



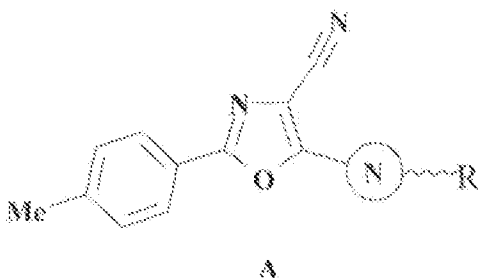
УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122938** (13) **C2**
(51) МПК*C07D 263/50* (2006.01)*C07D 263/02* (2006.01)*A61P 31/12* (2006.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

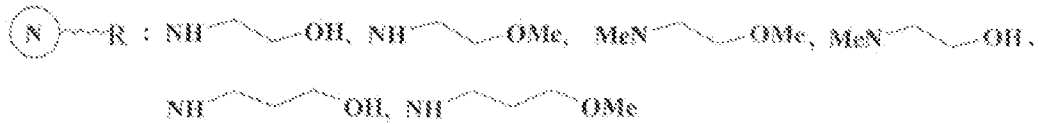
(21) Номер заявки: а 2019 03531	(72) Винахідник(и): Качаєва Марина Володимирівна (UA), Прокопенко Володимир Михайлович (UA), Пільо Степан Григорович (UA), Мітюхін Олег Петрович (UA), Броварець Володимир Сергійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.04.2019	(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ ІМ. В.П. КУХАРЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Мурманська, 1, м. Київ-94, 02094 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 21.01.2021	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Kozachenko A.P., Shablykin O.V., Brovarets V.S. Synthesis of 4-alkyl-2-aryl-1,3-oxazole[5,4-d]pyrimidine-7(4H)-thiones and 6-alkyl-2-aryl-1,3-oxazole[5,4-d]pyrimidine-7(6H) ones from 2-arylamino-3,3-dichloroacrylonitriles / Russian Journal of General Chemistry. – 2012. – Vol. 82. – No. 4. – pp. 739-743 WO 2004/052363 A1 US 3 670 007 A
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.03.2020, Бюл.№ 5	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 20.01.2021, Бюл.№ 3	

(54) ЗАСТОСУВАННЯ 5-ГІДРОКСІАЛКІЛАМІНО-2-(4-МЕТИЛФЕНІЛ)-1,3-ОКСАЗОЛ-4-КАРБОНІТРИЛІВ ЯК НОВИХ АГЕНТІВ ПРОТИ ЛЮДСЬКОГО ЦИТОМЕГАЛОВІРУСУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до області одержання фармацевтичних препаратів. Предметом його є похідні 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів (А), які можуть бути новими агентами проти людського цитомегаловірусу (HCMV).

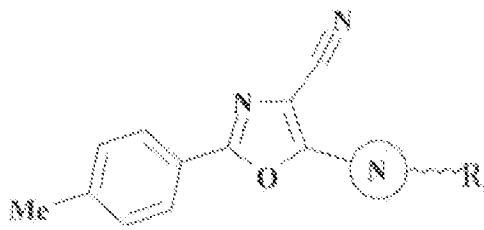


UA 122938 C2

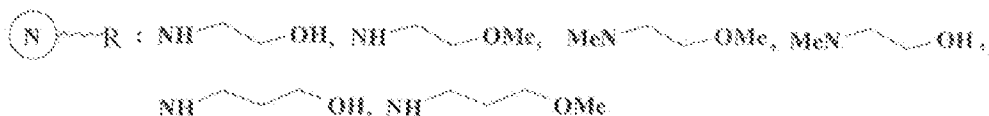


Показана *in vitro* висока антивірусна активність окремих похідних 1,3-оксазолу ($\text{EC}_{50} < 0,05 \text{ мкМ}$) проти стандартного лабораторного штаму (AD-169) і резистентного ізоляту HCMV (GDGr K17) у порівнянні із відомим препаратом Ганцикловіром. Ці результати свідчать про те, що похідні 1,3-оксазолу (A) можуть бути використані для розробки нових препаратів проти HCMV.

