



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119202** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 249/00
C07D 295/00
A61K 31/00
A01P 21/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 04715**
(22) Дата подання заявки: **16.05.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **11.09.2017**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.09.2017, Бюл.№ 17**

(72) Винахідник(и):
Щербина Роман Олександрович (UA),
Зажарський Володимир Володимирович (UA),
Парченко Володимир Володимирович (UA),
Давиденко Павло Олександрович (UA),
Книш Євгеній Григорович (UA),
Панасенко Олександр Іванович (UA)

(73) Власник(и):
Щербина Роман Олександрович,
вул. Ладозька, буд. 19, кв. 42, м. Запоріжжя, 69121 (UA),
Зажарський Володимир Володимирович,
проспект Героїв, 12, кв. 52, м. Дніпро, 49100 (UA),
Парченко Володимир Володимирович,
вул. Новоросійська, 177, м. Запоріжжя, 69060 (UA),
Давиденко Павло Олександрович,
вул. Героїв Сталінграда, 12 г, кв. 43, м. Дніпро, 49062 (UA),
Книш Євгеній Григорович,
вул. Дніпровські Пороги, буд. 35, кв. 146, м. Запоріжжя, 69121 (UA),
Панасенко Олександр Іванович,
вул. Дніпровські Пороги, буд. 35, кв. 152, м. Запоріжжя, 69121 (UA)

(54) **N'-(2-((5-(МОРФОЛІНОМЕТИЛ)-4-ФЕНІЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТИЛ)ІЗОНІКОТИНОГІДРАЗІДУ ГІДРОБРОМІД, ЩО ПРОЯВЛЯЄ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНУ АКТИВНІСТЬ**

(57) Реферат:

N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідробромід, що проявляє протитуберкульозну активність.

UA 119202 U

Корисна модель належить до фармації, медицини та ветеринарії і може бути використаний у створенні нових біологічно активних сполук у ряді похідних 1,2,4-триазолу та для підвищення ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин, селекції вакцинних штамів для конструювання препаратів специфічної профілактики хвороби.

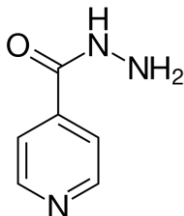
5 Сучасний стан виробництва протитуберкульозних препаратів в Україні далеко не ідеальний, тому необхідно розширювати виробництво вітчизняних протитуберкульозних препаратів.

3 огляду на вищевикладене, можна сказати, що головним завданням пошуку нових протитуберкульозних препаратів є створення високоактивних і малотоксичних препаратів, позбавлених побічних ефектів. Також дуже важливо, щоб резистентність до них мікобактерій туберкульозу розвивалася якомога повільніше.

10 До протитуберкульозних лікарських засобів належать синтетичні (ізоніазид, етамбутол, ПАСК, бепаск, етіонамід, протіонамід, піразинамід), антибіотики (рифампіцин, циклосерин, канаміцин, флориміцин, стрептоміцин) та фторхінолони (лемефлоксацин) [Машковський М.Д., 1998, 2000; Мишин В.Ю., 2002; Фрейдович А.И., 2001].

15 Антибіотики і фторхінолони, що застосовуються для лікування туберкульозу, характеризуються широким спектром дії, синтетичні препарати діють тільки на мікобактерії туберкульозу. В основу сучасних класифікацій покладена клінічна ефективність і стерпюваність протитуберкульозних препаратів. Питання біологічних властивостей мікобактерій, зокрема бичачого виду, дотепер потребують вивчення.

20 Прототипом речовин, похідної 1,2,4-триазолу, що заявляються, є Ізоніазид (гідрозид ізонікотинової кислоти), що виявляє протитуберкульозну активність [М.Д. Машковський. Лікарські засоби, 1988], формули:



25 Найближчий аналог хоча і виявляє протитуберкульозну активність, однак володіє низкою недоліків, зокрема: високою токсичною дією та виникненням ряду побічних ефектів.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення нової біологічно активної сполуки в ряді 1,2,4-триазолу, яка має протитуберкульозну дію.

