



Республика Таджикистан
С12Р19/00

(19) **TJ** ⁽¹¹⁾ 1594
(51) **МПК**: А61К31/7042;

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

- (21) 2301881
(22) 29.09.2023
(46) Бюл. 218, 2025
(71) Самандарзода Насрулло Юсуф (TJ)
(72) Самандарзода Н.Ю. (TJ); Абдуллозода С.М. (TJ); Сафаров Б.И. (TJ); Исмоилзода С.С. (TJ); Самандаров А.Ю. (TJ); Олимова Ш.Э. (TJ); Махмадалиев Ф.М. (TJ); Мирзоева Н.М. (TJ)
(73) Самандарзода Насрулло Юсуф (TJ)
(54) **1-БЕТА-D-РИБОФУРАНОСИЛ-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДА ХОЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩИЙ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ**
(56) 1 Smee, D. F. A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models /D. F. Smee, R. W. Sidwell // Antiviral Res. – 2003 – V. 57 – P. 41–52.
2 Valacyclovir in the treatment of herpes simplex, herpes zoster, and other viral infections / J. J.Wu, M. H. Brentjens, G. Torres, K. Yeung-Yue, P. Lee, S. K. Tying // J. Cutan Med. Surg. – 2003 –V. 7 – P. 372–381.
3 Crotty, S. Ribavirin’s antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? / S. Crotty, C. Cameron, R.Andino // J. Mol. Med. – 2002 – V. 80 – P. 86–95.

2

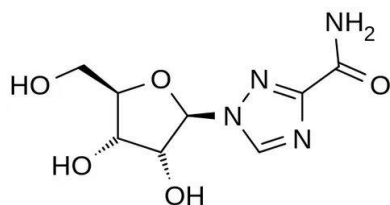
4. Евр. патент EP 0956861, МПК⁷А61К 38/21, опубл. 17.11.1999.
5. Материал из Википедии — свободной энциклопедии.
(57) Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в качестве противовирусного, литолитического, гепатопротективного препарата, особенно при лечении болезней гепатобилиарной системы.
Цель изобретения является создание быстродействующих препаратов на основе синтетических аналогов биологически активных веществ, обладающих широким спектром физиологической активности и малой токсичностью. Для достижения поставленной цели были изучены поведение солей холановой кислоты при связывании 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамида. Реакции с холановой кислотой проводятся при температуре 90-95⁰С в течение 4-4,5 часов с использованием растворителя 1,4-диоксана, что приводило к образованию соединению 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамида-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты.

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в качестве противовирусного, литолитического, гепатопротективного препарата, особенно при лечении болезней гепатобилиарной системы.

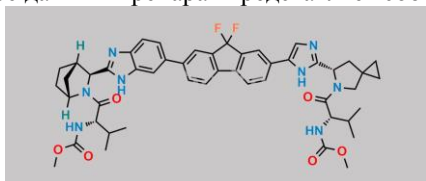
Изучение фармакологических эффектов синтезированных соединений в зависимости от их состава, строения и природы замещающих групп имеет важное значение в теоретическом плане. Решение таких задач позволит осуществлять целенаправленный синтез соединений с усиленным необходимым лечебным и ослабленным побочным действием.

Рост числа и распространенность вирусных заболеваний побуждает ученых к поиску новых средств профилактики и интенсивной терапии в экстремальных ситуациях в периоды эпидемий. Лекарственные препараты на основе модифицированных нуклеозидов представляют наиболее востребованный класс соединений, поскольку обладают широким спектром биологической активности в отношении РНК- и ДНК-вирусов [1–3].

Известен препарат Рибавирин. Данный препарат представляет собой широко используемый в медицине противовирусный и противоопухолевый препарат, подавляющий репродукцию ряда ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов гепатита С, гриппа и др. [4]. По химической структуре рибавирин представляет собой 1-β-D-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид или



Известен препарат Ледипасвир [5]. Ледипасвир — это препарат для лечения [гепатита С](#), разработанный компанией [Gilead Sciences](#). После завершения [III фазы клинических испытаний](#) 10 февраля 2014 года компания Gilead подала заявку на одобрение в США [комбинации ледипасвира / софосбувира в таблетках с фиксированной дозой](#) для лечения гепатита С генотипа 1. Комбинация ледипасвир / софосбувир является противовирусным средством прямого действия, которое препятствует репликации HCV и может использоваться для лечения пациентов с генотипами 1a или 1b без [ПЭГ-интерферона](#) или [рибавирина](#). По химической структуре данный препарат представляет собой



