РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 112811 A
(51) Int.Cl.
A 61 K 31/13 (2006.001)



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 112811 A
(22) Заявено на 09.10.2018
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 04.2 на 2020
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) рег. №

(71) Заявител(и):
ЮЗУ "НЕОФИТ РИЛСКИ", 2700
Благоевград, ул. "Иван Михайлов" 66

(72) Изобретател(и):
Ангел Симеонов Гълъбов; Иванка Георгиева Станкова; Радослав Людмилов Чайров; Кирил Николов Чучков; Александра Иванова Тенчева

(74) Представител по индустриална
собственост:
Д-р Станислава Христова Стефанова, 1799
София, жк "Младост 2" бл. 223, вх. 4, ап. 59

(86) № на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

(54) ИНХИБИТОР НА ВИРУСНАТА НЕВРАМИНИДАЗА И НА М2 ПРОТОННИЯ КАНАЛ

(57) Изобретението се отнася до инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал и представлява съединение с формула 1:
както и до метод за неговото получаване и приложение като средство за профилактика и лечение на вирусни инфекции.

3 претенции, 1 фигура

BG 112811 A

09.10.13

Инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал

Област на изобретението

Настоящето изобретение се отнася до инхибитор на вирусна невраминидаза и на М2 протонния канал, метод за неговото получаване и приложението му за профилактика и лечение на вирусни инфекции.

Предшестващо състояние на техниката

Грипът представлява сериозна вирусна инфекция на респираторния тракт. По данни на СЗО, грипният вирус е отговорен за заболяването на 3 до 5 милиона души и за смъртта на 250 000 до 500 000 души годишно, причинени както директно от вируса, така и от вторични инфекции [1]. През последното столетие три големи пандемии, H1N1 вирус през 1918-19 ("Испански грип"), H2N2 вирус през 1957 и H3N2 вируса през 1968 кумулативно са причина за загуба на приблизително 50 млн души. „Испанският грип" представлява най-тежката пандемия, причинила смъртта на приблизително 20 млн души само през първата година. Последната пандемия- през 2009 известна още като "Мексикански грип" (грипен вирус тип А, H1N1, "свински грип"), се оказа относително безобидна, докато високо патогенния „птичи грипен вирус" (H5N1) през последните години е причина за сериозно безпокойство, т.к. лесно преминава от животните върху хора.

Понастоящем се прилагат два основни (доказани) терапевтични подхода за лечение на грипа или за превенция на инфекциите: 1) ваксини и 2) използване на противовирусни средства.

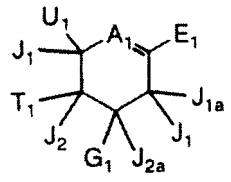
Оказва се, че приложението на ваксините като средство за защита е незадоволително поради антигенната вариация на грипния вирус, което налага търсене и разработване на нови противовирусни лекарствени средства.

Развитието на ефективна химиотерапия на грипа е от първостепенно значение в борбата с това заболяване, но опита с противогрипни химиотерапевтици показва, че лекарствената устойчивост на вируса е основно препятствие за тяхната ефективност. Освен загубата на противовирусна активност на веществата като резултат от възникване на мутации, устойчиви на лекарствата, този феномен показва други неблагоприятни фенотипни прояви, като повишена вирулентност и трансмисионна способност.

Усилената работа в последните 40 години в изследването на вещества с инхибиторен ефект върху различни мишени на грипните вируси е довело до утвърждаването в клинична практика основно на две групи съединения: М2 блокери и невраминидазни инхибитори.

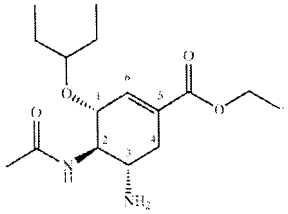
Известно е, че повърхностните мембранни протеини на грипния вирус са изградени от три основни компонента: М2 протонен канал, хемаглутинин (НА) и невраминидаза (NA) [2]. М2 - протонният канал е отговорен за протонната пропускливост, необходима за вирусната репликация. Хемаглутининът е важен за свързването към повърхността на инфектираната клетка, водещо до прикрепване и проникването на вирусите в клетката - мишена, а ензимът невраминидаза е гликопротеин, необходим за освобождаване на новите вирусни частици (вириони), разкъсвайки крайната сиалова киселина от хемаглутининовите им рецептори, така че те да могат свободно да циркулират в тялото и да инфектират други клетки. Следователно всеки един от трите компонента може да бъде мишена при създаване на нови лекарствени средства.

