



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75813 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/44

C07D 213/20 (2006.01)

A61P 1/00

A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ 4-(N-БЕНЗИЛ)АМІНОКАРБОНІЛ-1-МЕТИЛПІРИДИНІЙ ЙОДИДУ (АМІЗОН) ЯК ІНГІБІТОРА КОРОНАВІРУСУ ТРАНСМІСИВНОГО ГАСТРОЕНТЕРИТУ СВИНЕЙ

1

2

(21) 20040907941

(22) 30.09.2004

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Жебровська Філя Іванівна, Фролов Аркадій Федорович, Маргітич Віктор Михайлович, Мочалін Ігор Олександрович

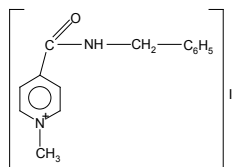
(73) ВІДКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФАРМАК"

(56) RU 2118529, C1, 10.09.1998

EP 0930316, A1, 21.07.1999

WO 03041639, A2, 29.10.2002

(57) Застосування 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду (амізон) загальної формули



як інгібітора коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней.

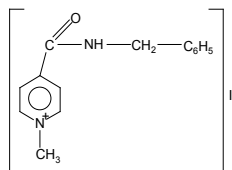
Винахід стосується вірусології, і може бути використаний для профілактики та лікування коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГЕС).

Відомі способи профілактики та попередження ВТГЕС [Патент РФ №2028804, Кл. А61К31/115, публ. 1995р. Патент РФ №2035190, Кл. А61К39/12, публ. 1995р.] розчином формаліну, який вводять внутрішньо м'язово. Під дією внутрішньо м'язових ін'єкцій формаліну відбувається зміна природнього фону метаболічного формальдегіду, який впливає на збудника захворювання.

Такий спосіб спрямований на лікування або профілактику трансмісивного гастроентериту свиней і має на меті підвищення активності імунної системи свині, проте не може забезпечити санацію(звільнення) організму тварин від коронавірусу.

В основу винаходу поставлене завдання винайдення засобу, що інгібує реплікацію коронавірусу та забезпечує звільнення організму від вірусоносія.

Поставлене завдання досягається застосуванням 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду (товарна назва "Амізон") загальної формули



в якості інгібітора коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней.

Амізон виявляє вірусостатичну дію щодо коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней, що забезпечує її специфічну дію проти цього збудника та звільнення організму від вірусоносія. Ліки можуть застосовуватись у формі порошку або водного розчину і добавлятися до їжі, що виключає необхідність ін'єкційного внутрішньом'язового введення.

Відоме застосування амізону в медицині як знеболюючого засобу з інтерферогенними, протизапальними та жарознижувачими властивостями [Патент України №6752, Кл. А61К31/44, C07D213/20, публ. 1994р.] для лікування тяжких ускладнень форм епідемічного паротиту [Патент України №38388, Кл. А61Р31/00, публ. 2001р.], для лікування ангін [Патент України №40248, Кл.

(13) C2

(11) 75813

(19) UA

A61K31/44, публ. 2001р.], вірусного гепатиту А [Патент України №21337, Кл. А61K35/14, публ. 2001р.].

В результаті проведених досліджень виявлено, що введення амізону у дозах 80-160мкг/мл у культуру первинних клітин нирки ембріону свині, що інфікована вірусом трансмісивного гастроентериту свиней (належить до родини коронавірусів), протягом 2-х - 3-х діб гальмує його утворення та ураження ним клітин. Цей ефект зберігається, якщо у культуру повторно через дві доби вводиться у тій же дозі препарат амізон. Відсутність цього призводить вже з другої-третьої доби спостереження до активації введеного раніш вірусу.

Тимчасовий, гальмуючий вплив амізону на утворення досліджуваного коронавірусу *in vitro*, розвиток інфекційного процесу у інфікованих клітинах може бути пов'язаний з безпосереднім впливом амізону на вірусну частку (віріон), модифікацію ним поверхні чутливої клітини та зниження її здатності до адсорбції віріонів коронавірусу або індукцією амізоном здатності клітин СНЕВ до продукції інтерферону.

Приклад. Вплив препарату амізон на репродукцію коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГЕС).

