

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ № 118684

**ГІДРОХЛОРИДИ 2,4-ДИМОРФОЛІНО-6-АРИЛАМІНО-
[1,3,5]ТРИАЗИНІВ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ АНТИВІРУСНУ
АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ДО КОРОНАВІРУСУ АТИПОВОЇ
ПНЕВМОНІЇ SARS**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **28.08.2017**.

Заступник міністра економічного розвитку і торгівлі України

М.І. Тітарчук



- (21) Номер заявки: **u 2017 00320**
- (22) Дата подання заявки: **12.01.2017**
- (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **28.08.2017**
- (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **28.08.2017, Бюл. № 16**

- (72) Винахідники:
Демченко Анатолій Михайлович, UA,
Суховєєв Володимир Володимирович, UA,
Барчина Олена Ігорівна, UA,
Абу Шарк Амжад Ібрагім, UA,
Бобкова Людмила Станіславівна, UA

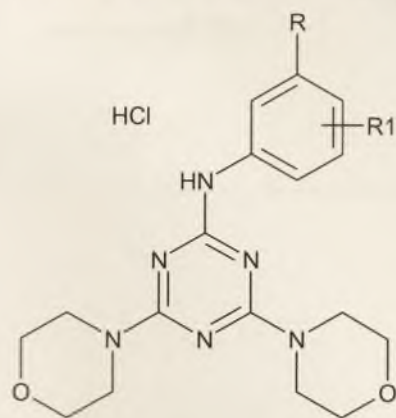
- (73) Власник:
НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ,
вул. Графська, 2, м. Ніжин,
16602, UA

- (54) Назва корисної моделі:

ГІДРОХЛОРИДИ 2,4-ДИМОРФОЛІНО-6-АРИЛАМІНО-[1,3,5]ТРИАЗИНІВ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ДО КОРОНАВІРУСУ АТИПОВОЇ ПНЕВМОНІЇ SARS

- (57) Формула корисної моделі:

Гідрохлориди 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів,



де R, R₁=H, CH₃, Cl,

що виявляють антивірусну активність відносно до коронавірусу атипової пневмонії SARS.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118684** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 251/00
A61P 11/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

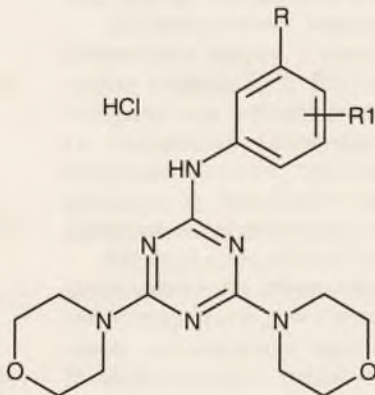
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00320	(72) Винахідник(и): Демченко Анатолій Михайлович (UA), Суховєєв Володимир Володимирович (UA), Барчина Олена Ігорівна (UA), Абу Шарк Амжад Ібрагім (UA), Бобкова Людмила Станіславівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.01.2017	(73) Власник(и): НІЖИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИКОЛИ ГОГОЛЯ, вул. Графська, 2, м. Ніжин, 16602 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	(74) Представник: Москаленко Олег Вадимович
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	

(54) ГІДРОХЛОРИДИ 2,4-ДИМОРФОЛІНО-6-АРИЛАМІНО-[1,3,5]ТРИАЗИНІВ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ АНТИВІРУСНУ АКТИВНІСТЬ ВІДНОСНО ДО КОРОНАВІРУСУ АТИПОВОЇ ПНЕВМОНІЇ SARS

(57) Реферат:

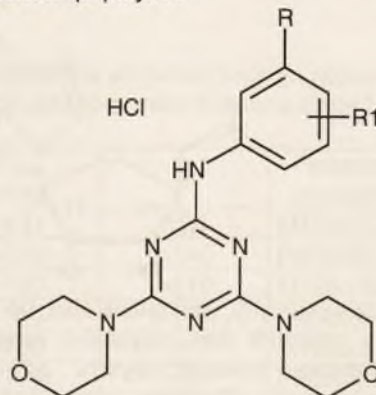
Гідрохлориди 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів,



де R, R₁=H, CH₃, Cl,
що виявляють антивірусну активність відносно до коронавірусу атипової пневмонії SARS.