В областта на невраминидазните инхибитори са направени много изследвания с оглед откриване на потенциално нови активни вещества, както и за оптимизиране или модифициране на известни структури, общата цел на които е получаване на вещества с подобрена ефективност или биодостъпност [3-5]. Така например, съгласно международна заявка за патент **WO9626933** са **с**ъздадени невраминидазни инхибитори с обща формула



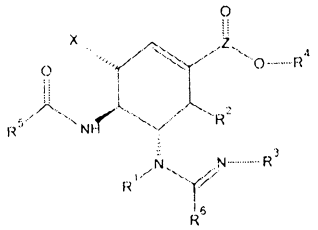
,

където E е $-(CR_1R_1)_{m1}W_1$, а R1 може да бъде Н или алкил с 1 до 12 С атома, W_1 е група включваща кисел Н, защитна група или R_{6c} , което може да бъде Н или аминен остатък, най-често е $-CO_2R_1$, където R_1 е дефинирано по-горе и m1 може да бъде от 0 до 2, най- често 0. Описани са: инхибиторите от изобретението, методите за инхибиране на невраминидазата, както и резултати от противовирусната активност на съединението от изобретението. Активното вещество на база този патент, оселтамивир, е одобрено като лекарствено средство за лечение на вирусни инфекции под името тамифлу.



(1)

Освен това, патент **WO2013060889 о**писва производни на оселтамивира с обща формула (2), които са ефикасни за лечение на грип:



(2)

Където: Z може да е C, а R^4 може да бъде H или разклонен или неразклонен, наситен или ненаситен, субституиран или несубституиран въглеводород с верига от 1 до 12 C атома.

Структурните аналози на оселтамивира имат сходно действие, но нито един от тях не го превишава по качества, поради което и нито един не е одобрен като фармацевтично активно вещество. Съществени за успеха на едно терапевтично средство са неговият фармакокинетичен профил, повлиян от разтворимостта, способността да активира потенциални предшественици на активното вещество, както и формирането на протеинови връзки. Еднакво важна е и стабилността при физиологични условия. От съществена значимост е също оралната биодостъпност на терапевтичното средство, която показва степента в която даден активен ингредиент се абсорбира след орално приложение. Оралното приложение е най-лесният начин за използване в сравнение с останалите- инжекционна или инхалационна форми. Например, не е нужно да се съблюдава стерилност, която е необходима при инфузия или инжектиране. В допълнение- дозирането и прилагането е много по- лесно в сравнение, например, с една инхалационна медикаментозна форма

Напоследък обект на загриженост е наблюдаваното нарастване устойчивостта на вирусите A(H1N1) с мутация H274Y спрямо оселтавимир. Но ако оселтамивира се окаже неефективен срещу по-нататъшна устойчивост на вируса, полезното

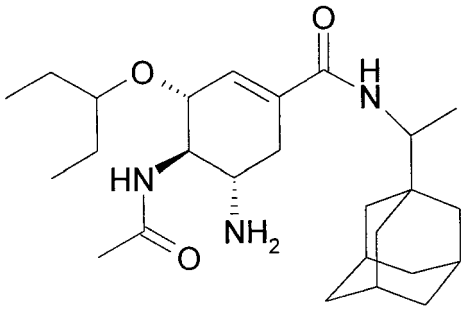
количество на орално приложимото вещество, ефективно срещу вирусната инфекция, се загубва.

Известно е също, че друга група противогрипни препарати- т. нар. М2 инхибитори като амантадин и римантадин проявяват резистентност при продължителна употреба [6-10]. Така например, изследване върху повече от 7000 проби от инфектирани с грипен вирус А пациенти, събрани в света през годините 1994 – 2004, показват повишена устойчивост спрямо М2 инхибитори от 0,4% през 1994 - 1995 до 12,3% през 2003 - 2004 г. В допълнение, римантадинът причинява и странични ефекти като гастро- интестинални неразположения.

