, де принаймні два з  $R_2$ - $R_6$  не є гідрогенами, а принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - гідроксил або ацилоксил.

25. Сполука за п. 24, де принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - гідроксил, а принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - галоген, нітро,  $-C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, ацилоксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

26. Сполука за п. 24, де принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - ацилоксил, а принаймні один з  $R_2$ - $R_6$  - галоген, нітро,  $-C_1$ - $C_4$ алкіл,  $-C_1$ - $C_4$ алкоксил, гідроксил,  $-C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $-C_1$ - $C_4$ алкіл, або є ароматичними групами, у тому числі солі та гідрати цієї сполуки.

27. Сполука за п. 24, де вказаний ацилоксил є ацетоксилом або пропіонксілом, та де вказаною ароматичною групою є феніл або бензил, котрі можуть бути надалі заміщеними.

28. Сполука за п. 24, де  $R_1$  - Br або Cl.

29. Сполука за п. 24, де два суміжних  $R_2$ - $R_6$  разом утворюють бензильне кільце.

30. Сполука за п. 24, вибрана з групи:

2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4803) та

2-(гідрокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4819).

31. Сполука за п. 24, вибрана з групи:

2-(ацетолілокси)-5-метил-N-(5-хлор-2-тіазоліл)бензамід та

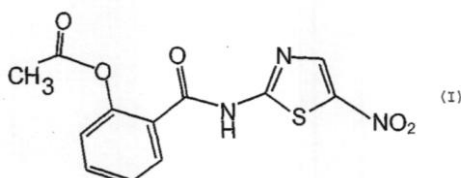
2-(гідрокси)-5-метил-N-(5-хлор-2-тіазоліл)бензамід.

Винахід стосується галогенованих похідних бензаміду, а більш конкретно, похідних бензаміду, що характеризуються більшою специфічністю сто-

совно вірусних патогенів та є менш руйнівними стосовно корисної кишкової мікрофлори.

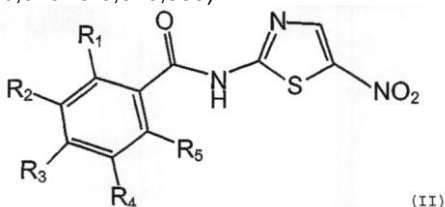
(2-(ацетолілокси)-N-(5-нітро-2-тіазоліл) бензамід, сполука формули (I), також позначений як

нітротіазол, нітазоксанид, або NTZ, відомий для застосування у лікуванні та попередженні паразитарних інфекцій, бактеріальних інфекцій, грибкових інфекцій, діареї та інших шлунково-кишкових розладів (Патенти США №№ 3,950,351, 4,315,018 та 5,578,621), охоплюючи лікування від трематод (Патент США № 5,856,348). Отримання NTZ розкрито у патенті США № 3,950,351. Посилені фармацевтичні композиції для доставки NTZ розкриті у патентах США №№ 6,117,894 та 5,968,961.



Постульовано, що, в анаеробних бактеріях та протозоа, NTZ виявляє принцип дії на основі відновлення нітро груп нітроредуктазами, а зокрема залежних від піруват-ферредоксин-оксидоредуктази (PFOR) реакцій переносу електронів, що є суттєвими для анаеробного енергетичного метаболізму. Жодний із можливих принципів дії NTZ для гелмінтів зараз невідомий, однак, ферменти анаеробного переносу електронів вважають потенційною метою, з 5-нітрогрупою, що мається на увазі у цьому механізмі.

Сполуки формули (II), у котрих один з  $\text{R}_{1-5}$  - OH, а інші  $\text{R}_{1-5}$  - H, як відомо, виявляють антивірусну активність та є відомими у лікуванні вірусних хвороб людини, як-то хвороб, викликаних цитомегаловірусом людини, вітряної віспи, вірусом Епштейна-Барра, HSV-I та HSV-II (Патенти США №№ 5,886,013 та 6,020,353).