UA 118684 U

Патент на корисну модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до фармакологічних засобів, зокрема, одержання біологічно активних 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів загальної формули:



5 де R, R₁ = H, CH₃, Cl,

що виявляють антивірусну активність. Це дозволяє передбачити їх використання у практичній медицині як антивірусні лікарські засоби, а саме для лікування атипової пневмонії, викликаної вірусом SARS [1].

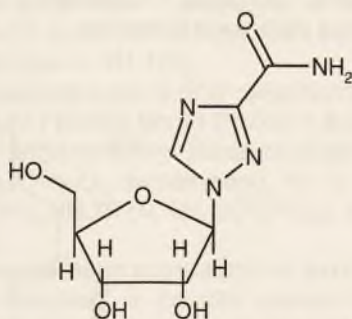
10 Відомо, що вірус SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome - важкий гострий респіраторний синдром або ВГРС) належить до коронавірусів і є новим інфекційним захворюванням, яке виникло в 2002 році в Південному Китаї [2]. Офіційно повідомлено про 8422 випадки захворювання, з яких понад 900 мали летальний характер. Після 2004 р. повідомлень про захворювання на SARS не було.

15 Він викликає важку пневмонію, що викликано геморагічним токсичним набряком легень. Крім того, ВГРС може викликати респіраторний дистрес-синдром, бронхоектатичну хворобу, міокардит, гостру ниркову недостатність та гепатит. Тому вірус характеризується швидким розвитком хвороби та високою летальністю. Інкубаційний період SARS-CoV продовжується 2-10 днів і характеризується підвищенням температури тіла хворого до 38 °С та неспецифічними грипоподібними симптомами, а саме: ознобом, головним болем, діареєю, біллю у горлі, нежиттю, нездужанням і м'язовими болями. Далі з'являється сухий кашель, ядуха, інфекції верхніх дихальних шляхів. У важких випадках розвивається дихальна недостатність і гострий респіраторний дистрес-синдром та лімфопенія.

25 Захворювання поширюється повітряно-крапельним та побутово-контактним шляхами. Виявлення вірусу у фекаліях та сечі хворих не виключає можливість і фекально-орального шляху передачі [3]. Віруси потрапляють до клітин альвеолярного епітелію, у цитоплазмі яких і відбувається реплікація вірусу. Дія вірусу викликає підвищення проникності клітинних мембран та посилений транспорт рідини, збагаченої білком у інтерстеціальну тканину легень та міжальвеолярний простір. При цьому руйнується сурфактант, що призводить до колапсу альвеол, в результаті чого порушується газообмін. У результаті цього розвивається важка дихальна недостатність, яка є основною причиною смерті у гострій фазі хвороби [1-3].

30 Методи специфічної терапії, ефективність яких підтверджено, відсутні. Зазвичай, проводять симптоматичне лікування інфекцій коронавірусів, яке включає традиційний набір методів, що застосовуються для лікування важких та середньо-важких форм пневмонії невідомої етіології, а саме: протівірусні препарати, зазвичай - рибавірин та стероїдні гормональні препарати. 35 Випробовуються також як специфічні засоби проти SARS-CoV ціла група інгібіторів, в число яких входять: інгібітори РНК-залежної РНК-полімерази; інгібітори вірус-кодованих протеаз (наприклад, лікарський засіб M128533 - як інгібітор протеази [4]); інгібітори речовин, що відповідають за приєднання вірусів до специфічних рецепторів на клітинній поверхні [3].