Недостатком этих препаратов является слабая антимикробная активность и привыкание микробов к

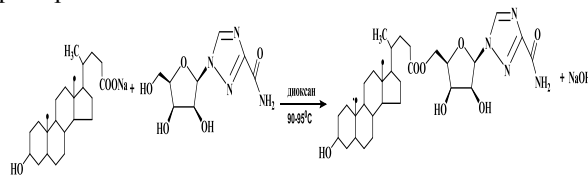
препарату. Для достижения терапевтического эффекта требуется продолжительный курс применения препарата. Однако, при длительном и частом употреблении, лекарственное средство может вызывать токсические побочные эффекты в организме.

Одной из актуальных проблем современной органической химии является изучение биологической активности, выявление ряда наиболее активных и наименее токсичных веществ и установление по мере возможности зависимости физиологического действия от химического строения полученных соединений.

Цель изобретения является создание быстродействующих препаратов на основе синтетических аналогов биологически активных веществ, обладающих широким спектром физиологической активности и малой токсичностью.

Для достижения поставленной цели было изучено поведение солей холановой кислоты при связывании 1-β-D-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид. Реакции с холановой кислотой проводили при температуре 90–95°C в течение 4–4,5 часов с использованием в качестве растворителя 1,4-диоксана, что привело к образованию этих соединений:

1-β-D-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты. Ниже мы приводим схему реакции на примере синтеза.



Средство получают следующим образом: в трехгорлую, снабженную термометром, обратным холодильником и капельной воронкой добавляли 0,92 г (0,0084 моль) натриевой соли 3α,7β-дигидрокси-5β-холана и 10 мл диоксана. При перемешивании и нагревании до 97–98°C медленно добавляли 0,55 г (0,0028 моль) 1-β-D-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид. Затем кладем в емкость со льдом, чтобы кристаллы опали. Полученный раствор фильтруют, промывают водой, сушат на воздухе и перекристаллизовывают из этилового спирта.

На основании анализа инфракрасного спектра синтезированных соединений установлено, что в диапазоне 400–4000 см⁻¹ имеется ряд спектральных полос разной интенсивности, входящих в состав валентных и деформационных химических полос: в диапазоне δ, 710–745 см⁻¹ полосы C–H валентности; 1790 см⁻¹ валентная эмиссия CO; 2800–2840 см⁻¹ валентная эмиссия –CH₂–; Всплески валентности OH наблюдались в областях 3200–3400 см⁻¹. Выявлено исчезновение полос поглощения в области 2900–3000 см⁻¹ (валентный всплеск карбоксильных групп). Показано, что в инфракрасном спектре синтезированных соединений видны линии поглощения высокой и средней интенсивности, обнаружены основные функциональные группы.

На основании данных масс-спектра установлено, что основная фрагментация (разделение на части) соединений, например, вещества 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты приводит к образованию молекулярных ионов и подтверждает массу этого вещества.

Спектр реакция микропреципитации (РМП) 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид 3α,7β-дигидроксихолановой кислоты в полях от 0,5 м.д. до 3,0 м.д. сигналов алкильных протонов и производных сигналов протонов, впервые обнаружено рибофуранозильное производное. Сигналы протонов стероидов, как обычно, находятся в полях 6,5–7,8 м.д. Данные спектров ИК -, масс- и ядерный магнитный резонанс (ЯМР) подтверждают строение и состав синтезированных соединений.

Для изучения биологической активности синтезированных соединений нами было проведено исследование острой токсичности синтезированного соединения. Результаты исследований показали, что вещество имеет низкую токсичность.

Эти результаты показали, что синтезированное нами вещество пригодно для изучения противовирусных свойств. Учитывая эти результаты, мы изучили его противовирусные свойства в отношении вируса гепатита С, содержащего рибонуклеиновой кислоты (РНК) на среде *in vitro*.

В качестве объекта исследования выбран патогенный вирус гепатита С, генотипа 1b из сыворотки крови больной заразившейся ВГС с титром 6.0 3g ТЦИД₅₀/мл (мерой инфекционного вирусного титра). Соединение 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты использовали разведения питательной среды «Игла МЭМ» (1:10). Для сравнения брали лекарство - ледипасвир.

