

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 607 628** (13) C1ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C07D 487/04 \(2006.01\)](#)[A61K 31/53 \(2006.01\)](#)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 07.03.2019)  
Пошлина: учтена за 5 год с 26.09.2019 по 25.09.2020(21)(22) Заявка: [2015140852](#), 25.09.2015(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.09.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.09.2015

(45) Опубликовано: [10.01.2017](#) Бюл. № 1(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2294936 C1, 10.03.2007. RU  
2343154 C2, 10.01.2009. RU 2404182 C2,  
20.11.2010.

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19,  
УрФУ, ЦИС, Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Русинов Владимир Леонидович (RU),  
Чупахин Олег Николаевич (RU),  
Чарушин Валерий Николаевич (RU),  
Сапожникова Ирина Михайловна (RU),  
Медведева Наталья Розыевна (RU),  
Уломский Евгений Нарциссович (RU),  
Киселев Олег Иванович (RU),  
Деева Элла Германовна (RU),  
Коновалова Надежда Игоревна (RU),  
Васин Андрей Владимирович (RU)

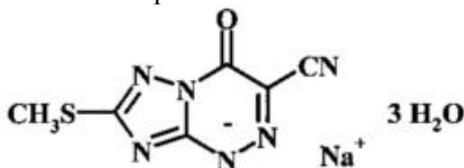
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Уральский федеральный  
университет имени первого Президента  
России Б.Н. Ельцина" (RU),  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Научно-исследовательский  
институт гриппа" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
(RU)

(54) НАТРИЕВАЯ СОЛЬ 2-МЕТИЛТИО-6-ЦИАНО-1,2,4-ТРИАЗОЛО[5,1-с]-1,2,4-ТРИАЗИН-7(4Н)-ОНА, ТРИГИДРАТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрату, которая проявляет противовирусное действие в отношении гриппа



Технический результат: получено новое соединение, обладающее противовирусной активностью. 1 ил., 2 табл., 4 пр.

1. Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области биологически активных соединений - натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрат, обладающей противовирусным действием в отношении гриппа А и предназначенной для лечения и профилактики инфекционных вирусных заболеваний животных и человека. Изобретение может быть использовано в лечебных учреждениях, научно-исследовательских лабораториях, а также в животноводстве и птицеводстве.

## 2. Уровень техники

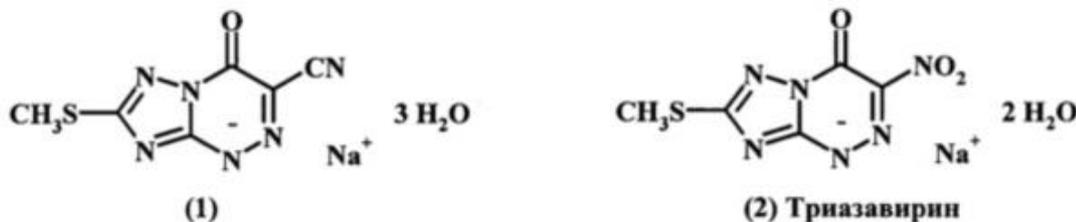
Актуальность проблемы создания средств для противовирусной терапии, в особенности в условиях быстрой мутации вирусов, выявления новых возбудителей опасных и медленных вирусных инфекций, вызывает постоянную потребность в новых химиопрепаратах, которые бы обладали высокой активностью, продолжительным действием и низкой токсичностью. Описано получение с выходами 30-80% натриевой, пиридиниевой и коллидиниевой солей незамещенного в триазольном фрагменте 6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она [Gery E.J., Stevens M.G., Tennant G., Vevers R.J.S., J. Chem. Soc. Perkin I, 1976, p. 1496].

Наиболее близким по структуре и активности к заявляемому соединению является препарат Триазавирин - натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-7-оксо-[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-(4Н)-она, дигидрат (2) [Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чарушин В.Н., Петров А.Ю., Киселев О.И. Патент РФ №2294936 от 10 марта 2007 г.], выбранный в качестве прототипа.

