



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119920** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 249/00
C07D 295/00
A61K 31/00
A61P 31/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 04947**
(22) Дата подання заявки: **22.05.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.10.2017**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2017, Бюл.№ 19**

(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),
Бригадиренко Віктор Васильович (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),
Бригадиренко Віктор Васильович,
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600 (UA)

(74) Представник:
Щербина Роман Олександрович

(54) **Н-ПРОПІЛ 2-((4-АМІНО-5-(МОРФОЛІНОМЕТИЛ)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ ГІДРОХЛОРИД, ЯКИЙ ВИЯВЛЯЄ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНУ ДІЮ**

(57) Реферат:

Н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид, який виявляє протитуберкульозну дію.

UA 119920 U

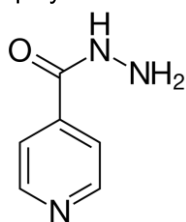
Корисна модель належить до фармації, медицини та ветеринарії і може бути використана у створенні нових біологічно активних сполук у ряді похідних 1,2,4-триазолу та для підвищення ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин, селекції вакцинних штамів для конструювання препаратів специфічної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

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

З огляду на вищевикладене, можна сказати, що головною задачею 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 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.

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



20 Найближчий аналог хоча і виявляє протитуберкульозну активність, однак має низку недоліків, зокрема: високу токсичну дію та виникнення ряду побічних ефектів.

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

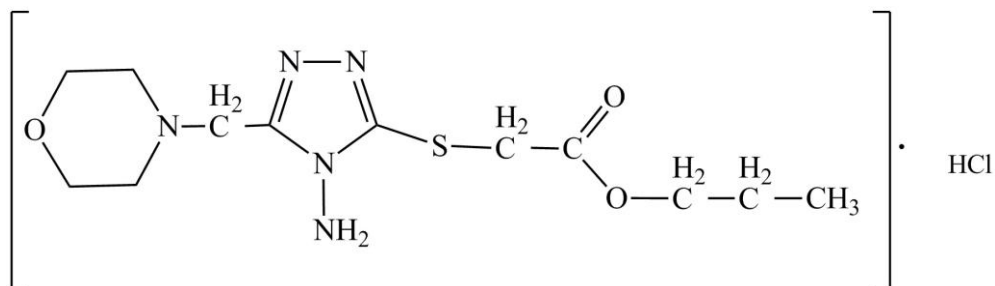
Спільні суттєві ознаки найближчого аналога та корисної моделі, що заявляється, є такі:

- 25
- в структурі найближчого аналога і корисної моделі 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-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду та pH середовища на культивування патогенних штамів *M. bovis* за температур 37 °C.

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

35 n-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид, який містить морфолінометильний замісник за C₅ положенням, аміногрупу за N₄ атомом та фрагмент оцтової кислоти, зв'язаний з ядром 1,2,4-триазолу атомом сульфуру у вигляді гідрохлориду:



40 Сполуку, що заявляється, отримують шляхом взаємодії 4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу із n-пропіл 2-хлорацетатом в середовищі і-пропанолу в присутності еквіваленту калій гідроксиду та виділяють у формі гідрохлориду.

Приклад

45 До розчину 0,01 моль KOH у 3 мл води та 30 мл і-пропанолу додають 0,01 моль 4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу та 0,01 моль n-пропіл 2-хлорацетату, кип'яють до нейтрального середовища протягом 3 год., фільтрують, розчинник випаровують. Сполуку виділяють у формі гідрохлориду.

Кристалічна речовина жовтого кольору з Тпл. 173-175 °С, розчинна у воді, і-пропанолі, малорозчинна у н-бутанолі.

Вихід н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду складає 83 %.

5 Вираховано: С 40,96 %, Н 6,30 %, N 19,90 %, S 9,11 %.

Знайдено: С 41,05 %, Н 6,31 %, N 19,93 %, S 9,09 %.