Будучи потужними, ці сполуки не є селективними стосовно тільки вірусних патогенів. Вони описані як такі, що мають чудову ефективність проти паразитів, бактерій та грибків. На практиці це асоційовано з проблемою. Тобто, у людей та багатьох тварин, кишковик містить корисні популяції мікрофлори, головним чином з анаеробних бактерій. Пероральне застосування широкого спектру сполук, як-то сполук формули (II) вбиває бактеріальну кишкову флору, що може призводити до вторинних ускладнень, охоплюючи діарею, потребуючи подальшого лікування.

Відповідно, є необхідність у терапевтичних сполуках, що є більш селективними стосовно вірусних патогенів. Найпереважно, ці сполуки повинні мати антивірусну активність, але бути по суті позбавлені антибактеріальної та антипаразитарної активності, принаймні до позбавлення шкідливої дії на корисну кишкову мікрофлору при пероральному застосуванні.

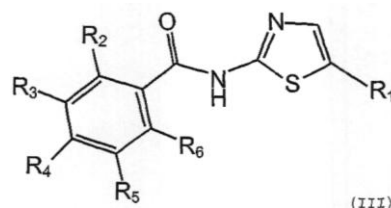
Цього та більше досягають заявленим винаходом, як буде ясно фахівцю з його розкриття та прикладів.

Заявлений винахід стосується антивірусних похідних бензаміду, що є більш селективними стосовно вірусних патогенів, а відповідно викликають зменшену шкідливу дію на корисну кишкову мікрофлору при пероральному застосуванні.

Згідно з першим аспектом, винахід неочікувано зроблено заміною нітро-замісника, котрий досі вважають ключовим стосовно активності NTZ, атомом галогену. Це заміщення можна робити у будь-якому з відомих терапевтично ефективних 2-бензамідо-5-нітро-тіазолів (де бензольне кільце може бути по різному заміщеним). Неочікувано, нові галогеновані сполуки залишають їх антивірусні властивості, але втрачають активність проти бактеріальної кишкової мікрофлори при пероральному застосуванні.

Приклади цих відомих 2-бензамідо-5-нітро-тіазолів, котрі є аналогами сполук заявленого винаходу, відрізняючись тільки тим, що згідно з винаходом нітро-група є видаленою та заміщеною атомом галогену, широко представлені у вищеведених посиланнях на патенти США, та Патенти США №№ 5,886,013 зокрема, їх розкриття уведено для довідки.

Заявлений винахід крім того стосується (5-галоген-2-тіазоліл)-бензамідних сполук формули (III):



у котрих

$\text{R}_1$  - атом галогену, переважно F, Cl, Br, або I, більш переважно Br або Cl, найкраще Br, та

$\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкіл,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкоксил, ацилоксил (переважно ацетоксил або пропіоноксид), нітро, галоген,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}_7$ , де  $\text{R}_7$  -  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкіл, або ароматичний радикал (переважно незаміщені або заміщені феніл або бензил), охоплюючи солі та гідрати цих сполук.

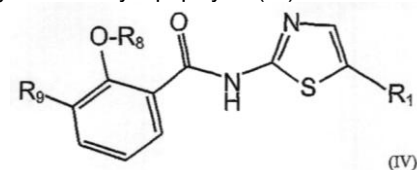
Переважає, один з  $\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$  - гідроксил.

Переважає принаймні один з  $\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$  не є гідрогенами, а більш переважно принаймні два з  $\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$  не є гідрогенами.

Два сусідніх  $\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$  можуть разом утворювати бензильне кільце.

Переважає,  $\text{R}_2$  -  $\text{R}_6$  охоплюють не більше одного ацилоксилу та не більше одного галогену.

