



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61489 (13) A

(51) 7 A61K31/661,C07C275/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту(54) N,N'-(N,N'-СУЛЬФОНІЛ)-ДИФЕНІЛЕН-БІС(N'',N''-ДИМЕТИЛФОРМАМІДИН), ЩО МАЄ ІМУНОМОДУ-
ЛЮЮЧУ ДІЮ

1

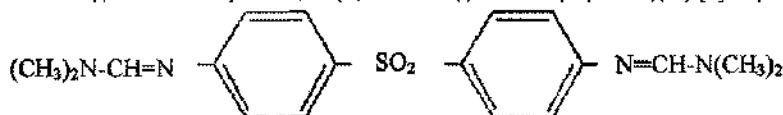
2

(21) 2003021288

(22) 13 02 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Вишневецький Олег Вадимович, Бичкова Ніна
Григорівна, Шумейко Володимир Миколайович,Голубов Михайло Іванович, Сергєєв Валентин
Сергійович(73) ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ(57) Сполука N,N'-(n,n'-сульфоніл)-дифенілен-
біс(N'',N''-диметилформамідин), що має імуномо-
дулюючу активністьВинахід відноситься до органічної хімії та ме-
дицини і стосується відомої сполуки N,N'-(n,n'-сульфоніл)-дифенілен-біс(N'',N''-
диметилформамідин) [1] з формулоюяка може бути використана за новим призна-
ченнямВідомо, що сполука /1/ має бактерицидну ак-
тивність широкого спектру дії, а також проявляє
антипротозойну, антивірусну та антигельмінтну дію
[1, 2]Нами встановлено, що вищеназвана сполука
/1/ має імуномодельючу дію і в цьому призначенні
може знайти застосування у медицині як ефектив-
ний імунокоригуючий засібЗастосування імуномодуляторів в сучасній
медицині є надзвичайно актуальним в зв'язку з
необхідністю корекції імунного стану при різних
нозопогічних формах захворювань, що супрово-
джуються вторинною імунною недостатністю. Ра-
зом з тим, відомі імуномодулятори не відповідають
вимогам сучасної медицини за такими показника-
ми, як недостатня ефективність, наявність різних
побічних дій. Крім того, асортимент широко засто-
совуваних імуномодуляторів досить обмежений.Аналогом та прототипом сполуки /1/ винаходу
є відомі імуномодулятори, відповідно діуцифон та
тимоген.Діуцифон близький за хімічною структурою до
сполуки /1/. Він також є похідним n,n'-
діамінодифенілсульфону, проявляє високу імуно-
модельючу активність та застосовується в ком-плексній терапії захворювань, які супроводжують-
ся імунодефіцитним станом організму (наприклад -
при псоріазі, склеродермії, ревматоїдному артриті
тощо) [3].Тимоген - класичний представник імуностиму-
ляторів, який застосовується в комплексній терапії
дорослих та дітей з гострими та хронічними захво-
рюваннями, які супроводжуються зниженням клі-
тинного імунітету, зокрема порушенням функції
CD-8⁺ лімфоцитів [4].Завданням винаходу є розширення асортиме-
нту потенційних лікувальних засобів з більш вира-
женою імуномодельючою дією та малотоксичних
по своїй природі.Поставлене завдання досягається таким чи-
ном, що в якості імуномодулятора застосована
сполука /1/.Суть винаходу полягає в тому, що запропоно-
вана сполука /1/ забезпечує більш високу імуно-
модельючу дію і таким чином переважає за актив-
ністю аналог та прототип. Крім того, сполука /1/ по
токсичній дії відноситься до IV-го класу небезпеч-
ності згідно ДОСТ 12 1 007-76 (малотоксична).Сполука /1/ може бути одержана за відомим
методом [2] з використанням діючих речовин в
синтезі хлористого тіонілу або хлороксиду фос-
фору

(13) A

(11) 61489

(19) UA

Для одержання сполуки /1/ ми використовували хлороксид фосфору. При цьому вихід кінцевого продукту складав 85-88%.

Чиста сполука /1/ має температуру топлення 145-146°C, питоме оптичне обертання речовини в розчині спирту етилового 96% $[\alpha]_D^{20} = +16,38$.

Спектр ЯМР¹ Н зроблено на імпульсному Фур'є-спектрометрі UXP-300МГц при температурі 20°C у дейтерированому диметилсульфоксиді.