Винахід належить до області одержання фармацевтичних препаратів. Предметом його є похідні 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів (А), які можуть бути новими агентами проти людського цитомегаловірусу (HCMV).



A



5

Людський цитомегаловірус є широко розповсюдженим патогеном серед людей, що мають проблеми з роботою імунної системи [1-3]. Ним інфіковані приблизно 60 % людей у розвинених країнах світу та понад 99 % у країнах, що розвиваються [4]. На сьогоднішній день доступної вакцини проти цитомегаловірусу людини немає і анти-HCMV препарати та імунотерапія є єдиними методами лікування та профілактики захворювань HCMV [5-7]. Але навіть схвалені Управлінням з питань харчових продуктів і медикаментів антивірусні препарати показали побічну дію та резистентність патогену до ліків [8, 9]. Все це вказує на те, що задача пошуку нових анти-HCMV препаратів є актуальною.

10

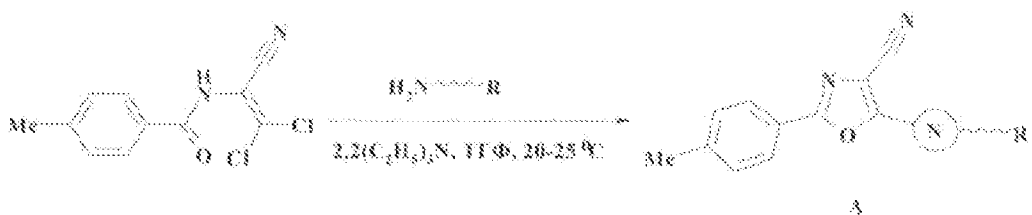
В основу винаходу покладено синтез та тестування серії нових хімічних сполук, які є похідними 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів (А). Поставлена задача вирішується тим, що були синтезовані нові представники таких гетероциклічних сполук та протестовано їх анти-HCMV активність. Результати біологічних досліджень вказують на те, що похідні 1,3-оксазолу загальної формули (А) можуть бути взяті за основу у пошуку нових активних анти-HCMV препаратів.

15

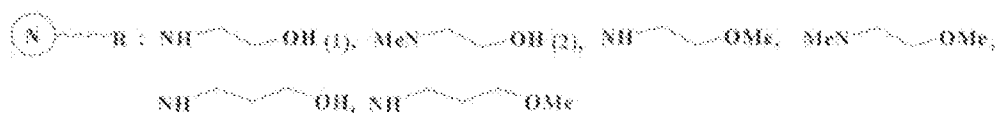
1 Синтез сполук А

20

1.1 Синтез нових похідних 5-аміно-1,3-оксазол-4-карбонітрилу загальної формули (А) проводили за відомою методикою [10] взаємодією 2-ациламіно-3,3-дихлороакрилонітрилів [11] із відповідними амінами у присутності надлишку триетиламіну (Схема 1).



A



25

Схема 1. Синтез 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів (А)

Методика синтезу 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів загальної формули (А) (1, 2). До розчину N-(2,2-дихлор-1-ціановініл)-4-метилбензаміду (0,01 моль) в 40 мл безводного тетрагідрофурану послідовно додають триетиламін (0,022 моль) та відповідний амін (0,011 моль). Суміш перемішують при 20-25 °С протягом 12 годин. Розчинник видаляють у вакуумі, залишок обробляють 100 мл води, осад, що випав, відфільтровують, висушують і сполуки (1, 2) очищують перекристалізацією з етанолу.

30

1.2 Винахід підтверджується наведеними нижче прикладами

5-(2-Гідроксіетиламіно)-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрил (1).

35

Безбарвні кристали (вихід 67 %). Тпл. 131-133 °С. ІЧ (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1650. 2215 (CN), 2900-3600 (NH, OH). ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 2,35 (с, 3H, CH₃), 3,41 (м, 2H, CH₂), 3,60 (м, 2H,

CH₂), 4,91 (м, 1H, OH), 7,30-7,70 (м, 4H, ArH), 8,42 (уш.с, 1H, NH). M/z [M+1]⁺: 244. Розраховано для C₁₃H₁₃N₃O₂: C, 64,19; H, 5,39; N, 17,27. Знайдено: C, 64,26; H, 5,47; N, 17,35 %.