Заявлений винахід крім того стосується антивірусних сполук формули (IV):

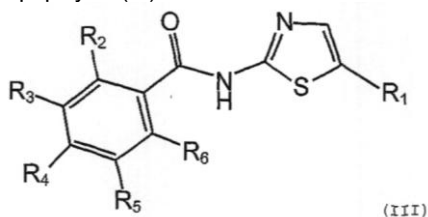


де  $R_1$  - атом галогену,  $R_8$  -  $-C(O)R_{10}$ , де  $R_{10}$  -  $C_1-C_4$  алкіл, а  $R_9$  -  $-C_1-C_4$  алкіл або  $-C_1-C_4$  алкоксил, охоплюючи солі та гідрати цих сполук.

Винахід крім того стосується антивірусних фармацевтичних композицій, що містять сполуку формули (III) або (IV) та фармацевтично прийнятний носій.

Остаточо, винахід стосується способу лікування або попередження вірусної інфекції у тварини або людини, спосіб полягає у застосуванні до вказаної особи принаймні одної дози фармацевтичної композиції, що містить ефективну кількість антивірусної сполуки формули (III) або (IV) та фармацевтично прийнятний носій.

Сполуки заявленого винаходу охоплюють сполуки формули (III):



де

$R_1$  - атом галогену, переважно F, Cl, Br, або I, більш переважно Br або Cl, найкраще Br, та

$R_2-R_6$ , незалежно, - гідроген, гідроксил,  $C_1-C_4$  алкіл, -  $C_1-C_4$  алкоксил, ацилоксил (переважно ацетоксил або пропіоноксил), нітро, галоген, -  $C(O)R_7$ , де  $R_7$  -  $C_1-C_4$  алкіл, або ароматичний радикал (переважно феніл або бензил, котрі можуть бути подальше заміщеними), охоплюючи солі та гідрати цих сполук.

Переважаю, один з  $R_2-R_6$  - гідроксил.

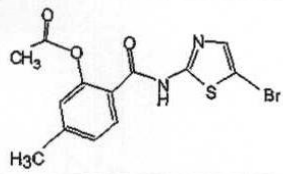
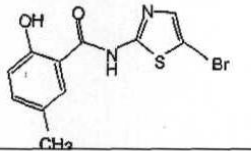
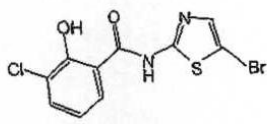
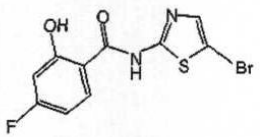
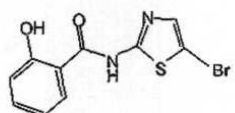
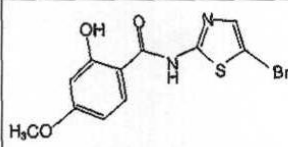
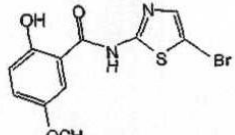
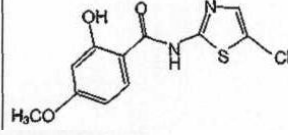
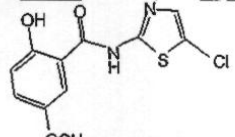
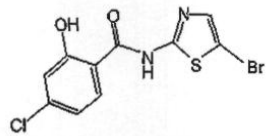
Переважаю принаймні один з  $R_2-R_6$  не є гідрогеном, а більш переважно, принаймні два з  $R_2-R_6$  не є гідрогенами.

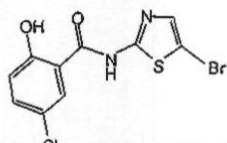
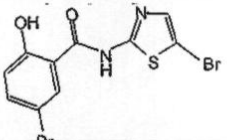
Два сусідніх  $R_2-R_6$  можуть разом утворювати бензильне кільце.

Переважаю,  $R_2-R_6$  містять не більше одного ацилоксилу та не більше одного галогену.

