



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82230** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C07D 257/00

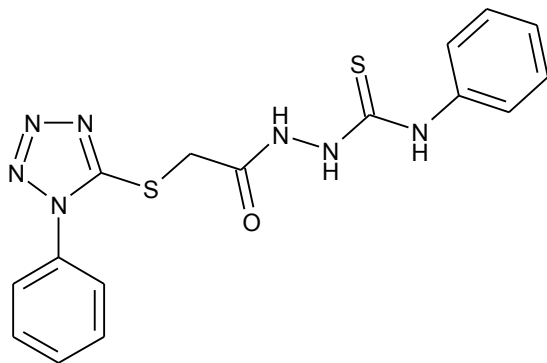
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 01780	(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Георгіянц Вікторія Акопівна (UA), Сааод Хайдар (UA), Северіна Ганна Іванівна (UA), Шуть Дмитро Миколайович (UA), Гриневич Олександр Йосипович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.02.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2013, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР ІННОВАЦІЙНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA), ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680 (UA)
	(74) Представник: Шаповаленко Світлана Лазарівна

(54) N-ФЕНІЛ-2-{{{(1-ФЕНІЛ-1Н-ТЕТРАЗОЛ-5-ІЛ)ТІО}АЦЕТИЛ}ГІДРАЗИНКАРБОТІАМІД, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ДО ВІРУСУ H1N1, ШТАМ A CALIFORNIA/07/2009

(57) Реферат:

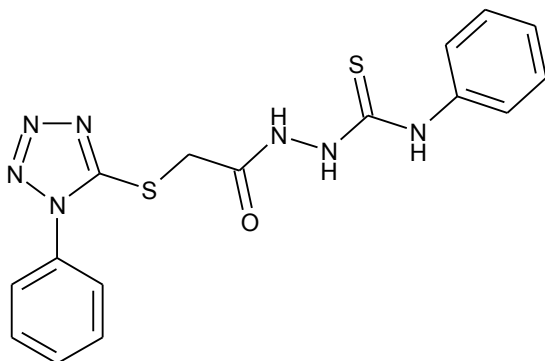
N-Феніл-2-{{{(1-феніл-1Н-тетразол-5-іл)тіо}ацетил}гідразинкарботіамід:



що проявляє антивірусну активність відносно до вірусу H1N1, штам A California/07/2009.

U
UA 82230

Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології засобів, зокрема одержання біологічно активного N-феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіаміду формули:



5 який виявляє антивірусну активність, що дозволяє передбачити його використання у практичній медицині, як антивірусний лікарський засіб, а саме для лікування грипу, викликаного вірусом H1N1 штаму A California/07/2009.

Відомо, що вірус H1N1 належить до ортоміксовірусів та викликає найпоширеніший тип грипу, який є причиною наймасштабніших епідемій. Розмножується у клітинному ядрі та цитоплазмі птахів і ссавців. Розвиваються шляхом визрівання на плазматичній мембрані клітини. Розповсюджуються без переносників. Уражає дихальні органи.[1]

Загалом, механізм дії даного вірусу подібний до інших вірусів грипу. Вхідними воротами інфекції є епітелій слизових оболонок дихальних шляхів людини, де відбувається його реплікація та репродукція. Спостерігається поверхневе ураження клітин трахеї та бронхів, що характеризується процесами дегенерації, некрозу та відторгнення уражених клітин. Розвиток патологічного процесу супроводжується вірусемією впродовж 10-14 діб з переважанням токсичних та токсикоз-алергічних реакцій зі сторони внутрішніх органів, в першу чергу - серцево-судинної та нервової систем. Головною ланкою в патогенезі є ураження судинної системи, що проявляється підвищенням проникності та ламкості судинної стінки, порушенням мікроциркуляції. Ці зміни виражаються у хворих появою носових кровотеч, геморагій на шкірі та слизових оболонках, крововиливами у внутрішні органи, а також, призводять до розвитку патологічних змін у легенях: набряку легеневої тканини з множинними крововиливами в альвеоли.

Падіння тонусу судин призводить до утворення венозної гіперемії шкіри та слизових оболонок, застійному повнокров'ю внутрішніх органів, порушенню мікроциркуляції, крововиливам, на пізніших строках - тромбозами вен та капілярів. [2]

Ці судинні зміни також викликають гіперсекцію ліквору з розвитком циркулярних розладів, що призводять до внутрішньочерепної гіпертензії та набряку мозку.