Досліди проводили на коронавірусі свині, штам Пурдю-115 (збудник трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГЕС)). Вірус пасувався у культурі клітин нирок ембріону свині (СНЕВ). Інфекційний титр при одержанні становив 5,5 ІgТЦД. Культура клітин була адаптована для роботи з амізоном насувалась на живильному середовищі складу: ДМ ЕМ, 10% сироватки ембріону корови, 50мкг/мл гентаміцину, 2мл глютаміну/300мкг/мл/. Посадкова доза становила 200тис. клітин на 1мл середовища. Інкубація проводилась при температурі 36,5°C, відносно вологості 70%: протягом двох-трьох діб формувалась моношар клітин, що використовувалась для подальшої роботи. Амізон було одержано у вигляді 2,5% водного розчину.

Критеріями оцінки дії амізону слугували: термін розвитку тканинної цитопатичної дії (ТЦД), відсоток культур, в яких виявилась цитопатична дія амізону, співвідношення життєздатних та нежиттєздатних (для вірусу) клітин СНЕВ у різних групах експерименту.

Досліди проводили у напрямку вивчення профілактичної, лікувальної та профілактично-лікувальної дії амізону. Всього проведено 12 серій експерименту, кожна з яких складалася з контрольних (росту клітин, дії амізону на клітини, репродукції ВТГЕС) та піддослідних груп.

Вивчення докисної дії амізону на культуру клітин СНЕВ показало, що в дозах препарату 800мкг, 80мкг, 8мкг на 1мл середовища, які найчастіше використовувалися у роботі, його токсичної дії встановлено не було, відношення кількості життєздатних та нежиттєздатних клітин, які враховувалися протягом експерименту, у порівнянні з контролем, суттєво не відрізнялись. На першій добі вони коливалися у межах 7,75%-9,1%, на п'ятій-шостій, коли вже почалося відмирання чергового пасажу клітин, внаслідок їх старіння, ці показники збільшувалися до 38,66-46,15% у дослідних групах проти 7,37% у контрольній.

Профілактична дія амізону вивчали у експерименті, до якого увійшло шість груп:

1. Контрольна I - для спостереження за ростом клітин СНЕВ у культурі.

2. Контрольна II - для спостереження росту клітин при додаванні 80мкг/мл амізону.

3. Контрольна III - для дослідження стану клітин у процесі експерименту під дією ВТГЕС, який додавався у культуру у інфікуючій дозі 4,5 ІgТЦД50.

4. Піддослідна група, у якій на третій добі росту культури клітин додавався препарат амізон у дозі 80мкг/мл, а на наступну добу інфікували ВТГЕС у дозі 4,5ІgТЦД 50.

5. Піддослідна група - амізон вводили двічі, другий раз через добу після зараження клітин ВТГЕС.

6. Піддослідна група, в якій дозу амізону, що вводився одноразово, за добу до зараження клітин, збільшили до 160мкг/мл. Основні результати, що одержані у цій серії експериментів, подані у таблиці 1.

Як видно з таблиці 1 у перших двох групах експерименту проявив порушення росту моношару клітин протягом періоду спостереження не встановлено. У третій групі після інфікування на другу добу у 25% досліджуваних груп клітин візуально були виявлені ознаки цитопатичної дії вірусу у вигляді порушень цілісності моношару, зміни форми клітин СНЕВ з фібропласто- та епітеліоподібної на кульоподібну, зменшену у розмірі і не здатну до пропускання світла (сіру та чорну). Як з'ясувалося згодом на підставі їх здатності до забарвлення це були не життєздатні клітини. У четвертій групі профілактичне, попереднє введення амізону затримало до третьої доби прояви ЦПД вірусу, які виникли у 33,3% культур.

П'ята група експерименту, амізон в котрій у дозі 80мкг/мл вводили двічі (другий раз після зараження культур вірусом), характеризується відсутністю ЦПД протягом трьох діб, тобто на дві доби довше ніж у третій групі (вірусній). У шостій групі дозу амізону було збільшено у двічі (з 80мкг/мл, які застосовувалися у четвертій та п'ятій групах, до 160мкг/мл), але схема застосування була використана аналогічна до схеми четвертої групи. Як виявилось, гальмування розвитку ЦПД продовжилося на дві доби, тобто на одну добу довше ніж в третій (контрольній вірусній) групі. Таким чином можна вважати, що препарат амізон, який застосовувався у дозі 80мкг/мл за добу до інфікування культур клітин вірусом трансмісивного гастроентериту свиней протягом наступних двох діб гальмує ураження клітин яке виявляється у їх культурі розвитком ЦПД. Повторне введення амізону подовжує ефект гальмування прояву дії вірусу, порівняно з третьою (вірусною) групою на дві доби. Збільшення дози амізону у двічі (160мкг/мл замість 80мкг/мл) суттєво не позначилось на його профілактичній дії.