Сполуки згідно з заявленим винаходом ілюстровані без обмеження наступним переліком:

Код №	Структура	Молекулярна маса	Молекулярна формула
RM-4803		355,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_3S$
RM-4804		310,75	$C_{13}H_{11}ClN_2O_3S$
RM-4806		371,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_4S$
RM-4819		313,17	$C_{11}H_9BrN_2O_2S$
RM-4820		341,18	$C_{12}H_9BrN_2O_3S$
RM-4821		355,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_3S$

RM-4822		355,21	$C_{13}H_{11}BrN_2O_3S$
RM-4826		313,17	$C_{11}H_9BrN_2O_2S$
RM-4827		333,59	$C_{10}H_9BrClN_2O_2S$
RM-4831		317,13	$C_{10}H_9BrFN_2O_2S$
RM-4832		299,14	$C_{10}H_7BrN_2O_2S$
RM-4833		329,17	$C_{11}H_9BrN_2O_2S$
RM-4834		329,17	$C_{11}H_9BrN_2O_3S$
RM-4835		284,72	$C_{11}H_9ClN_2O_3S$
RM-4836		284,72	$C_{11}H_9ClN_2O_3S$
RM-4838		333,59	$C_{10}H_6BrClN_2O_2S$

RM-4839		333,59	$C_{10}H_6BrClN_2O_2S$
RM-4840		378,04	$C_{10}H_6Br_2N_2O_2S$

Переважні приклади сполук формули (III) охоплюють:

2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4803);

2-(гідрокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4819);

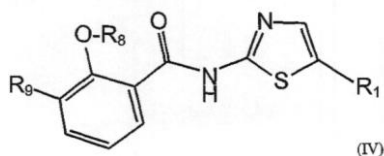
2-(ацетолілокси)-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4820);

2-(ацетолілокси)-5-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4821); та

2-(ацетолілокси)-5-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4822).

Крім того, відкрито, що сполуки з гідроксилзамісником в орто-положенні бензольного кільця мають гарну ефективність. Відповідно, з вищенаведених ілюстративних сполук, такі сполуки є переважними: RM-4819, RM-4826, RM-4827, RM-4831, RIVM832, RIVM833, RM-4834, RM-4835, RM-4836, RM-4838, RM-4839, RM-4840.

Сполуки згідно з винаходом переважно охоплюють сполуки формули (IV):



де:

$R_1$  - галоген, переважно F, Cl, Br, або I, більш переважно Br або Cl, найкраще Br,

$R_8$  -  $-C(O)R_{10}$ , де  $R_{10}$  -  $C_1$ - $C_4$  алкіл.  $R_{10}$  - метил, етил, пропіл та бутіл, охоплюючи їх ізомери. Метил є переважним, згідно з чим бензамідним замінником є ацетолілоксил, а

$R_9$  -  $C_1$ - $C_4$  алкіл або -  $C_1$ - $C_4$  алкоксил. Метил та метоксил є переважними. Метил є найкращим.

Приклади сполук формули (IV) охоплюють: 2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4803);

2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-хлор-2-тіазоліл)бензамід (RM4804); та

2-(ацетолілокси)-3-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4806).

Композиції заявленого винаходу можна формувати як тверді або рідкі дозовані форми, або як пасти або мазі, та можуть, як варіант, містити крім того активні інгредієнти.

Фармацевтичні композиції заявленого винаходу містять фармацевтично прийнятний носій, охоплюючи багато відомих фахівцям носіїв, зокрема змочувальні або диспергувальні агенти (Патент США 5,578,621), похідні крохмалю (Патент США

5,578,621), наповнювачі, тощо. Таблетки можуть, як варіант, містити покриття речовини, що складає кишково-розчинне покриття, тобто покриття, що по суті нерозчинне у секреті шлунка але по суті розчинне у кишкових рідинах.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуки формули (III) або (IV) переважно формують для перорального застосування, як варіант, у формі рідкого препарату, наприклад емульсії або розчину чи суспензії у воді або олії, як-то арахісовій олії, або іншій рідкій олії. Композиції неводних міцелярних розчинів можна отримувати способом з патенту США 5,169,846. Альтернативно, таблетки можна виробляти, наприклад, вологою грануляцією; сушкою та пресуванням. Покриття плівкою загалом проводять з органічними розчинниками.