40 Препарати типу рибавірину іноді можуть знижувати смертність. Його застосовують для лікування важкої інфекції, викликаної респіраторним синцитіальним вірусом, вірусним гепатитом С, а також при багатьох вірусних лихоманках та пневмонії. Рибавірин є активним у формі метаболіту, бо має структуру, що подібна до нуклеотиду [5]:



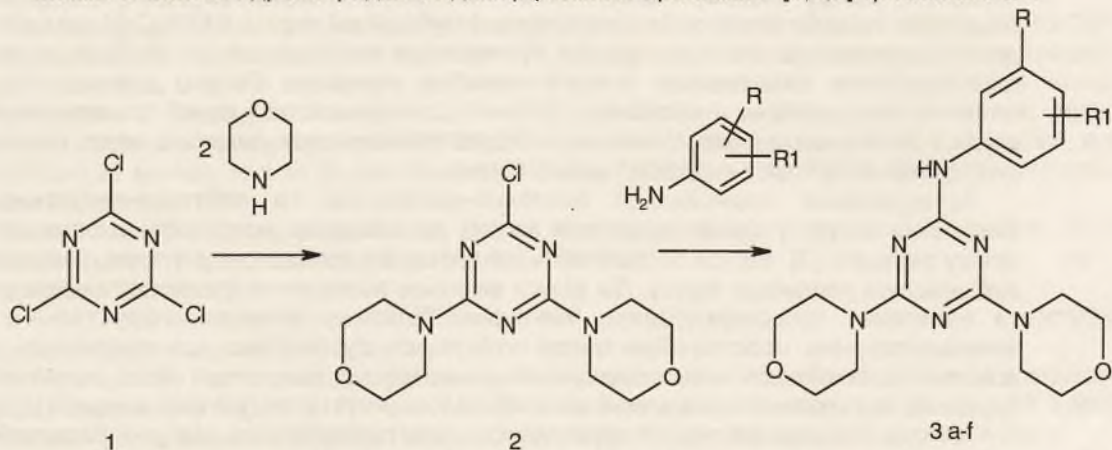
Він порушує реплікацію вірусу, механізм якої не встановлений. У США та Великобританії рибавірин призначають орально для лікування гепатиту С у поєднанні з інтерферонами. У формі аерозолу рибавірин використовують для лікування захворювань респіраторним синцитіальним вірусом у дітей. Питання доцільності застосування рибавіріну залишається відкритим, бо він має виражену негативну побічну дію і у деяких хворих відзначалося погіршення стану після прийому цього препарату [6].

Одним із побічних ефектів рибавіріну 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 [5].

В основу патенту на корисну модель поставлена задача пошуку нових біологічно активних сполук з протівірусною активністю, що перешкоджають реплікації вірусу та можуть лікувати хворобу, викликану вірусом SARS.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові біологічно активні сполуки запропоновані гідрохлориди 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів 3 а-f, які отримують із середніми виходами при використанні відомих синтетичних підходів у декілька стадій (схема 1).

Схема 1. Синтез гідрохлоридів 2,4-диморфоліно-6-ариламіно- [1,3,5] триазинів 3 а-f.



де 3a: R=CH₃ R₁=H; 3b: R=HR₁=4-C1; 3c: R=HR₁=4-COOCH₃; 3d: R=CH₃ R₁=4-CH₃; 3e: R=C1 R₁=4-CH₃; 3f: R=CH₃ R₁=5-CH₃.

Синтезовані сполуки 3a-f є кристалічними речовинами білого кольору, що розчинні у ДМФА.

Склад і хімічну будову сполук 3a-f доведено даними методу ЯМР ¹H спектроскопії. Спектри ЯМР ¹H синтезованих сполук записані на приладі Bruker-300, робоча частота - 300 МГц, розчинник - ДМСО-d₆, внутрішній стандарт - TMC.

Експериментальне визначення протівірусної активності було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США (NIH/NIH) у Південному дослідному інституті США (Southern Research Institute-SRI, Birmingham, Alabama). Ефективність одержаних сполук 3a-f щодо вірусу SARS-CoV виражали показниками EC₅₀, IC₅₀ та SI. Результати досліджень наведено в табл. 1.