Ето защо, задача на изобретението е да предложи съединение, което да действа като инхибитор на невраминидазата и на М2 протонният канал и което да проявява подобрен фармакокинетичен профил и добра биодостъпност с оглед приложимостта му като средство за профилактика и лечение на вирусни инфекции.

Същност на изобретението

По своята същност изобретението се отнася до инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал и представлява съединение с формула I:



(I)

Химичното съединение с Формула I се получава чрез следната последователност от синтези: В разтвор на тетрахидрофуран се добавят римантадин хидрохлорид и дициклохексилкарбодиимид, реакционната смес се охлажда на ледена баня и се разбърква на магнитна бъркалка. Към охладената смес се прибавят оселтамивир, разтворен в тетрахидрофуран и диметиламинопиридин. Полученият след приключване на реакцията дициклохексилкарбамид се филтрува, а полученото

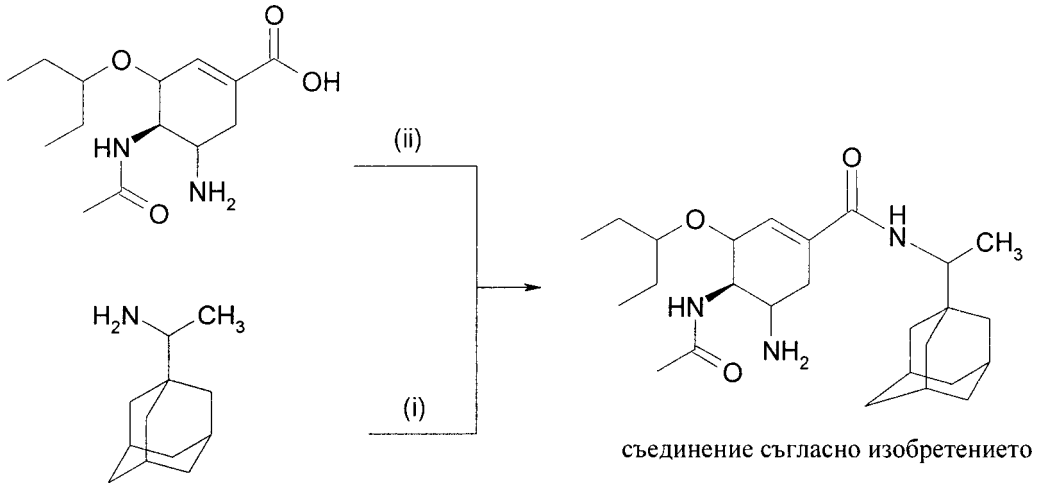
вещество се хроматографира на колона със силикагел. За елуент се използва MeOH:EtOAc (3:1). Добив= 75%.

^{1}H NMR (600 MHz, DME) δ 9.39 (s, 7H), 8.37 (s, 20H),8.12(s, 7H), 6.76(d, J=7.6 Hz, 7H), 5.37(s,28H), 5.09 (s,53H), 4.38(t,J=7.1Hz,193H), 4.16(d, J=7.5 Hz, 41H), 4.04(d,J=7.5Hz, 98H), 3.68 (s, 128H),3.60 (s,141H),3.33(s,489H), 2.52(s,273H), 2.39 (s,101H), 2.28(t, J=7.8 Hz, 198H), 2.13 (s,28H) , 1.97(s,408H), 1.84 (d,J=21.2 Hz, 351H),1.62(d,J=12.2Hz, 180H), 138 (d,J=13.3Hz,130H), 1.31(s,108H), 0.94(d, J=16.7Hz,63H);

^{13}C-NMR (151 MHz, DME) δ 157.55(s), 143.33 (s), 128.48 (s), 109.44 (s), 102.05(s), 81.83(s), 79.94 (s), 68.96(s), 68.62(s), 68.43(s), 68.25 (s), 60.70 (s), 49.74(s), 34.84(s), 33.36(s), 31.82(s),27.58 (s), 27.26(s),25.87(t, J=10.2 Hz), 25.66(s),24.67(s), 14.49(s),11.01(s), 9.36 (d, J=6.4Hz). [M+H]=446

Полученото съединение е с наименование по IUPAC: *N*-(1′-адамантан-1′-етил) (3S,4R,5S)-5-амино-4-ацетамидо-3-пентан-3′′-ил-окси-циклохексен-1-ил-карбоксамид.