Термін "селективний антивірусний" означає, що у дозах, ефективних для попередження або лікування вірусної хвороби, активність є більше антивірусної ніж антибактеріальної, антигрибкової або антипаразитної, а кишкова флора особи не руйнується до рівнів, очікуваних з широким спектром антибіотиків.

Переважно, при антивірусному лікуванні або профілактиці дози сполук заявленого винаходу можуть залежати від маси особи, та можуть бути визначеними фахівцем за допомогою наступних прикладів, котрі наведено для ілюстрації, але не для обмеження.

#### ПРИКЛАД 1: ТЕСТУВАННЯ ПРОТИ ВІРУСІВ СПОСОБИ

##### Непечінкові віруси

Клітинні культури та лікування. Клітини карциноми гортані HEP-2, клітини нирок мавп 37RC, MA104 та VERO, клітини нирок собак Madin-Darby (MDCK) та аденокарциноми молочної залози (A72), вирощували при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> у середовищі RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), доповненому 10% сироваткою зародка теляти (FCS), 2 mM глутамін та антибіотики. Сполуки, розчинені у вихідному розчині ДМСО (50 мг/мл) розбавляли у культиватційному середовищі та додавали до інфікованих клітин негайно після 1 години періоду поглинання. Сполуки тримали у середовищі протягом експерименту. Контролі мали рівні кількості розріджувачу ДМСО. Кожну концентрацію кожної сполуки тестували подвійно та кожний експеримент повторювали двічі.

Вірусна інфекція та титрування. Наступні віруси були застосовані: Грип А: штам Пуерторико (PR8); Параміксовірус (Парагрип): вірус Сендай (SV); Рабдоірус: вірус пузирчатого стоматиту

(VSV); Ротавірус: ротавірус мавп SA-11 (SA-11); Вірус простого герпесу типу 1: штам F1 (HSV-1); Коронавірус: коронавірус собак штам S-378 (CCoV). Злиті моношари клітин інфікували вірусом грипу А вірус (клітини MDCK) або парагрипу SV (клітини 37RC) протягом 1 годин при 37°C багатьма інфекціями (m.o.i.) 5 HAU (гемаглютинаційні одиниці)/10<sup>5</sup> клітини. Альтернативно, злиті моношари клітин інфікували HSV-1 (клітини HEp-2), VSV (клітини MA104), CCoV (клітини A72) або ротавірусом SA-11 (клітини MA104) протягом 1 години при 37°C при m.o.i. 5 PFU (бляшкоутворююче число)/10<sup>5</sup> клітини для HSV-1, VSV та CCoV та 1 PFU/10<sup>5</sup> клітин для SA-11. Після періоду поглинання, вірусний інокулят видаляли та моношари клітин промивали 3 рази фізіологічним розчином, буферованим фосфатом (PBS). Клітини тримали при 37°C у прийнятному культивацийному середовищі, що містить 2% PCS у присутності тест-сполуки або контролю. Вихід вірусу визначали через 24 годин після інфекції (p.i.) гемаглютинаційним титруванням (WSN, PR8, SV та SA-11) або аналізом CPE50% (VSV, HSV-1, та CCoV), стандартними способами (Amici, C, Belardo, G., Rossi, A. Sc Santoro, M.G. Activation of IKB kinase by Herpes Simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. J. Biol. Chem. 276, 28759-28766 (2001) та Bernasconi, D., Amici, C, La Frazia, S., Ianaro, A. & Santoro, M.G. The 1KB kinase is a key factor in triggering Influenza A virus -induced inflammatory cytokine production in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. 280, 24127-24134 (2005)).

Клітинна токсичність. Життєздатність клітин визначали 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромідом (MTT) MTT-аналізом перетворення формазану (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Для MTT-аналізу відновлений MTT (форма-зан) екстрагували з клітини додаванням 100 мкл підкисленого ізопропанолу, що містив 10% Triton X-100, та поглинання формазану вимірювали у ELISA мікропланшетному читувачі при двох відмінних довжинах хвиль (540 та 690 нм).