Противірусна активність щодо коронавірусу SARS
похідних 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів (3a-f)

Сполуки	EC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	Препарати порівняння	EC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
3a	0.29	47	160	M128533	0.81	>100	>120
	0.71	>100	>140	Рибавірин	0.51	>100	>200
3b	0.32	>100	>310	M128533	0.81	>100	>120
	0.71	>100	>140	Рибавірин	0.51	>100	>200
3c	0.29	>100	>340	M128533	0.81	>100	>120
	4.9	>100	>20	Рибавірин	0.51	>100	>200
3d	0.31	>100	>320	M128533	0.81	>100	>120
	0.42	>100	>240	Рибавірин	0.51	>100	>200
3e	0.32	>100	>310	M128533	0.81	>100	>120
	0.55	>100	>180	Рибавірин	0.51	>100	>200
3f	0.18	>100	>560	M128533	0.81	>100	>120
	2	>100	>50	Рибавірин	0.51	>100	>200

Примітки:

1. EC₅₀ - 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. IC₅₀ - концентрація, при якій інгібування клітин організму речовиною складає 50 %. Виражається у мкг/мл.
3. SI - індекс селективності, що є показником ефективності препарату, та виражається співвідношенням IC₅₀ до EC₅₀.

Приклади конкретного виконання.

5 2-Хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазин 2 був одержано взаємодією ціанурхлориду 1 з морфоліном в розчині ацетону за методикою [7].

10 Приклад 1. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(3¹-метилфеніламіно)-[1,3,5]триазину 3a одержано за видозміненою методикою [8]: до розчину 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 в 40 мл ацетонітрилу при перемішуванні додають 0.535 г (0.005 моль) мета-толуїдину. Після чого суміш кип'ятять протягом трьох годин. Реакційну суміш охолоджують і осад, що випав, відфільтровують та кристалізують з пропанолу-2. Вихід 1.45 г (74 %). T_{пл}=220-221 °C. Знайдено, %: N 21.1; Cl 8.92. C₁₈H₂₅C₁N₆O₂. Вирахувано, %: N 21.4; Cl 9.03. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 2/29 (с, 3H, CH₃); 3.72 (м, 8H, 2N(CH₂)₂), 3.74 (м, 8H, 2O(CH₂)₂), 6.85 (д, 1H, Ph), 7.17 (т, 1H, Ph), 7.45 (д, 1H, Ph), 7.50 (с, 1H, Ph); 9,93 (уш. с. 1H, NH).

15 Приклад 2. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(4¹-хлорфеніламіно)-[1,3,5]триазину 3b одержано аналогічно сполуці 3a з 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 та 0.638 г (0,005 моль) парахлораніліну. Вихід складає 1.67г (81 %). T_{пл}=218-219 °C. Знайдено, %: N 20.1, Cl 17.5. C₁₇H₂₂Cl₂N₆O₂. Вирахувано, %: N 20.3, Cl 17.2. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 3.72 (м, 8H, 2N(CH₂)₂), 3.74 (м, 8H, 2O(CH₂)₂), 7.37 та 7,67 (д-д, 4H, C₆H₄), 9.98 (уш. с. 1H, NH).

20 Приклад 3. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(4¹-карбометоксифеніл-аміно)-[1,3,5]триазину 3c одержано аналогічно сполуці 3a з 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 та 0.755 г (0,005 моль) метилового естеру параамінобензойної кислоти. Вихід складає 1.49г (68 %). T_{пл}=206-207 °C. Знайдено, %: N 19.0, Cl 7.98. C₁₉H₂₅ClN₆O₄. Вирахувано, %: N 19.2, Cl 8.12. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 3.72 (м, 8H, 2N(CH₂)₂), 3.74 (м, 8H, 2O(CH₂)₂), 3.86 (с, 3H, COOCH₃), 7.81 та 7.92 (д-д, 4H, C₆H₄), 10.1 (уш. с. 1H, NH).

25 Приклад 4. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(3¹,4¹-диметилфеніл-аміно)-[1,3,5]триазину 3d одержано аналогічно сполуці 3a з 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 та 0.605 г (0,005 моль) 3,4-диметилфеніламіну. Вихід складає 1.53 г (75 %). T_{пл}=194-195 °C. Знайдено, %: N 20.4, Cl 8.87. C₁₉H₂₇ClN₆O₂. Вирахувано, %: N 20.6, Cl 8.72. ЯМР ¹H (δ, м.ч.): 2.17 (с, 3H, CH₃), 2.19 (с, 3H, CH₃), 3.71 (м, 8H, 2N(CH₂)₂), 3.73 (м, 8H, 2O(CH₂)₂), 7.06 (д, 1H, Ph), 7.37 (с, 1H, Ph), 7.38 (д, 1H, Ph); 9,95 (уш. с. 1H, NH).