Етапите на синтеза на съединението с формула I, съгласно изобретението, са обобщени на Схема I по- долу:



съединение съгласно изобретението

Схема I

Където:

i) е въздействие с тетрахидрофуран, дициклохексилкарбодиимид, 0°C, 1h;

ii) е въздействие с тетрахидрофуран, диметиламинопиридин 0°C, 1h;

Химичната стабилност на съединението с Формула I, съгласно изобретението, е изследвана при стойности на pH =1,0 (0,1M HCl) и pH=7,4 (фосфатен буфер) и температура 37°C и показва показва стабилност в кисела среда.

По този начин е създадено ново съединение, действащо като инхибитор на вирусната невраминизада и на M2 протонният канал, и по този начин е ефективно в преодоляване на развиваща се срещу оселтамивир и римантадин резистентност. Същевременно съединението показва подобрен фармакокинетичен профил и добра биодостъпност с оглед приложимостта му като средство за профилактика и лечение на вирусни инфекции без характерните за римантадина странични ефекти.

Изобретението се илюстрира със следните примерни изпълнения, без да ограничават неговия обхват:

Пример 1: Получаване на съединение с Формула I

Съгласно един предпочитан вариант на изпълнение, за получаване на съединението с Формула I, съгласно изобретението, се процедира по следния начин:

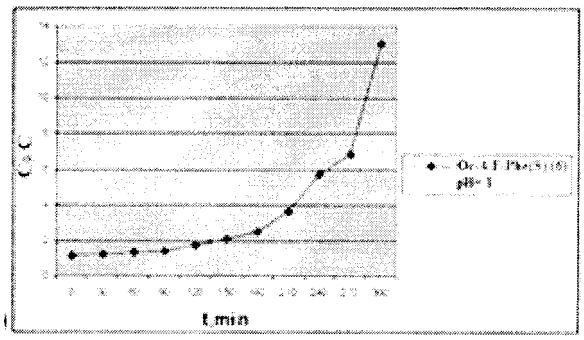
В 10 мл разтвор на тетрахидрофуран се разтварят римантадин хидрохлорид (0.350 г,1,6 ммол) и дициклохексилкарбодиимид (0.150 г, 0.72 ммол). Реакционната смес се охлажда до 0°C на ледена баня. Така смесените вещества се разбъркват на магнитна бъркалка в продължение на 1h. Към охладената смес се прибавят оселтамивир (0.225 г, 72 ммол), разтворен в тетрахидрофуран и диметиламинопиридин (0,090г, 0.72 ммол). След приключване на реакцията дициклохексилкарбамида се филтрува, а полученото съединение се хроматографира на колона със силикагел. За елуент се използва MeOH:EtOAc(3:1). Добив= 0. 240 г (75%).

^{1}H NMR (600 MHz, DME) δ 9.39 (s, 7H), 8.37 (s, 20H),8.12(s, 7H), 6.76(d, J=7.6 Hz, 7H), 5.37(s,28H), 5.09 (s,53H), 4.38(t,J=7.1Hz,193H), 4.16(d, J=7.5 Hz, 41H), 4.04(d,J=7.5Hz, 98H), 3.68 (s, 128H),3.60 (s,141H),3.33(s,489H), 2.52(s,273H), 2.39 (s,101H), 2.28(t, J=7.8 Hz, 198H), 2.13 (s,28H) , 1.97(s,408H), 1.84 (d,J=21.2 Hz, 351H),1.62(d,J=12.2Hz, 180H), 138 (d,J=13.3Hz,130H), 1.31(s,108H), 0.94(d, J=16.7Hz,63H);

^{13}C-NMR (151 MHz, DME) δ 157.55(s), 143.33 (s), 128.48 (s), 109.44 (s), 102.05(s), 81.83(s), 79.94 (s), 68.96(s), 68.62(s), 68.43(s), 68.25 (s), 60.70 (s), 49.74(s), 34.84(s),

33.36(s), 31.82(s),27.58 (s), 27.26(s),25.87(t, J=10.2 Hz), 25.66(s),24.67(s), 14.49(s),11.01(s), 9.36 (d, J=6.4Hz). [M+H]=446

Хидролизният процес протича като процес от първи порядък. Скоростната константа на хидролиза- К се пресмята от наклона на правата, илюстрираща промяната на логаритъма от концентрацията на изходното вещество с времето ($1nC = lnC_0-kt$). Презполовителното време се изчислява като $t_{1/2}= ln2/k$ (Фиг. 1).