5-(2-Гідроксіетилметиламіно)-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карболіт-рил (2). Безбарвні кристали (вихід 70 %). T_{пл.} 104-106 °C. 14 (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1048, 1634, 2198 (CN), 3446 (OH). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 2,34 (с, 3H, Me), 3,21 (с, 3H, NMe), 3,54-3,57 (м, 2H, CH₂), 3,62-3,65 (м, 2H, CH₂), 4,92 (т, 1H, J=5,2 Гц, OH), 7,30 (д, 2H, J=8,0 Гц, ArH), 7,72 (д, 2H, J=8,0 Гц, ArH). ¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ 21,5; 38,0; 54,0; 59,9; 84,8; 116,8; 123,1; 125,4; 129,5; 140,5; 150,9; 160,5. M/z [M+1]⁺: 258. Розраховано для C₁₄H₁₅N₃O₂: C, 65,36; H, 5,88; N, 16,33. Знайдено: C, 65,28; H, 5,86; N, 16,35 %.

2 Тестування сполук А на антивірусну активність

Робота по оцінюванню протівірусної активності сполук загальної формули (А) проводилася в Національному інституті алергії та інфекційних захворювань (National Institute of Allergy and Infectious Diseases-NIAID) (США).

Біологічні дослідження виконувалися по методиці Viral ToxGlo™ Assay (Promega Corporation, USA), і визначалися індекси вірусного цитопатичного ефекту (CPE) та цитотоксичність. В основу методики покладено кількісне вимірювання клітинного АТФ як міру життєздатності клітини-господаря. При вірусній інфекції зменшення кількості АТФ корелюється з вірусним навантаженням на клітини, а тому визначена кількість АТФ прямо пропорційна кількості життєздатних клітин-господарів у культурі.

Ефективність похідних 1,3-оксазолу, як потенційних протівірусних препаратів, проти нормального лабораторного штаму людського цитомегаловірусу AD-169 та їх цитотоксичність оцінювали на клітинах HFF з використанням аналізу CellTiter-Glo (цитопатичний ефект/токсичність) (Таблиця 1).

Таблиця 1

Протівірусна активність похідних 1,3-оксазолу проти нормального штаму людського цитомегаловірусу, а також резистентного ізоляту (GDGr K17), та їх цитотоксичність.
Концентрація сполук вказана в мкМ.

Сполука	Штам AD169			GDGr K17 (резистентний ізолят)		
	EC ₅₀	CC ₅₀	SI ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	SI ₅₀
1	<0,05	>150	>3125	>30	106,24	<4
2	<0,05	>150	>3125	<0,05	>150	>3125
Ганцикловір	0,32	>150	>463	>150,00	>150,00	1

Контроль та концентрація лікарських засобів змінюються у межах 0,048-150 мкМ. Розчинником є DMSO. Значення EC₅₀ і CC₅₀ представляють собою концентрації сполук, які знижують на 50 % у аналізі CellTiter-Glo (цитопатичний ефект/токсичність) вірусну реплікацію та життєздатність клітин відповідно. Індекс селективності (SI₅₀) розраховується як значення CC₅₀ поділене на значення EC₅₀.

Речовини проявили антивірусну активність проти нормального штаму AD169 HCMV зі значеннями EC₅₀<0,05 мкМ, і загалом показали значно кращу активність за Ганцикловір (EC₅₀=0,32 мкМ) (Таблиця 1). Сполука 2 показала дуже високу активність (EC₅₀<0,05 мкМ) по відношенню до резистентного ізоляту HCMV (GDGr K17) у порівнянні зі стандартним препаратом Ганцикловіром (EC₅₀>150,00 мкМ).

Сполуки 1 і 2, які проявили високу активність проти нормального штаму HCMV при первинних аналізах *in vitro*, були відібрані для подальших досліджень. При цьому вплив сполук 1 і 2 на реплікацію вірусу і цитотоксичність клітин у культурі HFF було досліджено за допомогою методу нейтрального червоного.

На відміну від первинного аналізу, протівірусна активність цих сполук проти нормального та резистентного ізоляту GDGr K17 HCMV була меншою, ніж у контрольного препарату (Таблиця 2).