Крім того, важка форма перебігу хвороби характеризується швидко прогресуючою вірусною пневмонією, яка не чутлива до антибіотиків й за відсутності лікування призводить до смерті протягом 24 годин після перших ознак ускладнення.

Основні симптоми співпадають зі звичайними симптомами грипу - головний біль, підвищення температури тіла, кашель, нежить. Також проявляється діарея, блювота, біль у животі. Значну роль в патогенезі грає ураження легенів та бронхів, що призводить до множинного пошкодження альвеол, некрозу та геморагії. Висока вірулентність вірусу та патогенність цього штаму вірусу може бути обумовлена здатністю білка NS1, що притаманний цьому вірусу, інгібувати продукування інтерферонів інфікованими клітинами [3].

Лікування захворювання викликаного вірусом H1N1 штаму A California/07/2009 по суті не відрізняється від лікування звичайного грипу. При виражених явищах інтоксикації та порушенні кислотно-лужного балансу проводиться дезінтоксикаційна та коригувальна терапія. З препаратів, що діють на сам вірус та на його розмноження, доведена ефективність Рибавіріну.

Лікування тяжких та середнього ступеня тяжкості випадків направлено на попередження вірусної пневмонії, що зазвичай важко протікає та викликає геморагію та дихальну недостатність, а також на профілактику вторинної бактеріальної інфекції, що обумовлює розвиток бактеріальної пневмонії. Рекомендується, також, симптоматична терапія.

Відомий противірусний препарат Рибавірин, який застосовують для лікування важкої інфекції, викликаной респіраторним синцитіальним вірусом, вірусним гепатитом С, а також багатьох інших вірусних інфекцій. Рибавірин є активним у формі метаболіту, що має структуру,

подібну до пуринового нуклеотиду, та, по не встановленому механізму, порушує реплікацію вірусу.

Рибавірин інтегрується в РНК замість аденіну або гуаніну та утворює комплементарні паризаурацилом та цитозином, що викликає мутації в РНК-залежній реплікації вірусів [4].

У США та Великобританії рибавірин призначають орально для лікування гепатиту С у поєднанні з інтерферонами. У формі аерозолі рибавірин використовують для лікування захворювань респіраторним синцитіальним вірусом у дітей. Ефективність препарату не підтверджується у багатьох дослідженнях.

Одним із побічних ефектів рибавірину є дозозалежна анемія, важка форма якої викликає смерть пацієнта (у зв'язку з чим необхідний повний контроль показників крові у процесі лікування). Рибавірин також є тератогеном для деяких тварин.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з протівірусною активністю, що перешкоджають реплікацію вірусу, та які здатні лікувати ГРВІ, викликану вірусом H1N1, штам A California/07/2009.

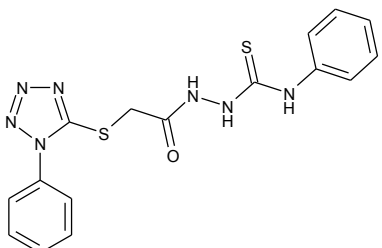
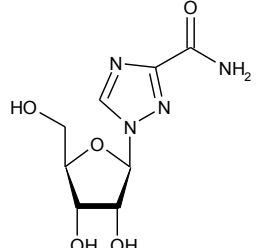
Поставлена задача вирішується тим, що як нова біологічно активна сполука запропонований N-феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіамід.

В таблиці 1 наведені експериментальні дані активності N-феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіаміду по відношенню до вірусу H1N1, штам A California/07/2009. Ефективність даної сполуки виражали показниками EC_{50} , IC_{50} та SI, які визначали в досліджах *in vitro* при дії сполук в розчині ДМСО в діапазоні концентрацій від 0,1 до 100 мкг/мл. Дана сполука має перевагу в пригніченні вірусу у порівнянні з прототипом - рибавірином.

В умовах експерименту заявлена сполука виявила високу протівірусну активність щодо H1N1, штам A California/07/2009 (результати наведені в таблиці 1).