30 Приклад 5. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(3¹-хлор-4¹-метилфеніл-аміно)-[1,3,5]триазину 3e одержано аналогічно сполуці 3a з 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-

[1,3,5]триазину 2 та 0.605 г (0,005 моль) 3-хлор-4-метилфеніламіну. Вихід складає 1.53 г (75 %). $T_{\text{пл.}}=201-202$ °C. Знайдено, %: N 20.0, Cl 16.8. $C_{18}H_{24}Cl_2N_6O_2$. Вирахувано, %: N 19.7, Cl 16.6. ЯМР 1H (δ , м.ч.): 2.23 (с. 3H, CH_3), 3.72 (м, 8H, $2N(CH_2)_2$), 3.74 (м, 8H, $2O(CH_2)_2$), 7.28 (д, 1H, Ph), 7.48 (д, 1H, Ph), 7.81 (с. 1H, Ph), 9.89 (уш. с. 1H, NH).

5 Приклад 6. Гідрохлорид 2,4-диморфоліно-6-(3',5'-диметилфеніл-аміно)-[1,3,5]триазину 3f одержано аналогічно сполуці 3a з 1.43 г (0.005 моль) 2-хлор-4,6-диморфолін-4-іл-[1,3,5]триазину 2 та 0.605 г (0,005 моль) 3,5-диметилфеніламіну. Вихід складає 1.49 г (73 %). $T_{\text{пл.}}=190-191$ °C. Знайдено, %: N 20.3, Cl 8.65. $C_{19}H_{27}ClN_6O_2$. Вирахувано, %: N 20.6, Cl 8.72. ЯМР 1H (δ , м.ч.): 2.22 (с. 6H, $2CH_3$), 3.73 (м, 8H, $2N(CH_2)_2$), 3.75 (м, 8H, $2O(CH_2)_2$), 6.67 (с, 1H, Ph), 7.37 (с, 1H, Ph), 7.28 (с. 2H, Ph), 9.61 (уш. с. 1H, NH).

10 Приклад 7. Експериментальне визначення противірусної активності синтезованих сполук 3a-f до коронавірусу SARS було проведено в рамках скринінгової програми Національного Інституту Здоров'я США. Для визначення противірусної активності сполук 3a-f був проведений тест *in vitro* з використанням клітин Vero [9, 10].

15 Клітини Vero 76 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 штам Urbani коронавірусу SARS, скорегований до необхідної концентрації. Кожну із сполук (3a-f), противірусний засіб Рибавірин (Sigma) та M128533 (інгібітор протеази для вірусу атипової пневмонії) розчиняли у ДМСО, додавали до кожної лунки до кінцевої концентрації від 0,1 до 100 мкг/мл. Після культивування протягом 48 год. клітини Vero 76 спостерігали в мікроскоп. Після додавання 100 мкл 70 % ацетону кожну лунку витримували при -20 °C протягом 1 год. Після висушування в сушильній шафі додавали 100 мкл 0,4 % (w/v) розчину SRB (сульфородаміну Б), розчиненого в 1 % (v/v) оцтової кислоті. Після 30 хв. забарвлення розчин SRB, що не зв'язався з

25 клітинами, чотири рази промивали 1 % (v/v) оцтовою кислотою. Після висушування в кожну лунку додавали 100 мкл 10 мМ розчину Tris (рН 10,5) для розчинення забарвлюючої речовини на дні лунки. Для оцінки противірусної активності вимірювали оптичну густину. Як контроль використано лунки, у які не внесено клітини, з вірусом без сполуки і в які не внесено ні вірус, ні сполуку (контроль культури клітин) [10], а як препарати порівняння - рибавірин та M128533.