В якості стандарту використовували тетраметилсилан. В ЯМР¹ Н спектрі є сигнали протонів у вигляді трьохпротонних синглетів при 2,96 м.д. та 3,01 м.д. [CH₃], сигнали протонів у вигляді мультиплетів при 7,05 м.д. та 7,68 м.д. (1,4-дизаміщених похідних бензолу), сигнали протонів (-CH=) у вигляді синглету з хімічним зміщенням до 7,84 м.д.

Співвідношення інтегральних інтенсивностей відповідних сигналів протонів підтверджує структуру молекули та чистоту сполуки /1/.

Приклад 1. Визначення імуномодуючої дії сполуки /1/ в порівнянні з прототипом та аналогом.

Визначення порівняльної імуномодуючої дії сполуки /1/ з прототипом та аналогом проводили за відомою стандартною методикою визначення чутливості лімфоцитів крові людини до імуномодуляторів в пробі *in vitro* за допомогою реакції Е-розеткоутворення [5].

Випробування проводили з суспензією лімфоцитів людини, які були виділені з периферійної крові.

Для цього вранці натщесерце брали кров із пальця донора в кількості 0,2-0,4мл у пробірку з 0,05мл розчину гепарину (20 од. в 1,0мл). Одержану суміш розводили в 2 рази середовищем 199, після чого нашаровували на градієнт щільності фіколл-верографіну ($d=1,07\text{кг/см}^3$) центрифугували в холодовій центрифугі PC-6 впродовж 30 хв при 1500об/хв (400д). Одержані лімфоцити перевіря-

ли на життєздатність по фарбуванню 0,1% розчином три пайового синього, встановлювали концентрацію клітин $1 \cdot 10^6/\text{мл}$ і з нею проводили подальше тестування.

Для реакції розеткоутворення готували експериментальні розчини сполуки /1/, діуцифону та тимогену з концентраціями 0,01%, 0,008%, 0,006%, 0,004%, 0,002% та 0,001%.

До 0,1мл одержаного завису лімфоцитів в кожну з п'яти пробірок додавали по 0,1мл розчину вищевказаних сполук з різною концентрацією, витримували 60хв в термостаті при 37°C, після чого в кожну пробірку додавали по 0,1мл середовища 199, 0,05мл сироватки великої рогатої худоби і 0,1мл 0,4% суміші еритроцитів барана у середовищі 199.

Суміш центрифугували впродовж 5хв при 200д (1000об/хв), витримували в термостаті при 37°C 30хв і далі на протязі 20 годин проводили інкубацію в холодильнику при 10°C. Після цього осад обережно ресуспендували і під мікроскопом підраховували кількість лімфоцитів, які утворили "розетки" з не менш, ніж 4-ма еритроцитами барана.

Паралельно з досліджуваними зразками сполук ставили контрольні дослідні в аналогічних умовах без імуномодуючих речовин, лише із середовищем 199.

Висновки про імуномодуючу активність сполук робили на підставі різниці відсотків одержаних "розеток" в досліді з імуномодулятором та без нього в контролі.

Дослідження ефективності вищевказаних імуномодуляторів та сполуки /1/ проведено з лімфоцитами крові 49 донорів.

Результати проведених дослідів наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Імуномодуюча активність різних концентрацій сполуки /1/, аналога та прототипа (M+mn =49)

Концентрація сполук в розчині, %	Е-РУК (контроль), %	Імуномодулятори		
		тимоген (прототип)	діуцифон (аналог)	сполука /1/
0,01	29,0±3,5	31,3±3,5	24,3±2,7	50,3±2,3*
0,008	29,0±3,5	41,0±4,9	39,1±4,9	52,4±7,1*
0,006	29,0±3,5	34,0±3,7	49,8±5,0*	62,2±7,2*
0,004	29,0±3,5	48,1±5,1*	50,1±5,3*	56,9±6,1*
0,002	29,0±3,5	42,2±4,1	42,3±4,7	50,0±5,1*
0,001	29,0±3,5	32,3±4,1	38,1±4,2	30,5±2,9

Примітка * - вірогідність різниці показників в контролі та досліді ($p<0,05$)

Як видно з наведених в табл. 1 даних, для всіх трьох сполук характерною є закономірність із зменшенням концентрації сполуки у розчині збільшується її імунологічна активність. Оптимальними концентраціями для досліджених сполук слід вважати концентрації в межах 0,004-0,006%. Головним висновком з наведених в табл. 1 даних є те, що сполука /1/ має найбільш високу імуномодуючу активність порівняно з аналогом та прототипом діуцифоном та тимогеном. Порівняльна активність в ряду тимоген < діуцифон < сполука

/1/.