Крім вивчення профілактичної дії амізону досліджувалися його здатність впливати на перебіг вірусної інфекції у культурі клітин із застосуванням лікувальної схеми використання цього препарату. Схема включала досліді по одночасному введенню препарату за добу після інфікування клітин та

двічі після цього. Амізон додавали у дозі 80мкг/мл. Результати наведені у таблиці 2.

З даних таблиці 2 видно, що одночасне введення амізону у дозі 80мкг/мл і вірусу трансмісивного гастроентериту свиней призводить до гальмування утворення цього збудника у культурі клітин (група II дослідів). Внаслідок цього цитопатична дія досліджуваного вірусу вже після другої доби виявляється у меншій кількості культур і становить 50 та 66,6 відсотків протягом 6-го та 7-го дня спостережень. У той же час у першій групі (контроль вірусу) відповідні показники становлять 100 та 100 відсотків.

Третя група цієї серії дослідів по суті відтворює профілактичне та лікувальне застосування амізону. Ефективність комбінованої схеми аналізувалася з матеріалами таблиці 1. У даному випадку, стосовно таблиці 2, слід підкреслити, що одночасне та однократне використання амізону зменшує прояви цитопатичної дії вірусу до 50,0-66,6% протягом шостої-сьомої діб спостереження проти 100,0% у контрольній (вірусній) II групі дослідів.

У проведених експериментах було досліджено значення дози інфікуючого вірусу у виявленні здатності амізону до гальмування утворення вірусу трансмісивного гастроентериту свиней у культурі клітин СНЕВ. З цією метою для зараження культури клітин була використана інфікуюча доза ВТГ у 1,1 Іг ТЦД50. Одержані результати наведені у таблиці 3.

У цій серії дослідів схеми застосування амізону були ідентичними з тими, що використовувалися у серії вивчення профілактичної дії амізону (таблиця 1). Перша доба спостереження за цитопатичною дією амізону в жодній з груп не визначила його ознак, тому у таблиці наведені результати 2, 3 та 4 діб. Як видно з таблиці 3 на другу добу, а також на третю були зафіксовані ознаки цитопатичної дії вірусу саме у II групі, при цьому лише при його титрі у 0,11 Іг ТЦД 50 (розведення 10^{-1}). У групах піддослідних (III та IV) це виявилось лише на четверту добу експерименту, у 66,6% випадків культур клітин взятих до експерименту. Це може бути пов'язане з дією амізону.

Враховуючи результати попередніх досліджень та виявленого факту перебування ВТГЕС у культурі клітин дослідних груп з подальшою активацією його у вигляді цитопатичної дії, було проведено визначення можливої наявності його у латентному стані. Для цього було проведено визначення збудника в культуральній рідині досліджувальних груп експерименту з використанням вірусу у титрі 1,1 Іг ТЦД 50. Результати наведені у таблиці 4.

Експерименти, результати яких наведені у таблиці 4, свідчать про те, що незважаючи на відсутність цитопатичного ефекту у піддослідних групах з застосуванням амізону, як правило, протягом

2-3-ох діб після його введення в культуру клітин, пізніше у останніх виявляються ознаки активації вірусу яким їх було інфіковано. При цьому має значення ступінь розведення вихідної культуральної рідини. У другій та третій групах вона становила 10^{-6} , а у четвертій - 10^{-5} , що позначилося на його (вірусі) визначенні. Якщо при більшому ступеню розведення (менша інфікуюча доза збудника) вірус на другій добі у культурі клітин зафіксований не був, то зараження клітин більшою кількістю вірусу (розведення 10^{-5} , четверта група дослідів) призведе до проявів цитопатичної дії досліджуваного збудника.

Введення амізону у дозах 80-160мкг/мл у культуру первинних клітин нирки ембріону свині, що інфікована вірусом трансмісивного гастроентериту свиней (належить до родини коронавірусів), протягом 2-х - 3-х діб гальмує його утворення та ураження ним клітин. Цей ефект зберігається, якщо у культуру повторно через дві доби вводиться у тій же дозі препарат амізон. Відсутність цього призводить вже з другої - третьої доби спостереження до активації введеного раніш вірусу.

