



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100048** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**C07D 253/065** (2006.01)  
**C07D 295/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2014 13249</b>	(72) Винахідник(и): <b>Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховерх Володимир Володимирович (UA), Шаїнова Роза Сергіївна (UA), Синицин Віталій Анатолійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>10.12.2014</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.07.2015</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.07.2015, Бюл.№ 13</b>	(73) Власник(и): <b>НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Кропив'янського, 2, м. Ніжин, 16602 (UA), ДЕРЖАВНА НАУКОВА УСТАНОВА "ДЕРЖАВНИЙ ЦЕНТР ІННОВАЦІЙНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ", вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)</b>
	(74) Представник: <b>Поприткіна Дурсунгозель Шамирадівна</b>

**(54) N,N<sup>1</sup>-БІС-БЕНЗО[1,3]ДІОКСОЛ-5-ІЛ-6-МОРФОЛІН-4-ІЛ-[1,3,5]ТРИАЗИН-2,4-ДІАМІН, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ДО ВІРУСУ H1N1**

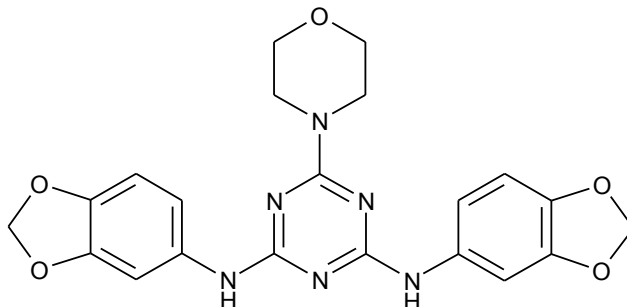
**(57) Реферат:**

N,N<sup>1</sup>-Біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін, що проявляє антивірусну активність відносно до вірусу H1N1.

**UA 100048 U**



Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології засобів, зокрема, одержання біологічно активного N, N<sup>1</sup>-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну формули:



, DAM0011566

який проявляє противірусні властивості, що дозволяє передбачити використання його у практичній медицині, як антивірусний лікарський засіб, а саме для лікування грипу, викликаного вірусом California/07/2009 IVA(H1N1).

Актуальність питання лікування і профілактики сезонних респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ та грипу) на сучасному етапі зумовлена рядом факторів, насамперед кількістю хворих. Так, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) частота випадків захворюваності на ГРВІ щорічно складає до третини мешканців планети. Наприклад, в Україні на ГРВІ хворіє від 10 до 14 млн. осіб, що становить 25-30 % усієї та близько 75-90 % інфекційної захворюваності в країні.

Ці показники тим самим визначають для ГРВІ перше місце у структурі причин високої захворюваності та тимчасової непрацездатності. Окрім того, простежується прямий зв'язок між розвитком хронічної патології серця, легень, нирок та інших органів після перенесеної ГРВІ.

Віруси, як і бактерії, здатні змінювати свої біохімічні процеси, внаслідок чого з'являються резистентні штами. Так, вірус A/H1N1 вперше було виділено у свиней в 1930 р [1] і віднесено до ендемічного зоонозу [2]. До 2005 року в усьому світі було підтверджено близько 50 випадків захворювання вірусом типового "свинячого грипу" людей [3], які контактували з хворими тваринами [4-6]. Антигенна структура цього вірусу була відносно стабільною, проте у 1991 році були зареєстровані спалахи грипу у північноамериканських свиней, викликані серотипом H3N2, що призвело до утворення нового вірусу грипу A/H1N1. Він включає генетичний матеріал трьох серотипів вірусів (H1N1, H3N2, H1N2), який циркулює серед людей, птахів і свиней [7]. У 2009 році в Каліфорнії виділено вірус грипу A/California /04/2009 (H1N1) та A/California /07/2009 (H1N1) [8], який поширюється повітряно-крапельним і контактно-побутовим шляхами.

