



100

**SU 1389230 A**

(S) 4 C 07 D 277/54, A 61 K 31/425

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(22) 23.07.86

(71) Львовский государственный медицинский институт

(72) Л.И.Маслова и Л.В.Лозюк

(53) 547.789.3.03(088.8)

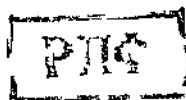
(56) Авторское свидетельство СССР  
№ 1210412, кл. С 07 D 277/54, 1985  
(непублик.).

(54) 1,1-БИС-[2-(2,7-ДИАЦЕТОКСИФЛУО-  
РЕНИТИДЕН-9-ГИДРАЗОН)ТИАЗОЛИДОН-  
-4-ИЛ-5]-о-НИТРОФЕНИЛМЕТАН, ОБЛАДАЮ-  
ЩИЙ АНТИВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ В ОТНОШЕ-  
НИИ РНК- И ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

(57) Изобретение касается замещенных гетероциклических веществ, в частности 1,1-бис-[2-2,7-диацетоксифлуоренилиден-9-гидразоно)тиазолидон-4-ил-5]-орто-нитрофенилметана, обладающего антивирусным действием в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов, что может быть использовано в био-

химии и медицине. Цель — создание нового активного вещества указанного класса. Синтез ведут конденсацией 2,7-дигидроксифлуоренона-9 тиосемкарбазона с монохлоруксусной кислотой и орто-нитробензальдегидом в смеси ледяной уксусной кислоты и ее ангидрида при нагревании в присутствии катализатора — безводного ацетата натрия. Выход целевого продукта 38,9%, т.пл. 213,5–215°C (из водно-этанольного раствора), брутто-фла  $C_{47}H_{33}N_7O_{12}S_2$ . Новое соединение оказывает значительно более высокий как профилактический, так и терапевтический эффект в сравнении с ремантадином, т.е. 100%-ная выживаемость в сравнении с 80%-ной для ремантадина в отношении вирусов гриппа А-2, а в отношении ДНК-содержащих вирусов наблюдается лучшее действие, чем для метисазона. Токсичность  $LD_{50}$  = 660 мг/кг при парентеральном введении. 4 табл.

(19) SU (11) 1389230 A



Изобретение относится к области органической химии, конкретно, к 1,1-бис-[2-(2,7-диацетоксифлуоренилиден-9-гидразоно)тиазолидон-4-ил-5]-о-нитрофенилметану, обладающему антивирусным действием в отношении РНК-содержащих (вирус гриппа А и А-2), а также ДНК-содержащих вирусов (инфекционный ларинготрахеит и вирус осповакцины).

Указанное свойство позволяет предполагать возможность применения этого соединения в медицине для борьбы с вирусными инфекциями.

Целью изобретения является повышение противовирусного действия в ряду производных тиазола и снижение их токсичности.

**Пример 1.** Получение 1,1-бис-[2-(2,7-диацетоксифлуоренилиден-9-гидразоно)тиазолидон-4-ил-5]-о-нитрофенилметана (соединение 1).

Смесь 2,85 г (0,01 моль) 2,7-дигидроксифлуоренон-9-тиосемикарбазона с 1,03 г (0,011 моль) монохлоруксусной кислоты, 1,51 г (0,01 моль) о-нитробензальдегида, 1,00 г безводного ацетата натрия кипятят 8 ч в 90 мл смеси ледяной уксусной кислоты и уксусного ангидрида (80:10). Охлажденную массу вливают в 0,5 л дистиллированной воды. Выкристаллизовывающийся осадок отфильтровывают, сушат, получают 3,7 г (38,9%), мелкокристаллического вещества светло-желтого цвета с т.пл. 213,5-215°C (этанол - вода).

Найдено, %: С 59,12, Н 3,82; N 10,61; S 6,75.

$C_{41}H_{33}N_7O_{12}S_2$ .

Вычислено, %: С 59,30; Н 3,49; N 10,30; S 6,74.

УФ-спектр,  $\lambda_{\text{макс}}$  (lgE) в этаноле: 240 нм (4,82), 281 нм (4,67), широкая полоса 340-350 нм (3,82).

**Пример 2.** Изучение противовирусной активности соединения 1 в отношении РНК-содержащих вирусов.

Противогриппозная активность соединения 1 установлена на 9-10-дневных куриных эмбрионах, инфицированных 1-10-100-1000 эмбрион-инфицирующими дозами (ЭИД-50). Инфекционная активность вируса составляла  $10^6$  -  $10^8$  ЭИД-50, гемагглютинационные титры - от 1:64 до 1:256 в зависимости от штамма вируса. С целью установле-

ния профилактического действия в биосистему за 60 мин до заражения вводили испытуемое вещество в концентрации 1/2-1/8 от МПК и эмбрионы инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Терапевтический эффект устанавливали путем внесения соединения 1 в различных концентрациях спустя 60-120 мин после инфицирования зародышей. Об антигриппозном действии судили по торможению феномена гемагглютинообразования, т.е. ингибции репродукции вирусов (РГА).

