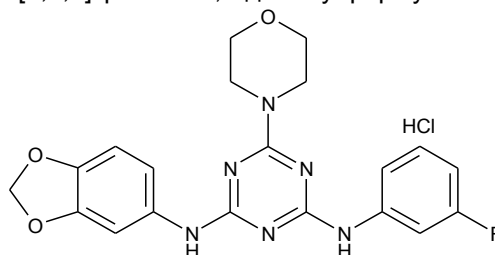


UA 86038 U

Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакології, зокрема, одержання біологічно активного гідрохлориду N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну формули:



5 який проявляє протівірусні властивості, що дозволяє передбачити можливість його використання у практичній медицині, як лікарський засіб для лікування грипу, викликаного вірусом A(H1N1) штаму California/07/2009.

10 Цей вірус є особливо небезпечним для людини, оскільки на фоні притаманних гострим респіраторним вірусним інфекціям захворюванням симптомів: температури $\geq 38^{\circ}\text{C}$, лихоманки, кашлю, болю в горлі та суглобах, головного болю тощо, для грипу A(H1N1) штаму California/07/2009 характерне тяжке ураження легеневої тканини [1], що призводить до частих летальних випадків.

15 Так, за приблизними оцінками [2] протягом пандемії грипу A(H1N1) штаму California/07/2009 у 2009 році внаслідок вірусної інфекції та її подальших тяжких ускладнень по всьому світу постраждало близько 400000 людей.

В основу корисної моделі поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з протівірусною активністю, що перешкоджають реплікації вірусу та можуть лікувати грип, викликаний вірусом A(H1N1) штаму California/07/2009.

20 Як біологічно активну сполуку запропоновано гідрохлорид N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011854), ефективність якого підтверджується експериментально у пробах за двома наведеними методиками оцінки in vitro: методика за барвником нейтральним червоним та візуальна методика оцінки.

25 Наведені експериментальні дані активності сполуки (DAM0011854) щодо вірусу A(H1N1) штаму California/07/2009. Ефективність зазначеної сполуки виражали показниками EC₅₀, IC₅₀ та SI, які визначали в дослідях in vitro. Сполуку (DAM0011854) попередньо розчиняли в ДМСО в діапазоні концентрацій від 0,1 до 100 мкг/мл. Корисна модель має перевагу в пригніченні вірусу у порівнянні з прототипом - рибавірином (таблиця).

Таблиця

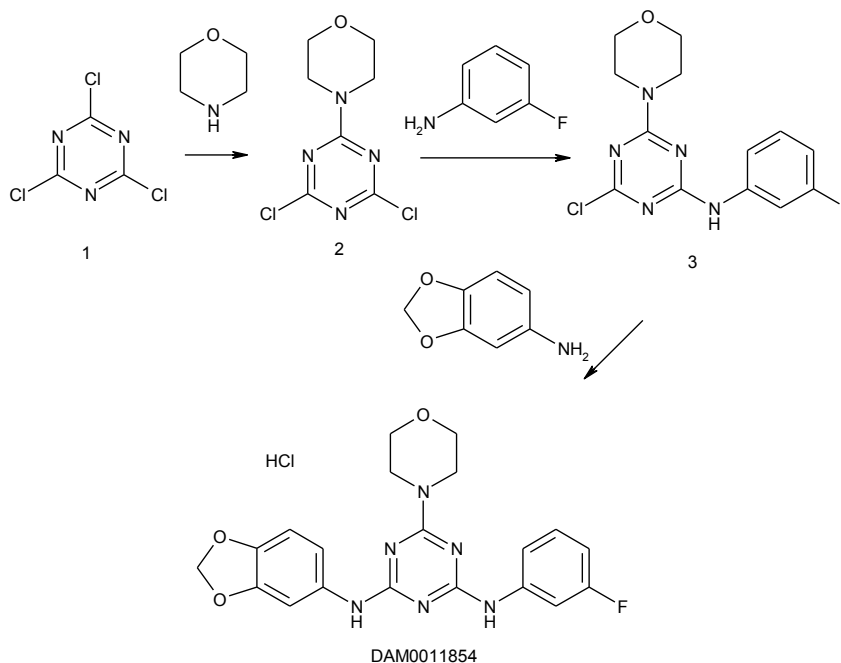
Протівірусна активність гідрохлориду N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну щодо вірусу грипу IVA(H1N1) штаму California/07/2009