Описываем его недостатки, которые устраняются изобретением. Анализ метаболизма препарата Триазавирин, выбранного в качестве прототипа, показал, что в процессе циркуляции в организме он подвергается восстановительной модификации, приводящей к значительным изменениям структуры - восстановлению нитрогруппы до аминогруппы [Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V., Rusinov V., Ulomsky E., Deeva E., Yanvarev D., Ivanov A., Smirnova O., Kochetkov S, Chupakhin O., Kukhanova M. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, vol. 54, №5, p. 2017-2022]. Проявляется зависимость противовирусного средства от клеточного метаболизма.

## 3. Сущность изобретения

Изобретение направлено на создание соединения, лишенного указанного недостатка. Сущность изобретения составляет натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрат, обладающая противовирусным действием в отношении гриппа А, формулы (1):



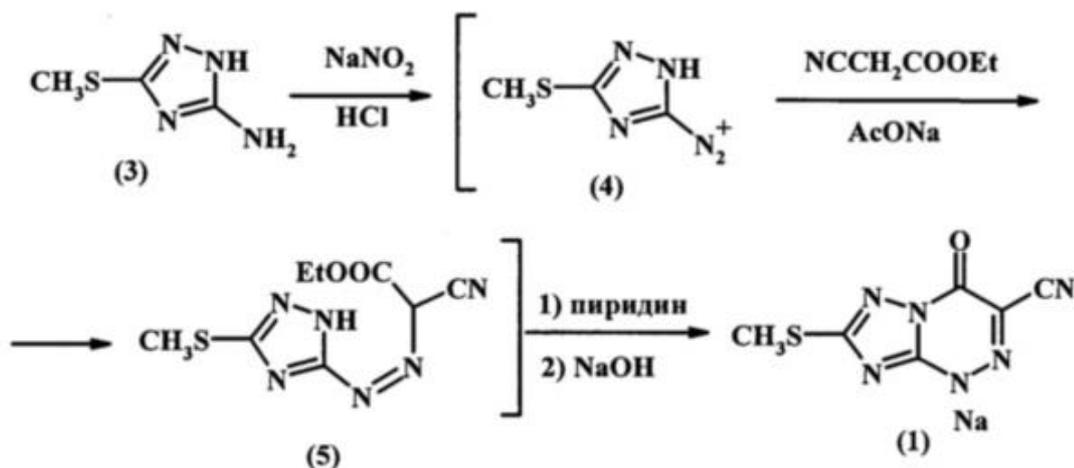
Задачей изобретения являлась «минимизация» в модификации структуры противовирусного соединения на основе «Триазавирина» с целью снижения зависимости нового противовирусного средства от клеточного метаболизма. Замена нитрогруппы тоже на другой довольно сильный акцептор - цианогруппу - привела к такому эффекту. Таким образом, заявляемое соединение представляет собой минимальное отклонение от ключевого фрагмента «Триазавирина», обладает низким потенциалом в отношении возможных модификаций и более высоким уровнем противовирусной активности с сохранением широты спектра в отношении обширной группы РНК-содержащих вирусов.

Сущность изобретения поясняется чертежами, где на Фиг. 1 показана активность соединения (1) перорально, при лечебно-профилактической схеме введения против вируса гриппа А/California/05/09 pdm2009. Заражающая доза вируса 10 LD<sub>50</sub>.

## 4. Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

4.1. Синтез натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрата

Заявляемое соединение - натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрат (1) получена по следующей схеме: диазотирование 3-метилтил-5-амино-1,2,4-триазола (3) с образованием диазо-1,2,4-триазола (4), азосочетание соединения (4) с циануксусным эфиром и циклизация промежуточно образующегося гидразона (5) при обработке пиридином и NaOH.



Реакцию азосочетания проводят в водном растворе ацетата натрия, полученный при этом гидразон циклизуют при кипячении в пиридине в пиридиниевую соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она (6). После обработки раствором гидроксида натрия получена целевая натриевая соль (1). Процесс проводят без дополнительной очистки и идентификации пиридиниевой соли (6) гидразона (5).