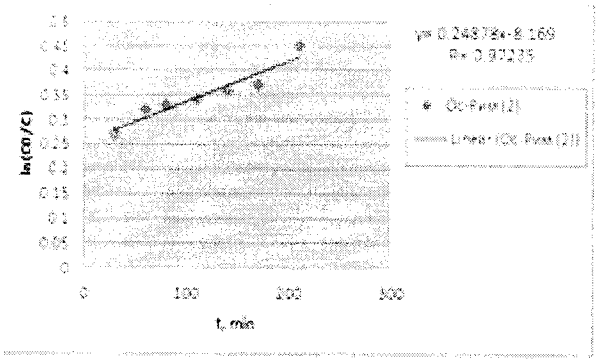


Фиг 1

Както е видно от Фиг. 1, зависимостта Co/C с времето не е линейна, което показва, че реакцията не протича от втори порядък. Въпреки че в реакцията на хидролиза на изследваното съединение участват две изходни вещества, реакцията протича като реакция от първи порядък по отношение на изследваното вещество, защото вторият компонент в реакцията – водата е в много голямо количество и концентрацията й остава постоянна. Както се вижда от приложената фигура хидролизата на изследваното съединение протича като реакция от първи порядък. За да се определи времето на полуразпадане на съединението са построени полулогаритмичните зависимости на относителното изменение концентрацията на изследваното вещество с времето.

Пример 2: Изследване на химична на стабилност на съединението с Формула I, съгласно изобретението:

Химичната стабилност на съединението е изследвана при pH 1.0 и при pH 7.4. На Фиг. 2 по- долу е показана полулогаритмичната зависимост на концентрацията от времето при pH=1.0.



Фиг. 2

На Таблица 1 по- долу са показани стойностите на времената на полуразпадане- видно е, че изследваното съединение показва стабилност в кисела среда ($t_{½}$, = 0.5 h) и ($t_{½}$, = 1.05 h) при неутрално pH.

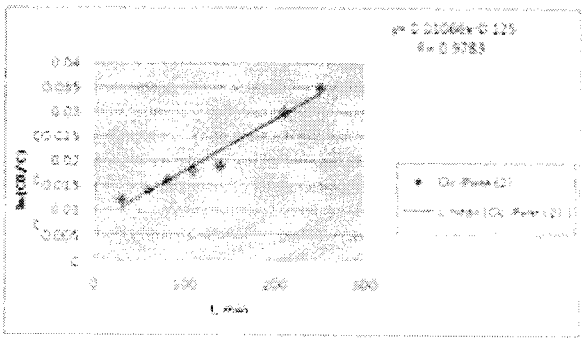
Таблица 1

Кисела среда	Неутрална среда
pH 1.0[а], 37°C	pH 7.4[б], 37°C
$t_{½}$, = 0.5 h	$t_{½}$, = 1.05 h

Където:

- [а] е HCl (0.1M);
- [б] е H_3PO_4 (0.1M)

Промяната на концентрацията на съединение с формула I във времето при 37°C и pH 7.4 в полулогаритмични координати е илюстрирана на фиг. 3.



Фиг. 3

Пример 3: Тестване на *in vitro* противовирусната активност

Ефектът на съединението с формула I, съгласно настоящето изобретение, е изпитан с експерименти върху мишки, инфектирани с грипен вирус A/Aichi/H3N2. Вирусната суспензия е от колекцията на секция „Вирусология" на Институт по микробиология „Стефан Ангелов" при Българската академия на науките.

За експериментите са използвани MDCK (*Madin–Darby canine kidney*) клетъчни култури. Клетъчната линия се поддържа чрез последователни пасажи в растежна среда DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) с 10% фетален телешки серум и антибиотици (пеницилин 100 IU/mL, стрептомицин 100 µg/mL и гентамицин 50 µg/mL) и 20 mM HEPES.