Активным при этом считают вещество, способное ингибировать репродукцию вируса *in ovo* на 4 и более десятичных логарифма при данной множественности инфицирования. Высокоактивным считают вещество, оказывающее такой эффект при заражении эмбрионов 10 и 100 ЭИД-50.

Результаты опытов, представленные разницей логарифмов средних геометрических титров опыта и контроля в табл. 1, показывают, что соединение 1 обладает выраженным профилактическим и терапевтическим противогриппозным действием *in ovo* при гриппе типа А, лишь несколько превышая активность ремантадина.

Однако при гриппе А-2 соединение 1 оказывает значительно более высокий как профилактический, так и терапевтический эффект по сравнению с ремантадином. Так, соединение 1, введенное в биосистему за 60 мин до заражения куриных эмбрионов 1, 10, 100 инфицирующими дозами вируса гриппа, ингибирует его репродукцию на 5,0; 4,5; 4,0  $\log_2$ , в то время как ремантадин в аналогичных условиях опыта задерживает рост вируса гриппа А-2 соответственно на 2,9; 3,0 и 2,2  $\log_2$ .

Химиотерапевтический эффект соединения 1 изучен на модели пневмонии белых мышей, вызванной вирусом гриппа А (Англия) 42/72 H3N2. Соединение 1 вводили через 2 ч после заражения подкожно с интервалом 24 ч в концентрации составляющей 1/10 от ЛД-50 (всего 5 инъекций). В данной серии опытов испытан также интраназальный метод лечения.

Результаты опытов, приведенные в табл. 2 и 3, свидетельствуют о достаточно высоком химиотерапевтическом эффекте испытуемого соединения при

инфицирующей дозе 10 ПД-50 и 100 ПД-50 вируса. Отмечена 100%-ная выживаемость, показатели РГА с легочной тканью леченых мышей аналогичны таковым для интактных мышей. Изменений в легких при вскрытии (в динамике каждые 48 ч) не выявлено.

Аналогичную картину наблюдали при лечении ремантадином. Однако, в случае модели, воспроизведенной 100 ПД-50 вируса, применение ремантадина обеспечило 80% выживания и средняя продолжительность жизни мышей этой группы ниже ( $13,5 \pm 0,2$  против 14,0 дней).

**Пример 3.** Изучение противовирусной активности соединения 1 в отношении ДНК-содержащих вирусов.

Противовирусная активность соединения 1 в отношении ДНК-содержащих вирусов (инфекционного ларинготрахеита и вируса осповакцины) изучена в опытах *in ovo* в сравнении с метисазоном и N-метилизатинтиазолином-4. Вещество вводили по следующей схеме: за 6, 12 и 24 ч до заражения вирусом и через 6, 12 и 24 ч после заражения вирусом в дозе, обеспечивающей 100% инфицирования. Испытаны различные концентрации препаратов, а в табл. 4 приведены данные, полученные при использовании 1/2 от МПК. Критерием эффективности (при соблюдении всех контролей) служил процент снижения инфицированности биосистемы или отсутствие бляшек на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона кур. Получены высокие показатели защиты предлагаемого соединения до и после заражения биосистемы вирусом, значительно превышающие таковые известного противовирусного препарата (метисазона).

**Пример 4.** Изучение токсичности соединения 1.

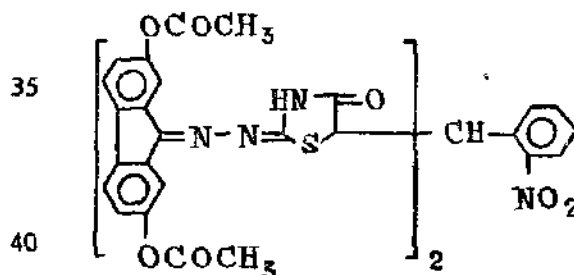
При определении острой токсичности изучена картина периферической крови, основные показатели функционального состояния организма. Установлено, что ПД-50 для мышей при парентеральном введении составляет 660 мг/кг массы, при энтеральном - 950 мг/кг.

Аэрозольный путь применения не дал проявления токсического эффекта из-за низкой токсичности соединения и невозможности получения сверхвысоких аспирируемых концентраций в организме. Изменений со стороны крови при аэрозольном способе введения не наблюдалось даже при 20-кратном применении.

Таким образом, соединение 1 обладает выраженным антивирусным действием в отношении РНК-содержащих (вирус гриппа А и А-2) а также ДНК-содержащих вирусов (инфекционной ларинготрахеит и вирус осповакцины) и может быть рекомендовано для дальнейшего изучения с целью его практического применения.

**Формула изобретения**

1,1-Бис-[2-(2,7-диацетоксифлуоренилиден-9-гидразоно)тиазолидон-4-ил-5]-о-нитрофенилметан формулы



обладающей антивирусным действием в отношении РНК и ДНК-содержащих вирусов.