Структура	Тип вірусу	Методики оцінки	* Концентрації, мкг/мл		
			EC ₅₀	IC ₅₀	SI
	A(H1N1) штаму California/07/2009	За нейтральним червоним	0,31	>100	>320
		Візуальна перевірка	0,075	39	520
	A(H1N1) штаму California/07/2009	За нейтральним червоним	1	>320	>320
		Візуальна перевірка	1,8	>320	>180

*Примітка: EC₅₀, IC₅₀, SI - визначаються згідно з наведеними в експериментальній частині методиками.

Відповідно до результатів скринінгу, наведених у таблиці, пригнічення вірусу А (H1N1) гідрохлоридом N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну у пробі за нейтральним червоним виражене концентрацією EC₅₀, становить 0,31 мкг/мл і це в 3,2 рази менше за концентрацію дози порівняно з рибавірином, індекси селективності досліджуваної речовини та препарату порівняння рівні і становлять SI>320. Аналіз активності даної сполуки за візуальною методикою підтвердив активність, знайдену у пробі за нейтральним червоним, і результат пригнічення вірусу виявився вищим: EC₅₀ становить 0,075 при індексі селективності SI=520, що у 2,8 рази перевищує SI препарату порівняння рибавіріну.

Заявлений гідрохлорид N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011854) отримують з високим виходом за наведеною схемою:



Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. 2,4-Дихлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин (2) був одержаний по методиці [3] взаємодією ціанурхлориду (1) з морфоліном у середовищі ацетону при 5 °С.

Приклад 2. Гідрохлорид N-бензо[1,3]діоксол-5-їл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну (DAM0011854): До розчину 4,7 г (0,02 моля) 2,4-дихлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазину (2) в 50 мл диметил-формаміду при перемішуванні додавали послідовно 2,76 г (0,02 моль) поташу та 1,92 мл (0,02 моль) 3-фтораніліну. Реакційну суміш перемішували при температурі 20 °С 2 години та виливали в 250 мл води. Осад відфільтровували, промивали водою, сушили. Отримували 4,96 г (4-хлор-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2-їл)-(3-фторфеніл)-аміну (2), який без додаткової очистки та ідентифікації розчиняли в 50 мл тетрагідрофурану. До одержаного розчину при перемішуванні додавали 2,20 г (0,016 моля) бензо[1,3]діоксол-5-аміну. Реакційну суміш перемішували 4 години при температурі 40 °С, охолоджували. Осад, що утворився, відфільтровували та кристалізували з етанолу. Вихід становить 5,63 г (63 %). T_{пл}=170-172 °С. Знайдено, %: N=18,5 C₂₀H₂₀ClFN₆O₃. Вирахувано, %: N=18,8. Спектр ПМР (DMSO-d₆, TMC): 3,65 (м, 4H), 3,74 (м, 4H), 6,01 (с, 2H, CH₂), 6,81-7,72 (м, 7H, ароматичні протони), 9,70 (уш. с, 1H, NH), 9,95 (уш. с, 1H, NH), 10,4 (с, 1H, NH).

Приклад 3. Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIAID) у Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama).

Для оцінки протівірусної активності сполуки (DAM0011854) використано наступні методики.

А. Стандартна проба: Первинний аналіз активності досліджуваної сполуки за пригніченням вірусу з визначення цитопатичного ефекту.