В ІЧ-спектрах наявні смуги поглинання, С-S-групи при 699 см⁻¹, смуги поглинання ароматичного радикалу при 1455 см⁻¹, а також смуги при 1720см⁻¹, що можуть вказувати на наявність СО-груп. Крім цього ІЧ- спектр характеризується смугою поглинання С-О-С-груп при 1231 см⁻¹.

10 Протитуберкульозна активність

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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду у масових концентраціях 0,1; 0,5; 1 %.

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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид 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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду готували згідно з методиками, описаними 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).

30 Вплив н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду на *M. Bovis*.

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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду 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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду.

40 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).

45 У підсумку були одержані дані впливу концентрацій н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду на культивування *M. bovis* за температур 37 °С на середовищі з різним рН на інтенсивність росту культури.

У таблиці 1 систематизовано дані про культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 7,1, що додатково містить н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид у трьох концентраціях.

50 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.

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

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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Шорсткий наліт	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Без змін	Без змін	Без змін
60-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид у трьох концентраціях.

До 7-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 н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Поодинокі колонії за лінією посіву	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
30-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
60-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба дослідю			
Контроль	Концентрація н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

5 За результатами дослідю видно, що дія препарату за різних концентрацій на середовищі з рН 6,5 не відрізняється від рН 7,1. За всіма дослідними (0,1, 0,5 та 1,0 %) концентрацій н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду нами відмічена відсутність росту патогенного штаму *M. bovis* 100 пасажу протягом всього періоду спостереження (90 діб). Таким чином, можна зробити висновок, що 0,1, 0,5 та 1,0 % концентрації н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлориду активно впливають на культуральні властивості патогенного штаму *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С, стримуючи ріст і розвиток, маючи туберкулостатичну дію.

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

15 Використовувався класичний туберкулостатичний препарат ізоніазид за різних концентрацій, рН середовища та температури 37 °С. Ізоніазид, згідно з класифікацією 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.

20 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 досліду ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С не відмічався.

Таблиця 3

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

7-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Слизовий наліт	Слизовий наліт жовтуватого кольору	Слизовий наліт	Ріст відсутній
14-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Без змін	Без змін	Поодинокі гладенькі колонії	Ріст відсутній
30-а доба досліду			
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 досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Деяко збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній
90-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1 %	0,5 %	1 %
Суцільний ріст	Суцільний ріст	Деяко 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 досліду за 0,1 % концентрації виявлений слизовий 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 слизовий наліт, на 14 добу досліду 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 досліду (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 досліду ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С не відмічався.

Аналізуючи результати досліду, 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 за лінією 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

10

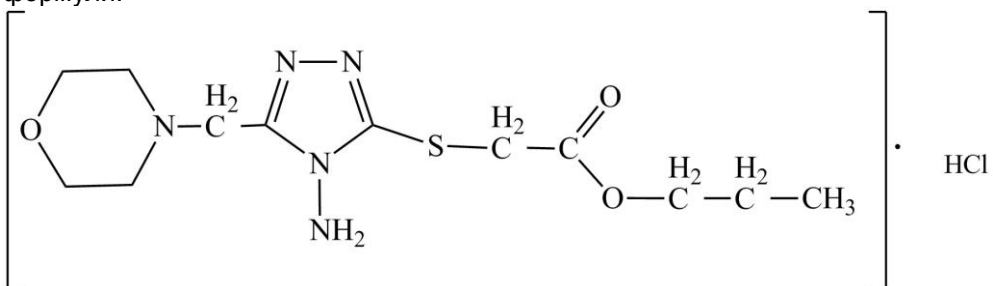
Отже, проведені дослідження засвідчили, що препарат ізоніазид за 1 % концентрації пригнічує ріст і розвиток патогенного штаму *M. bovis*, культивованого на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С, що свідчить про туберкулостатичну його дію.

15

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

5 Н-пропіл 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату гідрохлорид
формули:



який виявляє протитуберкульозну дію.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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