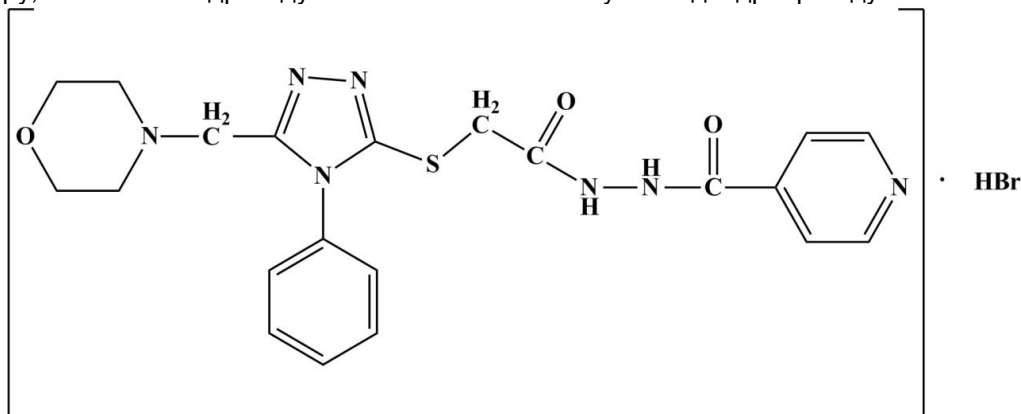
Спільні суттєві ознаки прототипу та корисної моделі, що заявляється, є такі:

- в структурі прототипу і винаходу присутні групи C-N;
- наявність в структурах ароматичних фрагментів;
- наявність в структурах карбоксильних груп.

30 Задачею корисної моделі є вивчення та дослідження впливу різних концентрації N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду та рН середовища на культивування патогенних штамів *M. bovis* за температур 37 °С.

35 Поставлена задача вирішується тим, що створено нову похідну 1,2,4-триазолу, що проявляє протитуберкульозну дію:

40 N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду, який містить морфолінометильний замісник за C₅ положенням та фенільний радикал за N₄ атомом, фрагмент оцтової кислоти, зв'язаний з ядром 1,2,4-триазолу атомом сульфору, та залишок гідрозиду ізонікотинової кислоти у вигляді гідроброміду:



Сполуку, що заявляється, отримують шляхом взаємодії ізопропіл 2-((4-феніл-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетатату із гідразидом ізонікотинової кислоти в середовищі і-пропанолу з наступним виділенням у вигляді гідроброміду.

Приклад

5 До розчину ізопропіл 2-((4-феніл-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетатату (3,48 г) у 30 мл і-пропанолу додають 0,01 моль гідразиду ізонікотинової кислоти. Розчин кип'ятять на водяному огрівнику 8 год., випаровують досуха та виділяють у вигляді гідроброміду. Для аналізу сполуку перекристалізують із метанолу.

10 Кристалічна речовина жовтого кольору з Тпл. 195-197 °С, добре розчинна у воді, малорозчинна у н-пропанолі, н-бутанолі та в неполярних розчинниках.

Вихід N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду складає 81 %.

Вирахувано: С 47,20 %, Н 4,53 %, N 18,35 %, S 6,00 %.

Знайдено: С 47,29 %, Н 4,55 %, N 18,39 %, S 6,03 %.

15 В ІЧ-спектрі сполуки, що заявляється, наявні смуги поглинання –C–S–групи при 689 см⁻¹, симетричні при 1410 см⁻¹ та асиметричні при 1600 см⁻¹ смуги поглинання COO–групи.

Протитуберкульозна активність

20 Протитуберкульозну активність вивчали, проводячи культивування патогенних штамів *M. bovis* за температури 37 °С на середовищі із рН 6,5 та 7,1, що додатково містить N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромід у масових концентраціях 0,1; 0,5; 1 %.

25 Культивування та накопичення біомаси досліджуваних штамів *M. bovis* проводили на яєчному живильному середовищі, яке за складом було ідентичним стандартному, виготовленому ДП "Ветеринарна медицина" (м. Харків, Україна). До середовища додавали препарат ПКР-266 у концентрації 0,1 %; 0,5 %; 1 %. Дослідження проводили зі встановленням двох рівнів рН: 6,5 та 7,1. Відмірювання необхідної кількості препарату проводили згідно з ГОСТ 27025-86. Розчини препарату готували згідно з методиками, описаних у ГОСТ 4212-76 та ГОСТ 4517-87. У виділених та накопичених мікобактерій вивчали строки появи первинного росту, його інтенсивність і характер субкультури. Аналіз та оцінку колоній проводили за кількістю, величиною, формою, поверхнею, консистенцією, пігментоутворенням, прозорістю, блиском та емульгованістю у фізіологічному розчині [В. М. Манченко, З. Р. Троценко, М. С. Павленко та ін., 1994; О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський, Л. О. Ковальова, 2010]. Гравіметричні вимірювання виконували на лабораторних електронних аналітичних вагах моделі ESJ-200-4 (США).

35 Вплив N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромід на *M. bovis*

40 На початку досліду виявляли вплив концентрації препарату та рН середовища на інтенсивність росту культури за температур 37 °С. Для цього відбирали *M. bovis* 100 пасажу, який культивували за температури 37 °С на середовищі з N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромідом у зазначених концентраціях у термостаті протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 (в кількості десять пробірок із кожною концентрацією препарату) та рН 7,1 (в кількості десять пробірок із кожною концентрацією препарату). Як контроль використовували *M. bovis* 100 пасажу без додавання до середовища

45 N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду.

Після закінчення цих термінів так само, як і після культивування за температури 37 °С, проводили облік й характеризували ріст колоній мікобактерій (культур) [В. М. Манченко, З. Р. Троценко, М. С. Павленко та ін., 1994; О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський, Л. О. Ковальова, 2010].