Вирусът е грипен вирус A/H3N2, щам *Aichi*. Вирусът се култивира в поддържаща среда DMEM (*Gibco BRL, USA*) с 0.5 % фетален телешки серум, 10 mM HEPES (*Merck, Germany*) и антибиотици (пеницилин 100 UI/mL и стрептомицин 100 µg/mL) при 37^{0}C и в присъствие на 5 % CO_2. Титрира се по метода на крайното разреждане като титърът е представен в $CCID_{50}$/mL. Цитопатичният ефект е отчитан микроскопски и по колориметричния метод с оцветяване на жизнените клетки с Neutral red uptake assay.

Клетъчна култура и хранителна среда: Клетъчна линия от телешки бъбречни клетки MDBK, култивирана с хранителна среда RPMI-1640 (Flow laboratories).

Методи: Максимална поносима концентрация (МПК): На 96-ямкови микроплаки при пълен клетъчен монослой със съответното разреждане на веществото инокулират по 3 ямки и се добавя хранителна среда. Микроплаките се инкубират на 37 ° С за 96 часа. На всеки 24 часа се определя промяната в морфологията на третираните клетки ш сравнение с контролни клетки. За МПК се определя концентрация, която не предизвиква морфологични промени в третирания монослой.

1. *Определяне на противовирусната активност чрез редукция на вирусната репликация.*

Пълен клетъчен монослой се заразява с 320 CCID50/0, 1ml от съответния вирусен щам. След 1 час адсорбция от всяко разреждане на веществото се инокулират по 3 ямки. При пълна деструкция на клетъчния монослой в контролата се определя вирусния цитопатичен ефект (ЦПЕ). За всяка концентрация на веществата се взема средната стойност на ЦПЕ и се изразява като процент от вирусната контрола.

На базата на получените резултати графично се определя дозата, предизвикваща 50 % редукция на вирусната репликация. (ED_{50}).

2. *Определяне на противогрипна активност*

За експериментите са използвани MDCK клетъчни култури. Клетъчната линия се поддържа чрез последователни пасажи в растежна среда DMEM с 10% фетален телешки серум и антибиотици (пеницилин 100 IU/mL, стрептомицин 100 µg/mL и гентамицин 50 µg/mL) и 20 mM HEPES. Вирусът е грипен вирус щам A/*Aichi/* H3N2 Вирусната суспензия е от колекцията на секция „Вирусология" на Институт по микробиология „Стефан Ангелов" при Българската академия на науките. Вирусът се култивира в поддържаща среда DMEM (Gibco BRL, USA) с 0.5 % фетален телешки серум, 10 mM HEPES (Merck, Germany) и антибиотици (пеницилин 100 UI/mL и стрептомицин 100 (µg/mL) при 37°C и в присъствие на 5 % CO_2. Титрира се по метода на крайното разреждане като титърът е представен в $CCID_{50}$/mL. Цитопатичният ефект е отчитан микроскопски и по колориметричния метод с оцветяване на жизнените клетки с Neutral red uptake assay.

3. Цитотоксичност

Цитотоксичността е изпитана върху монослойни клетъчни култури в 96-ямкови плаки. Клетъчният монослой във всяка ямка се инокулира с по 0.1 mL от 0.5 lg серийни разреждания на веществата в поддържаща среда. Ямки, инокулирани само с поддържаща среда, служат за клетъчна контрола. Клетките се инкубират при 37°C в присъствие на 5% $C0_2$ и ежедневно се проследяват за наличие на микроскопски промени. На 48-я час клетъчните култури се оцветяват с NR и резултатът се отчита колориметрично.

4. ЦПЕ-инхибиращ тест

Монослойни клетъчни култури се инокулират с по 0.1 mL вирусна суспензия в поддържаща среда, съдържаща 100 ССШ50 на изпитвания вирус. След 1 час за адсорбция на вируса при стайна температура вирусната суспензия се отсранява и на нейно място се инокулират по 0.1 mL от 0.5 lg серийни разреждания на изпитваните съединения. Така обработените клетъчни култури се инкубират в термостат на 37°C и 5% C02 и се наблюдават ежедневно за развитието на вирусния цитопатичен ефект. След пълното разгръщане на ЦПЕ в ямките с вирусната контрола (без инхибитор в поддържащата среда) клетъчните култури се обработват с NR. Получените стойности на оптичната плътност на отделните проби се използват за пресмятане на процента на защита (ако има такъв).