Т а б л и ц а 1

Степень ингибции репродукции вируса (сводные данные)

Препарат (доза)	Вirus A/WSN/H <sub>2</sub> N <sub>1</sub> (количество ЭИД)							
	1	10	100	1000	1	10	100	1000
	До инфицирования				После инфицирования			
Ремантадин (2,5 мг/ /эмбр.)	4,0*	4,2	3,7	1,5	3,5	4,0	3,2	2,0
Соединение 1 (10 Омг/ /эмбр.)	<0,001	<0,001	<0,01	<0,1	<0,01	<0,001	<0,01	>0,5
Ремантадин (2,5 мг/ /эмбр.)	4,5	4,0	4,0	2,0	4,0	3,5	3,0	2,0
Соединение 1 (10 Омг/ /эмбр.)	<0,001	<0,001	<0,001	>0,5	<0,001	<0,01	<0,05	>0,5
virus A (Англия) 42/72 H3N2								
Ремантадин (2,5 мг/ /эмбр.)	2,9	3,0	2,2	0,9	1,7	0,5	0	0
Соединение 1 (10 мг/ /эмбр.)	5,0	4,5	4,0	2,1	4,0	4,7	4,0	3,0
Соединение 1 (10 мг/ /эмбр.)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01

\* Результаты представлены разницей логарифмов средних геометрических титров между показателями групп опыта и контроля для каждой концентрации препарата и по отношению к каждой инфицирующей дозе вируса.

Т а б л и ц а 2

Сравнительные результаты влияния соединения 1 и ремантадина на течение гриппозной пневмонии мышей (5-кратное подкожное введение в терапевтической концентрации с интервалом 24 ч)

Вариант опыта	Штамм вируса и инфицирующая доза	Средняя продолжительность жизни мышей (дни) M ± m	P	% выживаемости	Количество выявленных пневмоний из числа в опыте	Степень выраженности поражения легочной ткани мышей	РГА с легочной суспензией мышей	РГА после пассивирования суспензии в эмбрионах
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Контроль	A (Англия) 42/72	n = 20		n = 20	n = 10		n = 10	n = 10
инфекции	H3N2	3,9 ± 0,23	-	0	8/10	+++	1:80	1:512
Соединение 1	10LD <sub>50</sub>	14*	<0,001	100	0/10	-	0	0

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Реман-тадин		14	<0,001	100	0/10	-	0	0
Конт-роль	A/Англия 42/72	3,5±0,24	-	0	10/10	+++	1:160	1:256
инфек-ции	H3N2							
Соединение 1	100LD <sub>50</sub>	14	<0,001	100	0/10	-	0	0
Реман-тадин		13,5±0,8	<0,001	80	2/10	++	0	0

П р и м е ч а н и е. Р - достоверность различия между показателями средней продолжительности жизни мышей подопытных и контрольных групп.

\* Длительность опыта 14 дней.

Т а б л и ц а 3

Влияние соединения 1 на течение гриппозной пневмонии (10-кратное интраназальное применение в концентрации 1%)

Группа опыта	Показатели защиты соединения 1 при интраназальном использовании 10-кратно в течение 5 дней				
	Средняя продолжительность жизни мышей в днях (M ± m)	Р	Степень защиты, % (M ± m)	Р	Степень интенсивности поражения легочной ткани мышей
Конт-роль инфекции	3,9±0,23	-	0	-	++++
A(Англия) 42/72 H3N2					
Реман-тадин (1%)	7,1±1,20	<0,010	21,9±9,34	<0,100	+++
Соединение 1	14	<0,001	100,0	<0,001	-

П р и м е ч а н и е. Р - достоверность различия между показателями защиты сравниваемых групп опыта и контроля.

Т а б л и ц а 4

Сравнительный анализ противовирусной активности соединения 1 и его аналогов в отношении ДНК-содержащих вирусов *in ovo* (1/2 от МПК)

Противовирусные препараты	Показатели защиты, %					
	Вирус инфекционного ларинготрахеита					
	До заражения			После заражения		
	6 ч	12 ч	24 ч	6ч	12 ч	24 ч
Метисазон	62,0	68,0	75,0	60,0	55,0	40,0
	<0,001 <sup>*</sup>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010	<0,100
N-Метилизатин-тиазолинон-4	67,8	62,0	64,0	58,0	42,0	25,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010	<0,100	>0,500
Соединение 1	85,0	87,0	85,0	76,0	70,0	65,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Вирус осповакцины						
Метисазон	69,0	75,0	77,0	56,0	52,0	48,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010	<0,010	<0,050
N-Метилизатин-тиазолинон-4	71,0	84,0	50,0	67,0	52,0	39,0
	<0,001	<0,001	<0,010	<0,001	<0,010	<0,100
Соединение 1	80,0	88,0	90,0	56,0	55,0 <sup>c</sup>	60,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,010	<0,010	<0,001

П р и м е ч а н и е. Метисазон – контроль для противооспенного действия, N-метилизатинтиазолинон-4-контроль для противогерпетического действия;

\* Р – достоверность различия между показателями защиты (снижение бляшкообразования на ХАО) между группами, защищенными препаратами и группой, не получавшей препарат, но получавшей растворитель.

Редактор М.Самерханова	Составитель З.Латыпова Техред Л.Сердюкова	Корректор Л.Пилипенко
Заказ 234/ДСП	Тираж 209	Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета СССР по делам изобретений и открытий 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5		

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4