Тимчасовий, гальмуючий вплив амізону на утворення досліджуваного коронавірусу *in vitro*, розвиток інфекційного процесу у інфікованих клітинах може бути пов'язаний з безпосереднім впливом амізону на вірусну частку (віріон), модифікацію ним поверхні чутливої клітини та зниження її здатності до адсорбції віріонів коронавірусу або індукцією амізоном здатності клітин СНЕВ до продукції інтерперона.

Таким чином виявлено, що амізон здатний до вірусостатичної дії щодо вірусу трансмісивного гастроентериту свиней.

Профілактичне застосування амізону (доза 80мкг/мл за добу до зараження клітин СНЕВ вірусом трансмісивного гастроентериту свиней) гальмує інфекційний процес протягом трьох діб у 66,6-100,0 відсотках досліджуваних культур клітин. Збільшення дози амізону до 160мкг/мл суттєво не позначається на тривалості вірусостатичного ефекту препарату.

Терапевтична схема (одночасне введення в культуру клітин амізону та ВТГЕС) при застосуванні амізону в дозі 80мкг/мл зменшує кількість уражених вірусом культур клітин протягом 3-4 діб після їх інфікування до рівня 50,0-66,6 відсотків (показники контролю - 100 та 100 відсотків).

Найбільш ефективною є схема, яка поєднує профілактичне та терапевтичне застосування амізону. Це дає змогу захищати культуру клітин СНЕВ від цитопатичної дії ВТГЕС протягом чотирьох діб з моменту їх інфікування. У контролі цей час становить дві доби. Схема передбачає: введення амізону (80мкг/мл), наступна доба-інфікування клітин, друга доба - повторне введення амізону (80мкг/мл).

Таблиця 1

Результати дії амізону на культуру клітин СНЕВ за профілактичною схемою

Група	Доба спостережень									
	Результати досліджень (% культур клітин з ЦТД)									
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	x	-	25,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
IV	-	-	xx	x	-	-	33,3	100,0	100,0	100,0
V	-	-	xx	x	-	xx	-	100,0	100,0	100,0
VI	-	-	xx	x	-	-	50,0	100,0	100,0	100,0

- - відсутність цитопатичної дії
 x - введення вірусу у культуру клітин
 xx - введення амізону у культуру клітин

Таблиця 2

Результати застосування лікувальної схеми використання амізону

Група	Доба спостережень								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Результати досліджень (% культур клітин з ЦПД)									
I	-	-	x	-	25,0	100,0	100,0	100,0	100,0
II	-	-	xx+x	-	25,0	50,0	66,0	100,0	100,0
III	-	-	xx	x	-	xx	-	100,0	100,0

- - відсутність цитопатичної дії
 x - введення вірусу у культуру клітин
 xx - введення амізону у культуру клітин

Таблиця 3

Група	Доба спостережень																	
	2						3						4					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Результати досліджень (%% ЦПД)																		
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	100,0	-	-	-	-	-	66,6	-	-	-	-	-	66,6	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,6	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,6	-	-	-	-	-

- - відсутність ефекту
 I - група контролю росту клітин СНЕВ
 II - група контролю росту вірусу у клітинах
 II - профілактична дія амізону (доза 80мкг/мл)
 III - профілактична дія амізону (доза 160мкг/мл)

Таблиця 4

Визначення наявності ВТГЕС у культуральній рідині культур СНЕВ піддослідних груп

Група	Доба спостережень									
	2			3			4			
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
Результати досліджень (%% ЦПД)										
I	100	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
II	-	-	-	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-
III	-	-	-	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	Н/Д
IV	100	100	33,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	Н/Д

I - група контролю ВТГЕС
 II - група культуральної рідини з культур дослідження профілактичної дії (амізон 80мкг/мл+ВТГЕС), інфікуюча доза 10⁻⁶.
 III - група культуральної рідини з культур дослідження профілактичної дії (амізон 160мкг/мл+ВТГЕС - інфікуюча доза 10⁻⁶).
 IV - група культуральної рідини з культур дослідження профілактичної дії (амізон 80мкг/мл+ВТГЕС -інфікуюча доза 10⁻⁵).