#### Вірус гепатиту В

Аналіз проти вірусу гепатиту В (HBV) та оцінку цитотоксичності проводили у 9-добовому аналізі у хронічно продукуючій HBV лінії клітин гепатобластоми людини, 2,2,15, як раніше описано (Korba, B.E. & Gerin, J.L. Use of a standardized cell culture assay to assess activities of nucleosides analogues against hepatitis C virus replication. Antivir. Res. 19, 55-70 (1992)).

#### Вірус гепатиту С

Аналіз проти вірусу гепатиту С (HCV) та оцінку цитотоксичності проводили у 3-добовому аналізі у HCV, що містить реплікон лінії клітин гепатобластоми людини, AVA5 (Okuse, C, Rinaudo, J.A., Parrar, K., Wells, F. & Korba, B.E. Enhancement of antiviral activity against hepatitis C virus in vitro by interferon combination therapy. Antivir. Res. 65, 23-34 (2005)) як раніше описано (Blight, K.J., Kolykhalov, A.A. & Rice, CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science 290, 1972-1974 (2000)).

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТЕСТУВАННЯ ПРОТИ ВІРУСІВ

Таблиця 1. Активність RM-4803 та RM-4819 проти вірусів у культур клітин.

Вірус	EK <sub>50</sub> (мкМ)/SI		
	RM4819	RM4803	Культура клітин
Ротавірус: ротавірус мавп SA-11	0,3/>500	,06/>2500	MA104
Грип А: штам PR8	9,6/>17	2,8/>50	MDCK
Параміксовірус: вірус Сендай	1,3/>125	1,1/>125	37RC
Коронавірус: коронавірус собак, штам S-378	4,9/>33	4,2/13	A72
Рабдовірус: вірус пузирчатого стоматиту	1,6/>100	2,8/>50	MA104
Простий герпес типу 1: штам F1	0,6/>250	5,6/3	HEp-2

EK<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-кратне пригнічення вірусної ДНК або РНК (відносно середніх рівнів у необроблених культурах). СК<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостері-

гали 2-кратне пригнічення відновленого MTT відносно середніх рівнів у необроблених культурах. 1С (індекс селективності) = СК<sub>50</sub>/EK<sub>50</sub>.

Таблиця 2. Активність інших сполук проти параміксовірусу вірус Сендай у культур клітин.

Сполук	Параміксовірус:	Вірус Сендай
	ЕК <sub>50</sub> (ММ)	IC
RM-4820	0,34	35
RM-4821	0,36	>50
RM-4822	0,36	7

ЕК<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-кратне пригнічення вірусної РНК (відносно середніх рівнів у необроблених культурах). СК<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-

кратне пригнічення відновленого МТТ відносно середніх рівнів у необроблених культурах. IC (індекс селективності) СК<sub>50</sub>/ЕК<sub>50</sub>.

Таблиця 3. Активність сполук проти реплікації HBV у 2,2,15 культур клітин.

Сполука	Зовнішньоклітинна		Внутрішньоклітинна		СК <sub>50</sub> (мкМ)	Індекс селективності	
	ЕК <sub>50</sub> (мкМ)	ЕК <sub>50</sub> (мкМ)	ЕК <sub>50</sub> (мкМ)	ЕК <sub>50</sub> (мкМ)		Віріон	R. I.
Ламівудин	0,058±0006	0,164± 0,015	0,172± 0020	0,660± 0,68	2229±7 6	1295 9	33 77
RM4803	6,3±0,7	15± 1,1	12±1,5	50±5,5	>1000 <sup>§</sup>	>67	>2 0 >4
RM4819	3,5±0,5	9,0± 0,8	7,6 ±0,9	22±2,6	>1000 <sup>§</sup>	>111	6

Представлені значення (± стандартні відхилення [CB]) розраховували лінійним регресійним аналізом, застосовуючи дані від усіх оброблених культур. CB розраховували, застосовуючи регресію стандартної похибки з лінійних регресійних аналізів (QuattroPro™). ЕК<sub>50</sub>, ЕК<sub>90</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-кратне, або 10-кратне пригнічення ДНК HBV (відносно середніх рівнів у необроблених культурах), відповідно. СК<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-кратне пригнічення поглинання нейтрального чер-