Заявляемое соединение - натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она, тригидрат (1) имеет следующие физико-химические характеристики:  $T_{пл} = 202^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР спектр (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д., КССВ, Гц): 2.62 (3H, с, SCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 13.32 (SCH<sub>3</sub>), 117.00

(C-CN)

117.25 (CN), 148.95 (C=O), 159.23 (C=N), 165.39

(C-SCH<sub>3</sub>)

Найдено, %: С - 25.41; Н - 3.33; N - 29.55; C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>6</sub>NaOS·3H<sub>2</sub>O. Вычислено, %: С - 25.36; Н - 3.19; N - 29.57.

Физико-химические характеристики соединения (1) полностью соответствуют приписываемой структуре.

Пример 1. Синтез натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрата. Растворяют 13,0 г (0,1 моль) 3-метилтио-5-амино-1,2,4-триазола 2 в 20 мл соляной кислоты и 10 мл воды. Раствор охлаждают до  $-10^{\circ}\text{C}$  и диазотируют раствором 7 г нитрита натрия в 10 мл воды. Полученный раствор соли диазония 3 приливают к смеси 100 мл 3 М раствора ацетата натрия и 11,3 г (0,1 моль) циануксусного эфира. Реакционную массу выдерживают 1 час при температуре от  $-10$  до  $0^{\circ}\text{C}$  и 1 час при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают и сушат. Высушенный осадок помещают в круглодонную колбу, растворяют в пиридине и кипятят 30 мин с обратным холодильником. Полученную реакционную массу упаривают в вакууме, к остатку прибавляют разбавленный раствор гидроксида натрия в спирте, осадок отфильтровывают, сушат и перекристаллизовывают из 50% спирта. Выход 12,8 г (45%).

4.2. Противовирусные свойства натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрата (1)

Пример 1. Определение противовирусной активности соединения (1) в отношении вирусов гриппа в системе *in vitro*

При оценке противовирусной эффективности соединения (1) в отношении вирусов гриппа А *in vitro* использованы эталонные штаммы вирусов гриппа А, циркулировавшие в человеческой популяции - А/Перт/16/09. Исследования проводились на клеточной линии МДСК.

Противовирусная активность соединения (1) изучалась по лечебно-профилактической схеме: преинкубация клеток с соединением 60 мин, заражение вирусом, инкубация 3 суток (для определения титра вируса в РГА). Исследовались концентрации соединения (1) от 5 до 50 мкг/мл.

Оценка токсичности соединения (1) *in vitro* показала, что соединение малотоксично в отношении клеток в культуре: максимальная нетоксическая концентрация соединения составляла 400 мкг/мл, среднетоксическая концентрация составляла 500 мкг/мл.

Соединение (1) в опытах *in vitro* показало

- умеренную противовирусную активность в отношении штамма вируса гриппа А/Перт/16/09 (H3N2) в концентрациях от 5 до 50 мкг/мл (табл. 1).

Таблица 1

Действие соединения (1) на вирус гриппа А/Перт/16/09 (H3N2)

Препарат	Концентрация, мкг/мл	РГА $\Delta lgTID_{50}$
Соединение (1)	50	1,5±0,5
	20	1,25±0,25
	5	1,0±0,45
Триазавирин	50	1,45±0,25
	20	1,3±0,37
	5	1,0±0,15
Озельтамивира карбоксилат	5	3,0±0,37
Ремантадин	10	2,75±0,75

Таким образом, соединение является низкотоксичным (наивысшая нетоксическая концентрация в культуре клеток - 400 мкг/мл, среднетоксическая концентрация - 500 мкг/мл) и в системе *in vitro* обладает умеренной противовирусной активностью в отношении штамма вируса гриппа А(H3N2).

Пример 2. Определение противовирусной активности соединения (1) в отношении вирусов гриппа в системе *in vivo*

При изучении специфической активности соединения (1) на модели летальной гриппозной инфекции у мышей был использован штамм вируса гриппа, адаптированный к мышам, - А/California/07/09 (H1N1)pdm2009. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10-12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 часов при 36°C.