Сучасні противірусні препарати найбільш ефективні в період реплікації вірусів. Чим раніше вони призначені, тим більш позитивні наслідки терапії. Суттєвою перешкодою є ті обставини, що мультиплікація вірусів значною мірою відбувається ще до розвитку симптомів захворювання. При цьому на фоні імунної недостатності перебіг цього патологічного процесу ускладнюється. На цьому підґрунті базується принциповий поділ сучасних противірусних препаратів, які застосовуються для лікування грипу, за механізмом дії на: 1) ЛЗ, які безпосередньо порушують реплікацію вірусу; 2) ЛЗ, які модулюють імунну систему організму-хазяїна.

До першої групи належать амантадин, занамівір, озельтамівір, римантадин, арбідол та інозин пранобекс [9-12].

У зв'язку із ситуацією щодо захворюваності на сезонний грип та випадками захворюваності на каліфорнійський грип постає питання не лише щодо ефективності, але й щодо безпеки противірусних препаратів. Слід зазначити, що як і будь-яким ЛЗ, противірусним препаратам, що використовуються для лікування грипу, властиві побічні реакції (ПР). Тому пошук нових противірусних препаратів є досить актуальним.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з противірусною активністю, що перешкоджають реплікацію вірусу, та які здатні лікувати грип, викликаний вірусом H1N1.

Як біологічно активну сполуку запропоновано N, N<sup>1</sup>-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0011566), ефективність якого підтверджується експериментально. В таблиці 1 наведені експериментальні дані активності сполуки (DAM0011566) відносно до вірусу California/07/2009 IVA(H1N1). Ефективність зазначеної сполуки виражали показниками EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> та SI, які визначали в досліджах in vitro при дії сполук,

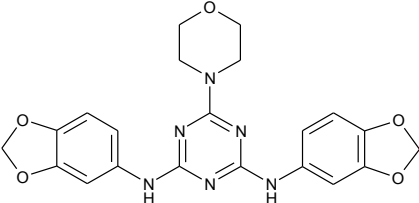
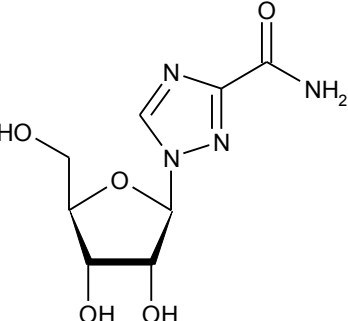
що попередньо розчиняли в ДМСО в діапазоні концентрацій від 0,1 до 100 мкг/мл. Зазначена сполука має перевагу в пригніченні вірусу у порівнянні з найближчим аналогом - рибавірином.

В умовах експерименту заявлена сполука виявила високу противірусну активність щодо вірусу California/07/2009 IVA(H1N1) (результати наведені в табл. 1).

5

Таблиця 1

Противірусна активність N, N<sup>1</sup>-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0011566) щодо вірусу California/07/2009 IVA(H1N1)

Сполука	Структура	Мол. маса	Тип вірусу	EC <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	SI
DAM0011566		436,43	California/07/2009 IVA(H1N1)	0,32	>100	>310
Рибавірин		244,2	California/07/2009 IVA(H1N1)	1,8	>320	>180

Примітки:

1. EC<sub>50</sub> - ефективна концентрація, що визначається з кривої доза/ефект і є концентрацією речовини, при якій ефект спостерігається для 50 % популяції після проходження певного часу дії. Виражається у мкг/мл.