Аналіз проводять у 96-лункових плоскодонних мікропалетах. Для визначення цитопатичного ефекту кожен з чотирьох розчинів досліджуваної сполуки, що розбавлено до концентрацій 1000, 100, 10, 1 мкг/мл, наносять у три лунки, що містять моношар з досліджуваними клітинами. Через 5 хвилин у лунки засівають розчин з культурою вірусу і інкубують за температури 37 °С

протягом часу, за який цитопатичний ефект у досліджуваних пробах розвинеться (зазвичай від 72 до 120 год.). Паралельно з тестом досліджуваної сполуки на тій же палеті у лунках ставляться контрольні проби з препаратом порівняння, активність якого щодо конкретного вірусу встановлено достовірно. Сполуки, що проявили активність за первинною пробою, піддаються аналогічному аналізу за умови подальшого розбавлення їх концентрацій. Дані виражаються як 50 % ефективної концентрації (EC50). Активність кожної з досліджуваних сполук виражається індексом селективності (SI), що є відношенням IC50 до EC50. Позитивним вважається результат, у якому сполука проявила SI порядку 10 і більше.

В. Стандартна проба: Візуальна оцінка за поглинанням барвника нейтрального червоного (NR).

Цей тест проводиться для перевірки пригнічення вірусу (CPE), що отримано в першому тесті за нейтральним червоним, з використанням тієї ж 96-лункової мікропалети, після зчитування з неї результатів CPE. До середовища додають нейтральний червоний. Клітини, не пошкоджені вірусом, вбирають більшу кількість барвника. Результат зчитується оптичним комп'ютеризованим приладом. EC50 визначається за кількістю поглинутого барвника.

Методи аналізу цитотоксичності:

А. Візуальне спостереження

Для випробування пригнічення клітин досліджуваною речовиною дві лунки неінфікованих клітин, обробляються двома різними концентраціями тестової сполуки і паралельно ставиться тест на двох лунках з інфікованими клітинами, які обробляються тими ж двома концентраціями сполуки.

Одночасно з візуальним визначенням цитопатичного ефекту на інфікованих лунках з клітинами за допомогою мікроскопа для порівняння проводиться візуальний мікроскопічний контроль токсичності на предмет виявлення будь-яких змін у зовнішньому вигляді клітин порівняно з неінфікованими клітинами на тій же палеті.

Цитотоксична концентрація 50 % пригнічення клітин визначається з регресійного аналізу одержаних даних щодо токсичності та позначається як IC50.

В. Визначення токсичності за поглинанням барвника нейтрального червоного.

На описаній вище стадії тестування досліджуваної сполуки за барвником нейтральним червоним при визначенні EC50, як кількісної оцінки цитопатичного пригнічення вірусу, на тій же палеті ставляться дві лунки для контролю токсичності, до яких додається нейтральний червоний, після чого спектрофотометрично вимірюється інтенсивність забарвлення, за яким проводиться визначення 50 % концентрації пригнічення клітин за нейтральним червоним - IC50.

Джерела інформації:

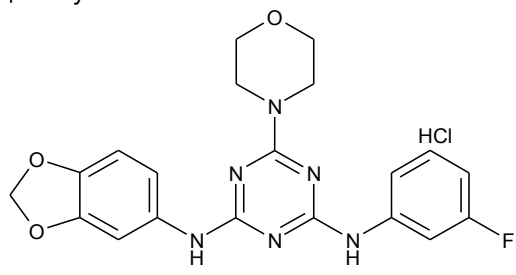
1. Шубин И.В., Чучалин А.Г. Диагностика и лечение острых респираторных вирусных инфекций, гриппа и гриппозной пневмонии. Режим доступа: http://www.poliklin.ru/imagearticle/201102_lek/78-81.pdf.

2. Dr Fatima, Danielle Iuliano, Carrie Reed, Martin I Meltzer, David K Shay. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. The Lancet Infectious Diseases, Volume 12, Issue 9, Pages 687-695.

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Гідрохлорид N-бензо[1,3]діоксол-5-іл-N¹-(мета-фторфеніл)-6-морфолін-4-іл-[1,3,5]триазин-2,4-діаміну:



що проявляє антивірусну активність щодо вірусу грипу А (H1N1).

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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