Таблиця 1

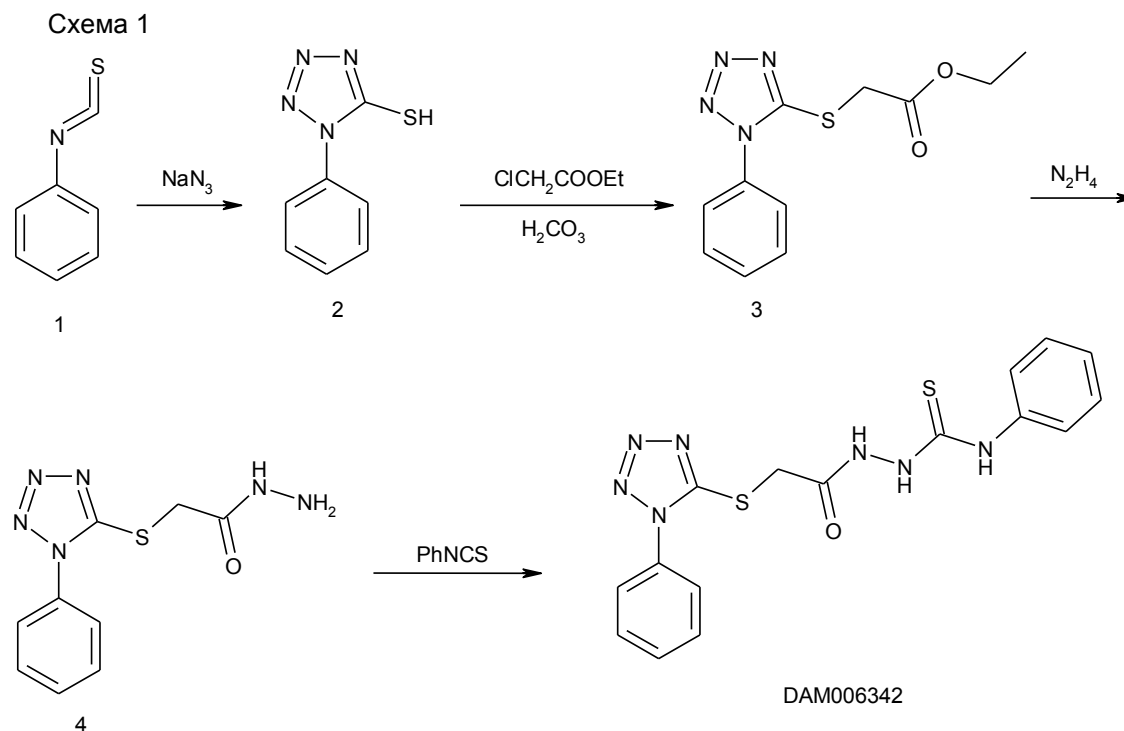
Протівірусна активність щодо вірусу H1N1, штам A California/07/2009
N-феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіаміду (DAM-006243)

ID	Структура	Мол. маса	Тип вірусу	EC_{50} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл	SI
DAM-006243		385.5	FluA(H1N1) California/07/2009	0.3	>100	>330
Рибавірин		244,2	FluA(H1N1) California/07/2009	2	>320	>160

Примітки:

1. EC_{50} - 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_{50} - це концентрація, при якій інгібіція клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI - це індекс селективності, що є показником ефективності препарату, та виражається співвідношенням IC_{50} до EC_{50} .

N-Феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіамід 5 отримують із середніми виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій (схема 1).



Приклади конкретного виконання.

5 Приклад 1. Загальний метод синтезу] N-феніл-2-[[1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіаміду:

Стадія 1. 1-Феніл-1H-тетразол-5-тіол 2 був одержаний кип'ятінням фенілізотіоціанату 1 та азиду натрію у воді за методом [5].

10 Стадія 2. Етиловий естер (1-феніл-1H-тетразол-5-іл-сульфаніл)оцтової кислоти 3 був одержаний з 1-феніл-1H-тетразол-5-тіолу 2 та етилового естеру монохлороцтової кислоти в присутності карбонату калію за методом [6].

Стадія 3. Гідразид (1-феніл-1H-тетразол-5-іл-сульфаніл)оцтової кислоти 4 одержаний кип'ятінням етилового естеру (1-феніл-1H-тетразол-5-ілсульфаніл)оцтової кислоти 3 з гідразингідратом в етанолі за методом [7].