Резултатите от изпитването за противовирусна активност *in vitro* на съединението, съгласно настоящето изобретение, срещу грипен вирус A/Aich/H3N2 са представени на Таблица 2 по- долу.

Таблица 2.

Съединение	**CC_{50}[а] (μM)**	**IC_{50}[б] (μM)**	**SI[в]**
Съединение с формула I	254.76	7.27	35
Оселтамивиркарбоксилат	>100	80	>1.25

Където:

[а] *CC50 – 50% цитотоксична концентрация – концентрацията, при която 50% от клетъчния монослой е със запазена жизненост*

[б] *IC_{50} – 50% инхибираща концентрация – концентрацията, при която 50% от вирусния цитопатичен ефект е инхибиран (т.е. при която съединението защитава 50% от клетъчния монослой)*

[в] *SI – селективен индекс – CC_{50}/IC_{50}*

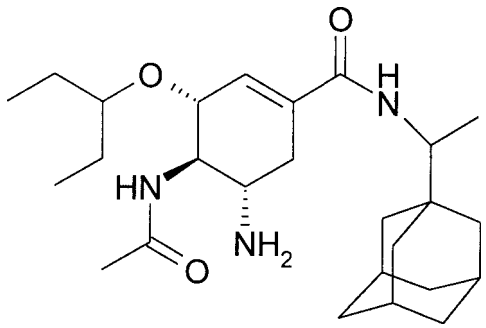
Получените резултати показват, че съединението, съгласно изобретението, проявява висока противогрипна активност – SI=35 (за активно се счита съединение, което проявява SI=10).

Литература:

1. www.who.int/csr/disease/swineflu (accessed on September 10, 2009).
2. Chen, X., Si, L., Liu, D., Proksch, P., Zhang, L., Zhou, D., & Lin, W. (2015). Neoechinulin B and its analogues as potential entry inhibitors of influenza viruses, targeting viral hemagglutinin. European journal of medicinal chemistry, 93, 182-195.
3. Oxford, J.S. and Lambkin, R. (1998) Targeting influenza vims neuraminidase: a new strategy for antiviral therapy. Drug Discovery Today, 3, 448^156.
4. Mendel, D.B. and Roberts, N.A. (1998) In-vitro and in-vivo efficacy of influenza neuraminidase inhibitors. Current Opinion in Infectious Disease, 11, 727-732.
5. Jackson, H.C., Roberts, N., Wang, Z.M., arid Belshe, R. (2000) Management of influenza: use of new antivirals and resistance in perspective. Clinical Drug Investigation, 20, 447-454.
6. Alhadeff R., et al., Computational and experimental analysis of drug binding to the Influenza M2 channel, Biochim. Biophys. Acta (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.033.
7. Neumann G., Noda T., Kawaoka Y., Emergence and pandemic potential of swineoriginH1N1 influenza virus, Nature 459 (7249) (2009) 931–939.
8. He C. Q., Han G. Z., Wang D., Liu W., Li G. R., Liu X. P., Ding N. Z.,Homologous recombination evidence in human and swine influenza A viruses, Virology 380 (2008) 12–20.
9. Astrahan P., Isaiah T. Arkin B., Resistance characteristics of influenza to amino-adamantyls, Biochimica et Biophysica Acta 1808 (2011) 547–553.
10. Ghada S. H., Ali A. El-Emam, Gad L. M., Eldin M A.. Barghash L., 2010,Synthesis, antimicrobial and antiviral testing of some new 1-adamantyl analogues. Saudi Pharmaceutical Journal 18, 123–128.

ПРЕТЕНЦИИ

1. Инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал с формула I:



(I)

2. Метод за получаване на инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал с формула (I), съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че римантадин хидрохлорид и дициклохексилкарбодиимид се добавят към разтвор на тетрахидрофуран, реакционната смес се охлажда на ледена баня, разбърква се на магнитна бъркалка, към охладената смес се прибавят оселтамивир, разтворен в тетрахидрофуран и диметиламинопиридин, като полученият след приключване на реакцията дициклохексилкарбамид се филтрува, а полученото вещество се хроматографира на колона със силикагел.

3. Инхибитор на вирусната невраминидаза и на М2 протонния канал с формула (I), съгласно претенции 1 и 2, приложим за профилактика и лечение на вирусни инфекции.