Соединение (1) вводили животным в дозе от 50 мг/кг перорально. Соединение (1) вводили по лечебно-профилактической схеме: за 24 часа и 1 час до заражения и через 24, 48 и 72 часа после заражения, по лечебной схеме (1 раз в сутки в течение 5 дней после заражения) и по профилактической схеме (за 24 часа и 1 час до заражения).

В ходе исследования противовирусной активности соединения (1) на животных не было отмечено неспецифической смертности в контрольных группах интактных животных. Клинические признаки заболевания были типичными для гриппозной инфекции и включали затрудненное дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды и, как следствие, веса животных.

В результате проведенных исследований были получены следующие данные:

- соединение (1) показало высокий уровень противовирусной активности на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, вызванной вирусом А/California/05/09 pdm2009 (табл. 2, фиг. 1)
- при пероральном введении соединение (1) обладает высокой противовирусной активностью (коэффициент защиты 55,6%).
- эффективность соединения (1) в дозе 50 мг/кг сопоставима с действием озельтамивира и триазавирина для вируса А/California/05/09 pdm2009.

Таблица 2

Противовирусная активность соединения (1) в опытах *in vivo* на модели летальной гриппозной инфекции у мышей при заражении вирусом А/California/05/09 pdm2009

Препарат	Животных в группе	Смертность по дням						СПЖ*, сут	Смертность, %	Индекс защиты, %	Увеличение СПЖ*, сут
		6	7	8	9	10	11				
Соединение (1)	10	2	2					11,6	40,0	55,6	3,4
Триазавирин	10	2	1	1				11,7	40,0	55,6	3,5
Тамифлю	10	3	1					11,5	40,0	55,6	3,3
Контроль вируса	10	4	2	1	1		1	8,2	90,0	---	0,0

СПЖ – средняя продолжительность жизни, сутки

Таким образом, соединение (1) обладает выраженной противовирусной активностью в отношении пандемического штамма вируса гриппа типа А, противовирусная активность соединения (1) в опытах *in vivo* сопоставима с активностью противовирусного препарата Тамифлю и Триазавирин, а по показателю средней продолжительности жизни превышает таковой для препарата Тамифлю и не подвержено фармакодинамическим модификациям, связанным с восстановлением нитрогруппы, подобно препарату Триазавирин.

Пример 3. Определение LD<sub>50</sub> при изучении острой токсичности на лабораторных животных

При исследовании острой токсичности соединения (1) на белых беспородных мышах установлено, что при внутривенном введении величина LD<sub>50</sub> составляет 5000 мг/кг.

Результаты исследования острой токсичности соединения (1) позволили отнести данное соединение к практически не токсичным лекарственным веществам (по классификации Hodge и Sterner).

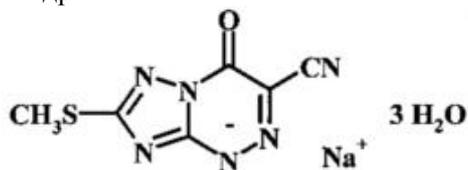
Таким образом, очевидны преимущества соединения 1, в том числе и по показателям противовирусного действия.

Краткое описание чертежей

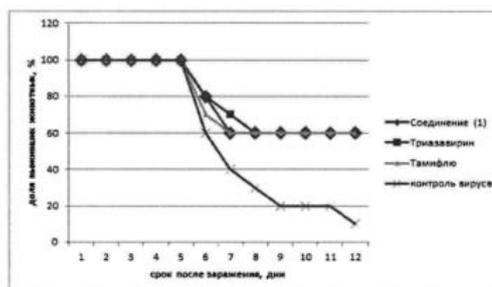
Фиг. 1. Активность заявляемого соединения (1) перорально, при лечебно-профилактической схеме введения в отношении вируса гриппа A/California/05/09 pdm2009. Заражающая доза вируса 10 LD<sub>50</sub>.

Формула изобретения

Натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4H)-она, тригидрат



**Натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4H)-она, тригидрат**



**ФИГ.1**