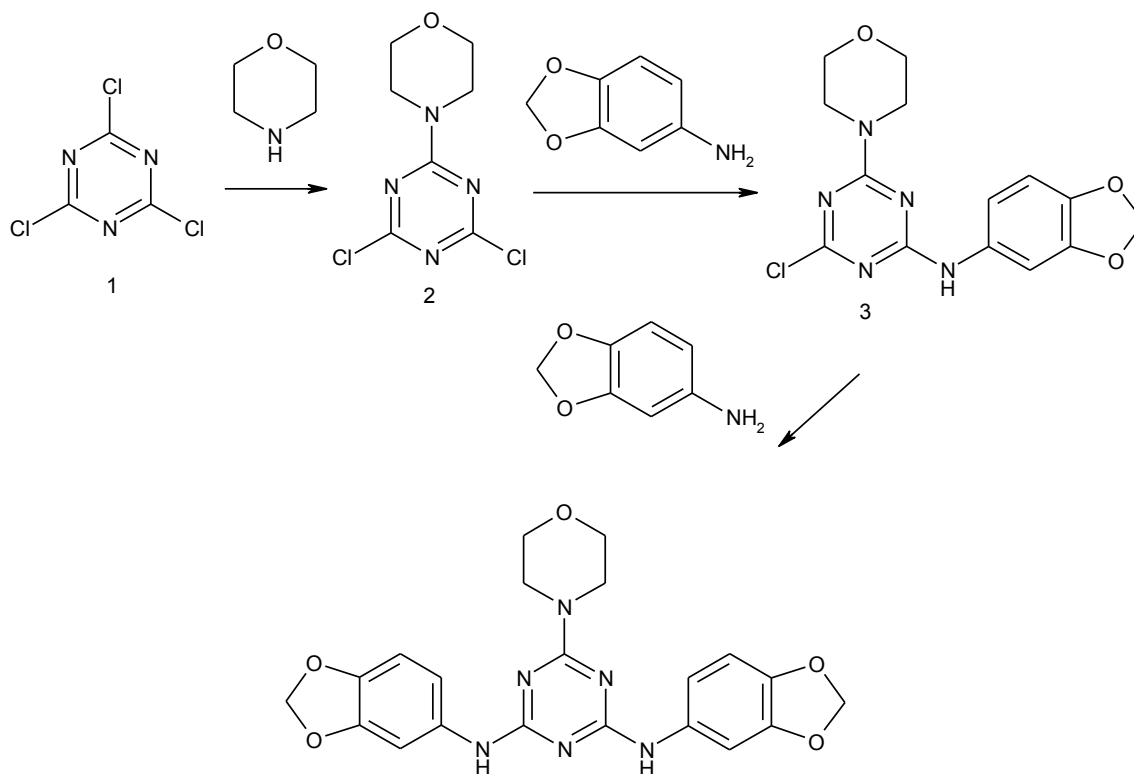
2. IC<sub>50</sub> - концентрація, при якій інгібіція клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.

3. SI - індекс селективності, що є показником ефективності препарату та виражається співвідношенням IC<sub>50</sub> до EC<sub>50</sub>.

Як видно з результатів таблиці, противірусна активність N, N<sup>1</sup>-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0011566) спостерігається при введенні меншої в 5,6 разу за концентрацію дози в порівнянні із рибавірином, а індекс селективності досліджуваної речовини в 1,7 разу більше, ніж індекс селективності препарату порівняння. Слід відмітити, що

10

якби IC<sub>50</sub> для цих двох сполук був би однаковим, то SI був би втричі більшим. Заявлений N, N<sup>1</sup>-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін отримують з високим виходом при використанні відомих синтетичних підходів [13] за схемою:



DAM0011566

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. 2,4-Дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин (2) одержано за методикою [14] взаємодією ціанурхлориду (1) з морфоліном у середовищі ацетону при 5 °С.

Приклад 2. N, N'-Біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін (DAM0011566).

До розчину 4,7 г (0,02 моль) 2,4-дихлор-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазину (2) в 50 мл диметилформаміду при перемішуванні додавали послідовно 2,76 г (0,02 моль) поташу та 2,74 г (0,02 моль) бензо[1,3]діоксол-5-іламіну. Реакційну суміш перемішували за температури 20 °С протягом двох годин та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Отримували 5,37 г бензо[1,3]діоксол-5-іл-(4-хлоро-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2-іл)-аміну (2), який без додаткової очистки та ідентифікації розчиняли в 50 мл тетрагідрофурану. До розчину, що одержано, при перемішуванні додавали 2,20 г (0,016 моль) бензо[1,3]діоксол-5-аміну. Реакційну суміш перемішували протягом чотирьох годин за температури 40 °С, охолоджували та виливали в розчин 8,28 г (0,06 моль) поташу в 250 мл води. Осад, що утворився, відфільтровували та кристалізували з етанолу. Вихід становить 5,63 г (63 %).  $T_{пл}=170-172\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Знайдено, %: N=18,9  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5$ . Вирахувано, %: N=19,2. Спектр ПМР (DMSO- $d_6$ , TMC): 3,65 (м, 4H,  $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ ), 3,71 (м, 4H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ), 5,97 (с, 4H, 2- $\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6,80-7,48 (м, 6H, ароматичні протони), 9,06 (уш. с, 2H, 2NH).

Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama).

Для оцінювання протівірусної активності сполуки N, N'-біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011566) моношар культури клітини Vero вирощували в 96-лунковому мікропланшеті до того часу, поки дно кожної лунки не покриється клітинами. Залишкове культуральне середовище повністю видаляли, і кожну лунку двічі промивали фосфатним буфером. У кожну лунку додавали розчин вірусу IVA(H1N1, скорегованого до необхідної концентрації, сполуку (DAM0011566) та протівірусний засіб - рибавірин (Sigma), що розчинені в диметилсульфоксиді, додавали у кожну лунку до кінцевої концентрації від 0,1 до 10 мкг/мл. Культивували протягом 48 годин, клітини Vero спостерігали за допомогою мікроскопа. Після додавання 100 мкл 70 % ацетону кожну лунку витримували при -20 °С протягом 1 год. Після висушування в сушильній шафі додавали 100 мкл 0,4 % (w/v) розчину SRB (сульфородаміну Б), розчиненого в 1 % (v/v) ацетатній кислоті. Після 30 хвилин

фарбування, розчин SRB, що не зв'язався з клітинами, 4 рази промивали 1 % (v/v) ацетатною кислотою. Після висушування в кожну лунку додавали 100 мкл 10 тМ розчину Tris (pH 10,5) для розчинення забарвлюючої речовини на дні лунки. Для оцінки противірусної активності вимірювали оптичну густину. Для контролю використовували лунки, в які не вносили клітини, з вірусом без сполуки і в які не вносили ні вірус, ні сполуку (контроль культури клітин).

Джерела інформації:

1. Shope R. E. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology // J Exp Med, 1931; 54: 373-385.

2. Dacso C. C et al. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections // J Clin Microbio, 1984; 20: 833-835.

3. Hinshaw V. S. et al. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine // Virology, 1978; 84: 51-62.

4. Myers K. P. et al. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? // Clin Infect Dis, 2006; 42: 14-20.

5. Gray G. C. et al. Swine workers and swine influenza virus infections // Emerg Infect Dis, 2007; 13: 1871-1878.

6. Wells D. L. et al. Swine influenza virus infections: transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission//JAMA, 1991; 265: 478-481.

7. Olsen C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America // Virus Res, 2002; 85: 199-210.

8. Bartlett J. G. 2009 H1N1 Influenza-Just the Facts: What's New and What to Expect // Published: 09/25/2009 Available at <http://www.medscape.com/>.

9. Emergence of novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team. The New England Journal of Medicine 2009; 10:1-10.

10. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009; 58: 433-435.

11. FDA. Antiviral Drug Advisory Committee. Gaithersburg: Centre for Drug Evaluation and Research 2002; 1-266.

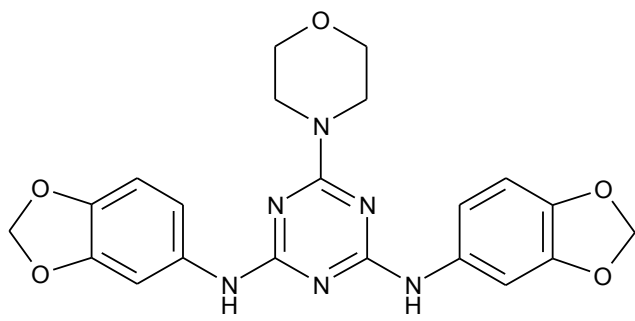
12. Hayden F. WHO Guidelines on the Use of Vaccines and Antivirals during Influenza. Annex 5- Considerations for the Use of Antivirals during an Influenza pandemic, Geneva, 2-4 October, 2002.

13. Pandya U.H., Astik R.R., Thaker K.A. J. Studies On S-Triazine Derivatives. Part-1 nstChem., 1981, 53, № 2, 69-70.

14. Treatment of prostate cancer, melanoma or hepatic cancer. ZENYAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA Patent: US2007/244110 A1, 2007.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

N,N<sup>1</sup>-Біс-бензо[1,3]діоксол-5-іл-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін



що проявляє антивірусну активність відносно до вірусу H1N1.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601