воного бар-внику(відносно середніх рівнів у необроблених культурах). Значення ЕК<sub>90</sub> використовували для розрахунку індексу селективності [IC] оскільки принаймні 3-кратне пригнічення рівнів HBV є звичайно потрібним для досягнення статистичної значності у цій системі аналізу. HBV R.I. = внутрішньоклітинні реплікаційні інтермедіати ДНК HBV.

<sup>§</sup> Не спостерігали значної цитотоксичної дії упритул до найвищих концентрацій.

Таблиця 4. Активність сполук проти реплікації вірусу гепатиту С у культурі клітин AVA5.

Сполук	СК <sub>50</sub> (мкМ)	ЕК <sub>50</sub> (мкМ)	ЕК <sub>90</sub> (мкМ)	Індекс селективності
α-інтерферон	>10,000 <sup>§</sup>	2,2±0,2*	8,5±0,6*	>4,545
Рибавірин	61 ± 2,9	94 ± 10	>100 <sup>§</sup>	0,6
RM4803	282 ± 21	37 ± 2,7	98± 9,3	7,6
RM4819	164 ± 18	8,9 ± 0,7	79±8,2	18

Представлені значення (± стандартні відхилення [CB]) розраховували лінійним регресійним аналізом, застосовуючи дані від усіх оброблених культур. CB розраховували, застосовуючи регресію стандартної похибки з лінійних регресійних аналізів (QuattroPro™). ЕК<sub>50</sub>, ЕК<sub>90</sub> = концентрація

ліків, при котрій спостерігали 2-кратне, або 10-кратне пригнічення РНК HCV (відносно середніх рівнів у необроблених культурах), відповідно. СК<sub>50</sub> = концентрація ліків, при котрій спостерігали 2-кратне пригнічення поглинання нейтрального червоного барвнику відносно середніх рівнів у необ-



роблених культурах. Індекс селективності =  $CK_{50}/EK_{50}$ .

\* Значення для інтерферону виражені як "IU/мл."

§ Не спостерігали значної цитотоксичної або антивірусної дії упритул до найвищих концентрацій.

ПРИКЛАД 2: ТЕСТУВАННЯ ПРОТИ АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

Способи. Сучасні клінічні анаеробні ізоляти (2000 на дане число) охоплювали 40 груп *B. fragilis*, 26 *Prevotella/Porphyromonas*, 28 фузобактерій, 16 анаеробних грам-позитивних коки, 14 анаеробних грам-позитивних не утворюючих спори паличок та 18 *Clostridia*. Використовували MIC-методологію розбавлення агару CLSI, збагаченим *Brucella* кров'яним агаром та інокула  $1 \times 10^5$  cfu/пляму. Планшети інкубували у анаеробній стерильній камері при  $35^{\circ}\text{C}$  протягом 48 годин.

Результати. MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> значення (мкг/мл):

Ліки	<i>B. fragilis</i> gp (40)	<i>Prev/Porphy</i> (26)	<i>Fusobact-eria</i> (28)	Gram + коки (16)	Gram + палички (14)	<i>Clostridia</i> (18)	Усі (142)
Нітазоксанид	2/4	4/8	1/4	0,5/2	16/>32	0,5/4	2/4
Тизоксанид	2/4	2/16	0,5/2	0,5/1	8/>32	0,25/2	2/4
RM 4803	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32
RM 4819	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32	>32/>32
Амоксицилін-клавуланова кислота	1/4	0,06/0,5	0,5/4	0,125/0,5	0,25/1,0	0,125/1,0	0,5/2,0
Кліндаміцин	2/>32	<0,015/<0,015	0,06/0,125	0,125/0,5	0,125/4	1/>32	0,125/8,0
Метронідазол	1/2	0,5/2	0,25/0,25	0,5/1,0	>16/>16	0,25/2	1,0/2,0

Результати показували, що нітазоксанид, тизоксанид потужні проти усіх груп анаеробних бактерій окрім грам-позитивних анаеробних паличок, охоплюючи лактобацили (котрі звичайно є у більшості мікроаерофілів). За контрастом, RM 4803 та RM 4819 були без значної активності.