50 У підсумку були одержані дані впливу концентрацій N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду на культивування *M. bovis* за температур 37 °С на середовищі з різним рН на інтенсивність росту культури.

55 У таблиці 1 систематизовано дані про культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 7,1, що додатково містить N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромід у трьох концентраціях.

60 До 7 доби досліду ріст культури 100 пасажу *M. bovis* в контрольній групі на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С не відмічався. Починаючи з 7-ї доби виявляли вздовж лінії посіву шорсткий наліт, з 14-ї доби з'являлись характерні поодинокі колонії, які до 90-ї доби досліду утворювали значну кількість макроскопічно сформованих колоній мікобактерій у вигляді суцільного росту.

Результати, наведені в табл. 1, засвідчили відсутність росту культури *M. bovis* 100 пасажу за усіх (0,1, 0,5 та 1 %) концентрацій препарату N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду впродовж усього періоду спостереження (90 діб), що свідчить про туберкулостатичну дію препарату.

5

Таблиця 1

Характеристика культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С

7-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Шорсткий наліт	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Шорсткий наліт та поодинокі білі колонії за лінією посіву	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
30-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Без змін	Без змін	Без змін
60-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

У таблиці 2 систематизовано дані щодо культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 6,5, яке додатково містило N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромід у трьох концентраціях.

10

До 30-ї доби дослідю ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С не відмічався.

Таблиця 2

Характеристика культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С

7-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %

Поодинокі колонії вздовж лінії посіву	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба досліджу			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
30-а доба досліджу			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Вздовж лінії посіву шорсткий наліт	Ріст відсутній	Ріст відсутній
60-а доба досліджу			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Вздовж лінії посіву шорсткий наліт	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба досліджу			
Контроль	Концентрація N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній	Ріст відсутній

Результати, наведені в табл. 2, засвідчили, що за 0,1 % концентрації препарату відзначається поступовий ріст колоній, починаючи з 30-го до 60-го дня досліджу – вздовж лінії посіву шорсткий наліт, на 90-у добу з'являються поодинокі гладкі (S-форми), дрібні колонії білого кольору. Нами встановлена відсутність росту культури *M. bovis* 100 пасажу за 0,5 та 1 % концентрацій N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозиду гідроброміду впродовж усього періоду спостереження (90 діб), що свідчить про туберкулостатичну дію препарату.

Вплив ізоніазиду (гідрозид ізонікотинової кислоти) на *M. Bovis*

Використовувався класичний туберкулостатичний препарат ізоніазид за різних концентрацій, рН середовища та температури 37 °С. Ізоніазид, згідно класифікації протитуберкульозних препаратів міжнародної спілки боротьби із туберкульозом, належить до I групи - препарати високої ефективності. Як контроль використовували *M. bovis* 100 пасажу без додавання до середовища препарату ізоніазид.

Для цього відбирали *M. bovis* 100 пасажу, який культивували за температури 37 °С на середовищі з препаратом ізоніазид у зазначених концентраціях у термостаті протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 та рН 7,1 (в кількості десять пробірок із кожною концентрацією препарату).

У виділених мікобактерій вивчали строки появи первинного росту, його інтенсивність і характер субкультури.

У таблиці 3 систематизовано дані про культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 7,1, що додатково містить препарат ізоніазид у трьох концентраціях.

До 7-ї доби досліджу ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С не відмічався.

Характеристика культуральних властивостей 100 пасажу *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С

7-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Слизивий наліт	Слизивий наліт жовтуватого кольору	Слизивий наліт	Ріст відсутній
14-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Без змін	Без змін	Поодинокі гладенькі колонії	Ріст відсутній
30-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Численні колонії білого кольору	Поодинокі колонії білуватого кольору	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній
60-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Дещо збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній
90-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст	Суцільний ріст	Дещо збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Ріст відсутній

Характеризуючи отримані дані, що наведені в таблиці 3 нами визначена відсутність росту культури *M. bovis* 100 пасажу за 1 % концентрації препарату ізоніазид. На сьому добу дослідю за 0,1 % концентрації виявлений слизивий наліт жовтуватого кольору, на 30-у добу з'являються поодинокі дрібні білуватого кольору, на 60-добу їх кількість збільшується і на 90-у добу визначаємо суцільний ріст, як і в контролі.