У цьому дослідженні сполука 1 показала ідентичну протівірусну активність проти нормального штаму AD169 і резистентного ізоляту GDGr K17, яка більше ніж для сполуки 2, але менше ніж для контрольного препарату.

Таким чином, результати досліджень *in vitro* антивірусної активності та цитотоксичності похідних 1,3-оксазолу із залишком аміноетанолу показали, що вони проявляють значно вищу антивірусну активність (EC₅₀ < 0,05 мкМ) проти стандартного лабораторного штаму (AD-169) і резистентного ізоляту HCMV (GDGr K17) у порівнянні із Ганцикловіром як стандартом.

Таблиця 2

Противірусна активність та цитотоксичність похідних 1,3-оксазолу за методом нейтрального червоного. Концентрації сполук представлена в мкМ.

Сполука	EC ₅₀	EC ₉₀	CC ₅₀	SI ₅₀	SI ₉₀
	AD 169				
1	>20,00	>20,00	46,70	<2	<2
2	>100,00	> 100,00	>100,00	1	1
Ганцикловір	6,50	17,30	>100,00	>15	>6
GDGr K17 (резистентний ізолят)					
1	>20,00	>20,00	46,70	<2	<2
2	>100,00	> 100,00	>100,00	1	1
Ганцикловір	19,40	>100,00	>100,00	>5	1

Концентрація лікарських засобів змінюється у межах 0,032-100 мкМ, Ганцикловіру - 0,8-100 мкМ. Розчинником є DMSO. Значення EC₅₀ і CC₅₀ (цитопатичний ефект і токсичність) представляють собою концентрації сполук, які знижують на 50 % вірусну реплікацію та життєздатність клітин відповідно. Індекс селективності (SI₅₀) розраховується як значення CC₅₀, поділене на значення EC₅₀.

Перелік посилань

1. Collins-McMillen D., Buehler J., Peppenelli M., Goodrum F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses*. 2018. 10 (8). E444.
2. Li X., Huang Y., Xu Z., Zhang R., Liu X., Li Y., Mao P. Cytomegalovirus infection and outcome in immunocompetent patients in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2018. 18 (1). P. 289.
3. Yong M.K., Lewin S.R., Manuel O. Immune Monitoring for CMV in Transplantation. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2018. 20 (4). P. 4.
4. Griffiths P., Baraniak I., Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J. Pathol* 2015. 235 (2). P. 288-297.
5. Ahmed A. Antiviral Treatment of Cytomegalovirus Infection. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2011. 11 (5). P. 475-503.
6. Tan B.H. Cytomegalovirus Treatment. *Curr. Treat. Options Infect. Dis.* 2014. 6 (3). P. 256-270.
7. Hanson K.E., Swaminathan S. Cytomegalovirus antiviral drug resistance: future prospects for prevention, detection and management. *Future Microbiol.* 2015. 10 (10). P. 1545-1548.
8. Michel D., Mertens T. Antiviral intervention, resistance and perspectives. In: Reddehase M (ed) *Cytomegaloviruses Molecular biology and immunology*. Caister. Academic Press. 2006. P. 573-590.
9. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev. Med. Virol.* 2008. 18 (4). P. 233-461.
10. Kozachenko O., Shablykin O., Brovarets V. Synthesis of 4-alkyl-2-aryl-1,3-oxazole[5,4-d]pyrimidine-7(4)-thiones and 6-alkyl-2-aryl-1,3-oxazole[5,4-d]pyrimidin-7(6)-ones from 2-arylamino-3,3-dichloroacrylonitriles. *Rus. J. Gen. Chem.* 2012. 82(4). P. 739-743.
11. Драч В.С., Свиридов Э.П., Лавренюк Т.Я. Взаимодействие α-ациламино-β,β-дихлоракрилонитрилов с первичными аминами. *ЖОрХ*. 1974. 10(6). С. 1271-1274.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 35 Застосування похідних 5-гідроксіалкіламіно-2-(4-метилфеніл)-1,3-оксазол-4-карбонітрилів загальної формули (А) як нових агентів проти людського цитомегаловірусу