Приклад 2. Вивчення гострої токсичності сполуки /1/.

Визначення гострої токсичності сполуки /1/ було проведено у відповідності з вимогами ДОСТ 12 1 007-76 на білих лабораторних мишах по 10 шт. у кожній групі шляхом застосування суспензії сполуки /1/ у фізіологічному розчині [9, 10].

Середньопетальні ефекти дії визначались при трьох основних можливих шляхах шкідливої дії фізіологічно активної речовини: нанесення на шкі-

ру, введення у шлунок, а також інгаляційному за-
труєнні

Нашкірна аппликація здійснювалась на (за дві
добі депільовані) поверхні тіла спини лаборатор-
них тварин, одноразово на протязі двох годин

Пероральне введення виконувалось шляхом
застосування спеціального шприца з широкою
голкою у формі булави. Попередньо тварини не
отримували на протязі 12 год їжі

Інгаляційна дія визначалась шляхом викорис-
тання методів статодинамічної затравки. Термін її
виконання складав 4 год

Спостереження у гострому токсикологічному
експерименті тривало на протязі чотирнадцяти діб
з моменту початку дослідження

Отримані матеріали дослідження гострої ток-
сичної дії наведені у табл. 2

Таблиця 2

Токсикологічна характеристика гострої токсичної дії сполуки /1/ при різних шляхах введення (статевозрілі
тварини, 14 доба спостереження)

шлях введення сполуки /1/, ЛД ₅₀ ^{h336}			
Per os, мг/кг	Інгаляція, мг/м ³	На шкіру, мг/кг	Внутрішньом'язево, мг/кг
745,0±49	Більше 50000	Більше 2500	950,0±68,5

Як бачимо ЛД₅₀^{h336} сполуки /1/ у гострому до-
сліді знаходиться на рівні III-IV класу небезпеки.
Зазначимо, що реальні значення дії в гострому
експерименті на всіх тваринах переконають у не-

значному уражуючому ефекті сполуки /1/

У табл. 3 наведені основні розрахункові показ-
ники оцінки ефективної дії сполуки /1/ при введенні
per os та інгаляції

Таблиця 3

Розрахункові токсикологічні показники дії сполуки /1/ при введенні per os та інгаляції

Per os Lim _{ac} , мг/кг	Інгаляція ОБРВ, мг/м ³	Зона гострої дії	Клас небезпеки за ДОСТ 12.1.007-76
99,9	6,82	Менше 2,5	3

В жодному з випадків вивчення гострої дії за-
гибелі тварин від нанесення на шкіру зареєстро-
вано не було. Транскуптанна чи шкірнорезорбтивна
дія не визначена. Величина ЛД₅₀^{h338} сполуки /1/
перевищувала 2500 мг/кг

Джерела інформації

1 Патент США №3133078 РЖХим, 10Н237П
(1966)

2 Патент США №3182053 РЖХим, 14Н270П
(1967)

3 Машковский М.Д. Лекарственные средства
Харьков Торсинг — 1997, т. 2 — С. 348

4 Машковский М.Д. Лекарственные средства
Харьков Торсинг — 1997, т. 2 — С. 203

5 Ат. Свид. СССР №1064952 (1983) Б. и №1,
1984, с. 71

6 Pharmindex, Лекарственные препараты К
Морион — 1998 — 1038 с

7 XI Державна фармакопея СРСР, том 1 та 2

8 Державна фармакопея України 2001 року

9 Екологічна токсикологія. Підручник / Шу-
мейко В.М., Глуховський І.Г., Овруцький В.М. та ін.
— К.: Столиця, 1998 — 203 с

10 Методичні рекомендації по представленню
документації на лікарські засоби у Фармакологіч-
ний комітет МОЗ України під редакцією Кондратю-
ка В.І. — К.: МОЗ України — 1993 — 36 с