За використання 0,5 % концентрації препарату ізоніазид на 7-у добу виявлений слизивий наліт, на 14 добу дослідю з'являються поодинокі гладенькі колонії, на 30 та 60 добу – дрібні колонії білого кольору. На 90 добу збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній.

Аналізуючи 1 % концентрацію препарату ізоніазид нами визначено відсутність росту патогенного штаму *M. bovis* 100 пасажу протягом усього періоду дослідю (90 діб), що свідчить про туберкулостатичну дію препарату.

Культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, накопиченого та культивованого на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С з препаратом ізоніазид у трьох концентраціях представлений в таблиці 4.

До 14 доби дослідю ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С не відмічався.

Аналізуючи результати дослідю, що наведено в табл.4, нами визначені відмінності дії 1 % концентрації препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5, ніж за рН 7,1. Якщо на середовищі з рН 7,1 ріст культури *M. bovis* 100 пасажу протягом 90 діб культивування не спостерігався, то на середовищі з рН 6,5 з 30 доби з'являються поодинокі дрібні колонії, кількість яких на 90 добу збільшувалась.

0,1 % концентрація препарату ізоніазид незначно впливає на ріст *M. bovis* – вже на 7 добу виявлені поодинокі колонії білуватого кольору, кількість яких поступово збільшується з терміном спостереження.

За 0,5 % концентрації препарату ізоніазид ріст колоній відмічається на 14 добу – колонії дрібні, гладенькі, білого кольору, кількість яких має тенденцію до збільшення протягом терміну спостереження.

Таблиця 4

Характеристика культуральних властивостей 100 пасажу *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 6,5 з препаратом ізоніазид за температури 37 °С

7-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Слизивий наліт	Поодинокі колонії білуватого кольору	Шорсткий наліт	Ріст відсутній
14-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Поодинокі колонії білуватого кольору	Без змін	Поодинокі гладенькі колонії	Ріст відсутній
30-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Численні колонії білого кольору	Поодинокі колонії білуватого кольору	Дрібні колонії білого кольору	Поодинокі дрібні колонії вздовж лінії посіву
60-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст білуватих, поодиноких гладеньких колоній	Ріст білуватих, поодиноких гладеньких колоній	Без змін
90-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній

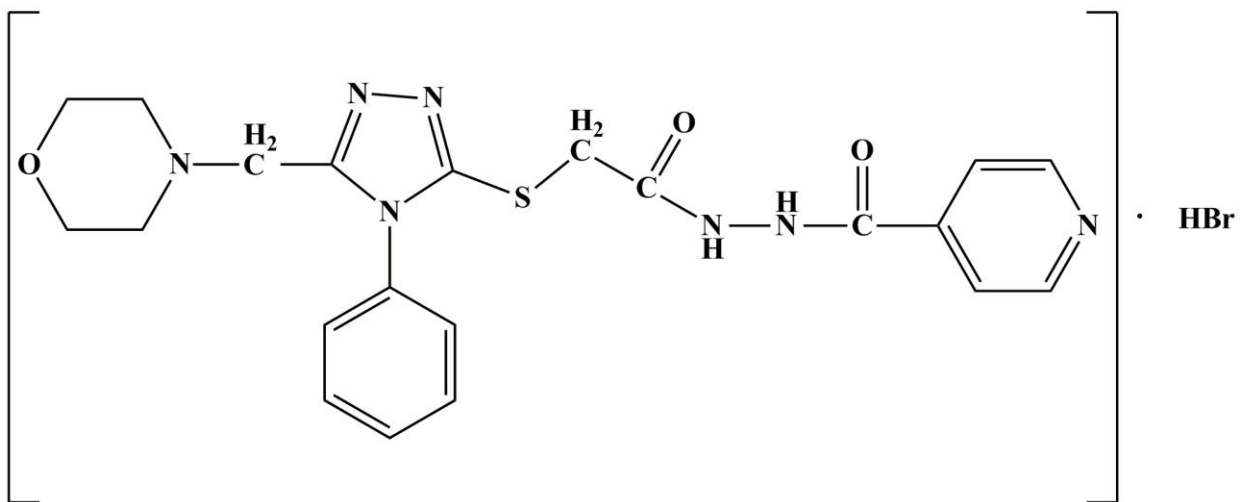
5

Отже, проведені дослідження засвідчили, що препарат ізоніазид за 1 % концентрації пригнічує ріст і розвиток патогенного штаму *M. bovis*, культивованого на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С, що свідчить про туберкулостатичну його дію.

10 Низька концентрація (0,1 та 0,5 %) препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5 та 7,1 за температури 37 °С ріст патогенного штаму *M. bovis* 100-го пасажу не стримує.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 N'-(2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідразиду гідробромід формули:



що проявляє протитуберкульозну активність.

5

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601