30 Відповідно до результатів скринінгу, наведених у табл. 1, пригнічення вірусу SARS-CoV гідрохлоридами 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів 3a-f, що виражене концентрацією EC_{50} , становить 0.42-4.9 мкг/мл, а у рибавірині він складає 0.51 мкг/мл, тоді як індекс селективності SI знаходиться в межах $>20 \rightarrow 240$ (у рибавірині $\rightarrow 200$). У дослідженнях, де за препарат порівняння використано M128533, EC_{50} для сполук (3a-f) складає 0.18-0.32 мкг/мл, а у M128533-0.81 мкг/мл, тоді як SI для (3a-f) перевищує 160-560, а у M128533 він у 1.33-4.46 разу менший і складає >120 .

Таким чином, запропонований ряд нових біологічно активні сполуки, які можуть бути потенційними противірусними засобами щодо SARS-CoV.

Джерела інформації:

- 40 1. SARS coronavirus. [Електронний ресурс]. - Режим жоступу: https://en.wikipedia.org/wiki/SARS_coronavirus/ - Назва з екрану.
2. Печінка А.М. Гострі респіраторні захворювання: питання клінічної діагностики та лікування (лекція): лікарю-практику/ А.М. Печінка, М.І. Дземан. // Український медичний часопис. № 5 (79) IX/X 2010. - [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://www.umj.com.ua>. - Назва з екрану.
- 45 3. Короваева И.В. Новый коронавирус - возбудитель атипичной пневмонии / И.В.Короваева, С.И.Вовк, Л.А.Панченко // Анали Мечниковського Інституту, № 1, 2005. - С 66-74.
4. Нетесов С.В. Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), вызываемый коронавирусом / С.В.Нетесов, В.М.Блинов, Т.Ю.Иванькина и др. // ГНЦ ВБ "Вектор", Кольцово, Новосибирск, Россия.
- 50 5. Patent WO2016012536A1-Gak modulators as antivirals-Google [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://google.com/patents/WO2016012536A1?c1=zh-cn/>. - Назва з екрану.
6. Рибавирин. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B8%D0%B1%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD/> - Назва з екрану.
- 55 7. Misawa, Takashi; Salim, Mohammed T.A.; Okamoto, Mika; Baba, Masanori; Aoyama, Hiroshi; Hashimoto, Yuichi; Sugita, Kazuyuki. Synthesis and anti-hepatitis C virus activity of morpholino triazine derivatives. Heterocycles, 2010, vol.81, #6 p. 1419-1428.
8. Zhou Z. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,3,5-triazines Derivatives as Potent Antitumor Agents / Zhou Z., Zhang Y., Yan N. et al. // Med Chem-2015. - V. 5(8). - P. 345-350.

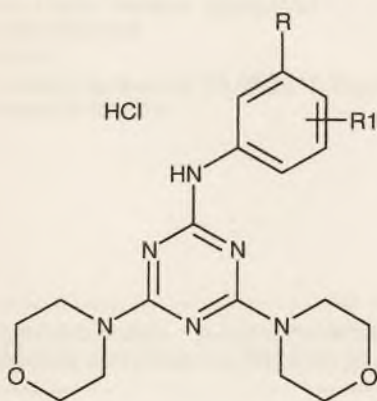
[Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.1000284> - Назва з екрану.

9. Lucas-Hourani, M, Munier-Lehmann, H., Helynck, O., Komarova, A., Despres, P., Tangy, F., et al. High-throughput Screening for Broad-spectrum Chemical Inhibitors of RNA Viruses. *J. Vis. Exp.* (87), e51222, doi:10.3791/51222 (2014). [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://www.jove.com/video/51222/high-throughput-screening-for-broad-spectrum-chemical-inhibitors-rna> - Назва з екрану.

10. Пат. № 100048 Україна, МПК С07D 253/065 С07D 295/00 (2013.01) N, N¹-Біс-бензо[1,3]діоксол-5-їл-6-морфолін-4-їл-[1,3,5]триазин-2,4-діамін, що проявляє антивірусну активність відносно до вірусу Н1N1 / А.М. Демченко, В.В.Суховєєв, Р.С. Шаїнова, В.А. Синицин - № u201413249; Заявл. 10.12.2014; Опубл. 10.07.2015, Бюл. № 13.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Гідрохлориди 2,4-диморфоліно-6-ариламіно-[1,3,5]триазинів,



- 20 де R, R₁=H, CH₃, Cl,
що виявляють антивірусну активність відносно до коронавірусу атипової пневмонії SARS.