15 Стадія 4. N-Феніл-2-[[1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразин карботіамід DAM006243. До розчину 2.5 г (0.01 моля) гідразиду (1-феніл-1H-тетразол-5-іл-сульфаніл)оцтової кислоти в 50 мл етанолу додавали по краплях 1.35 г (0.01 моля) фенілізотіоціанату. Реакційну суміш кип'ятили 3 години, охолоджували і осад продукту, що випав, відфільтровували та промивали етанолом. Вихід складає 2.79 г (72 %). Т. пл. 185-187 °С. Знайдено, %: N 25.2; S 16.3. C₁₆H₁₅N₇OS₂. Вирахувано, %: N 25.4; S 16.6. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 4,28 (с, 2H, CH₂); 7,14-7,71 (м, 10H, 2Ph); 9,51 (с, 1H, NH); 9,79 (с, 1H, NH); 10,5 (с, 1H, NH).

20 Приклад 2. Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama).

25 Для визначення протівірусної активності сполуки DAM-006243 був проведений тест in vitro з використанням клітин Vero.

30 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. В кожну лунку додавали розчин вірусу H1N1, скорегований до необхідної концентрації. Сполуку 6243 та протівірусний засіб - рибавірин (Sigma), розчинені в диметилсульфоксиді, додавали до кожної лунки до кінцевої концентрації від 0,1 до 10 мкг/мл. Після культивування протягом 48 год. клітини Vero спостерігали в мікроскоп. 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 (сульфородаміна Б), розчиненого в 1 % (v/v) оцтовій кислоті. Після 30 хв забарвлення розчин SRB, що не зв'язався з клітинами, 4 рази промивали 1 % (v/v) оцтовою 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 протівірусної активності вимірювали оптичну

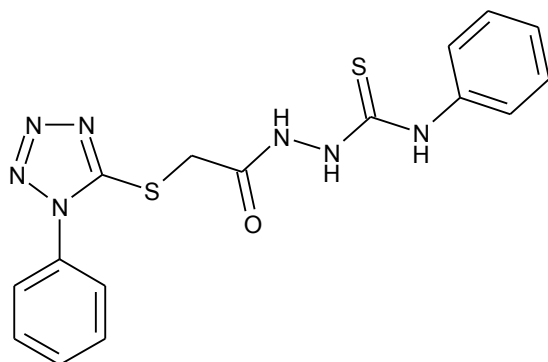
густину. Клітини, оброблені тільки DMSO, та клітини, оброблені DMSO та H1N1, використовували як контрольні групи. [8]

Список посилань:

1. Presti RM, Zhao G, Beatty WL, et al. (November 2009). "Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae". J. Virol. - 2009.-83 (22).
2. Haye K, Burmakina S, Moran T, Garcia-Sastre A, Fernandez-Sesma A (Jul 2009). "The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells". J Virol. - 2009.-83 (13): 6849-62.
3. Yoshiyuki Suzuki (July 3 2006). "Natural selection on the influenza virus genome". Molecular Biology and Evolution - 2006. - 23 (10): 1902-1911.
4. Crotty S, Cameron C, Andino R (February 2002). "Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?". J. Mol. Med. – 2002. - 80 (2): 86-95.
5. R. Neidlein, J. Tauber; Tetrazolylmercaptomethyl-isocyanate und ihre Derivate; Chemische Berichte; - 1967. - Vol. 100, Is. 3, P. 736-740.
6. K. Waisser; J. Vanzura; A. Hrabalek; J. Vinsova; S. Gresak.; Antimycobacterial derivatives of tetrazole; Collect. Czech. Chem. Commun.-1991, Vol.56, P. 2389-2394.
7. Walid Fathalla, Ibrahim A. I. Ali; Efficient synthesis of 1-substituted-4-phenyl-1,4-dihydro-5H-tetrazole-5-thione and (1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thioacetyl derivatives; Heteroatom Chemistry.-2007.- Vol. 18, Is. 6, P. 637-643.
8. Severson, W.E., N. Shindo, M. Sosa, T. Fletcher, 3rd, E.L. White, S. Ananthan, and C.B. Jonsson, Development and validation of a high-throughput screen for inhibitors of SARS CoV and its application in screening of a 100,000-compound library. J Biomol Screen, 2007. - Vol. 12(1): p. 33-40.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

N-Феніл-2-[[[(1-феніл-1H-тетразол-5-іл)тіо]ацетил]гідразинкарботіамід:



що проявляє антивірусну активність відносно до вірусу H1N1, штам A California/07/2009.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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

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