ПРИКЛАД 3 - АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ

Сполуки формули (IV) заявленого винаходу виявляють потужну антивірусну активність, як показано у таблиці 5.

EK<sub>50</sub> (мкг/мл) Значення для 2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4 803), 2-

(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-хлор-2-тіазоліл)бензаміду (RM4804), та 2-(ацетолілокси)-3-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензаміду (RM4806), на риновірусі людини типу 39 (HRV-39), та вірусі грипу H3N2 типу А, застосовуючи багатоциклічний аналіз інгібування CPE на моношарах клітин OH-1 Hela та нирок собак Madin Darby (MDCK), відповідно, вимірювали мікроскопічним та спектрофотометричним способами. Pirodavis та Oseltamivir були охоплені як позитивні контролю.

Таблиця 5. Активність RM-4803, RM-4804 та RM-4806 проти вірусів у моношарах клі-

тин

Сполука	Риновірус людини Типу 39 ОН-Hela 2% McCoys + Буфер Гепес Мікроскопічно Спектрофотометр		Грип А Вірус MDCK 0% EMEM + Гепес + трипсин Мікроскопічно Спектрофотометр	
R <sub>1</sub> = Br R <sub>4</sub> = метил R <sub>3</sub> = метил (RM 4803)	0,06	0,03	0,45	0,18
R <sub>1</sub> = Cl R <sub>4</sub> = метил R <sub>3</sub> = метил (RM 4804)	0,57	0,32	0,93	0,57
R <sub>1</sub> = Br R <sub>4</sub> = метил R <sub>3</sub> =	5,0	4,0	0,46	0,57
метоксил (RM 4806)				
Піродавір	0,007	0,004	нема даних	нема даних
Озелтамівір	нема даних	нема даних	0,13-0,17	0,08-0,36

## ПРИКЛАД 4 СЕЛЕКТИВНА АНТИ-ВІРУСНА АКТИВНІСТЬ

Вищенаведені сполуки формули (IV) тестували проти *Trichomonas vaginalis*, *Giardia Intestinalis*, та *Trypanosoma brucei*. 2-(ацетолілокси)-3-метил-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4803), 2-(ацетолілокси)-3-метил-M-(5-хлор-2-тіазоліл)бензамід (RM4804) та 2-(ацетолілокси)-3-метокси-N-(5-бром-2-тіазоліл)бензамід (RM4806) недостатньо виявляли антипаразитну активність проти *Trichomonas vaginalis*, *Giardia Intestinalis* або *Trypanosoma brucei* при концентраціях принаймні 50 мкг/мл.

Відповідно, продемонстровано, що згідно з заявленим винаходом, можна забезпечити нові сполуки, котрі загалом характеризуються селективною антивірусною активністю.

Як додаткову корисність, відкрито, що вищенаведені галоген-заміщені бензамідні сполуки

ефективні проти внутрішньоклітинних протозоа, охоплюючи *Cryptosporidium* spp., *Neospora* spp. та *Sarcocystis neurona* (RM-4820, RM-4821 та RM-4822).

Відносно вищенаведеного опису, слід розуміти, що оптимальні композиції та способи винаходу вважаються зрозумілими фахівцю, і усі еквівалентні описаним в описі взаємозв'язки охоплені заявленим винаходом.

Тому, нижченаведене тільки ілюструє принципи винаходу. Крім того, оскільки ряд модифікацій та змін легко зробити фахівцям, небажано обмежувати винахід описом, відповідно, усі придатні модифікації та еквіваленти знаходяться у рамках винаходу.

Деякі посилання, патенти та інші публікації уведено для довідки.