Исследование цитотоксических свойств соединения 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты и воздействия различных концентраций соединений на монослой клеток *Vero(v)*, выращенный в 96 луночных пластиковых культуральных панелях. После формирования монослоя в лунки вносили по 25 мкл веществ в разных концентрациях: от 20 мкг до 0.31 мкг в 200 мкл. В качестве контроля служили лунки

с клетками *Vero (v)* в питательной среде в том же объеме, но без соединения 1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид-3-дигидроксо-5β-холановой кислоты. Культуры клеток выдерживали в атмосфере CO₂ при 37°C в течение 72 часов.

Рассчитывали цитотоксическую 60%-ю дозу (ТС₅₀), которая соответствовала концентрации соединения, приводящую к токсической гибели 60% клеток монослоя к 72 часам инкубации при 37°C после обработки клеток соединениями.

Противовирусную активность веществ изучали микрометодом в соответствии с методом подавления цитопатогенного действия вируса гепатита С. В каждую лунку подготовленную с сформированным монослоем клеток по 20 мкл вносили вирусосодержащую жидкость (множественность заражения составляла 0.1 ТЦИД₅₀/клетка) (см. таблицы 1 и 2).

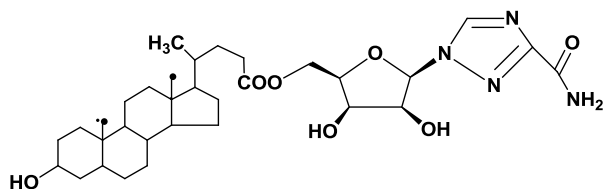
Результаты изучения противовирусной активности соединения. Как видно на 5-й и 7-й дни после заражения монослоя клеток *Vero(v)*, когда в контрольных, не обработанных веществами, культурах произошла вирус индуцированная гибель более 95% клеток, были обнаружены противовирусные свойства у всех веществ в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток *Vero(v)*. Однако прослеживались и определённые различия в проявлении противовирусной активности. Максимальная противовирусная активность вещества проявлялась за 36 часов до заражения вирусом, и самая высокая активность соединения с химико токсикологическое исследование (ХТИ) составила >34, а ЕС₉₅– 1.33 мкг/210 мкл.

В случае внесения соединения сразу же после заражения клеток вирусом, противовирусная активность снижалась и ХТИ (1), (2) и ледипасвира составила 4 и выше для соединения.

В условиях профилактического применения вещества наибольшей активностью характеризовались соединения применяемые сразу после заражения и после заражения, через 24ч. Их активность снизилась в 2 раза.

Формула изобретения

1-бета-D-рибофуранозил-1H-1,2,4-
триазол-3-карбоксиамида холановой кислоты,
формуле



обладающий противовирусным действием.

Таблица 1

Противовирусная активность соединений в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток Vero-E6 (5-й день после заражения вирусом гепатита С в дозе 0.1 ТЦИД₅₀/клетка)

Время внесения соединений	Наименование соединения	ТС50 (мкг/200м кл)	ЕС95 (мкг/200мкл)	ЕС50 (мкг/200 мкл)	ХТИ
За 24 часа до заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1H- 1,2,4-триазол-3- карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>30.0	3.0	1.50	>15.5
	Ледипасвир	10.0	1.25	0.62	16.0
Немедленно после заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1H- 1,2,4-триазол-3- карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>20.0	10.0	5.0	>4.0
	Ледипасвир	10.0	5.0	>2.5	>4.0
Через 24 после заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1H- 1,2,4-триазол-3- карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>20.0	20.0	10.0	>2.0
	Ледипасвир	10.0	5.0	>2.5	>4.0

Таблица 2

Противовирусная активность соединений в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток Vero-E6 (14-й день после заражения вирусом гепатита С в дозе 0.125 ТЦИД₅₀/клетка)

Время внесения соединений	Наименование соединения	ТС ₅₀ (мкг/2 00мкл)	ЕС ₉₅ (мкг/200м кл)	ЕС ₅₀ (мкг/200мкл)	ХТИ
За 48 часов до заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4- триазол-3-карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>22.0	2.85	1.65	>17
	Ледипасвир	10.0	1.25	0.62	16
Немедленно после заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4- триазол-3-карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>25.0	23.0	15.0	>2.3
	Ледипасвир	10.0	2.5	1.25	8.0
Через 48ч. после заражения вирусом	1-бета-d-рибофуранозил-1н-1,2,4- триазол-3-карбоксамид 3α,7β- дигидроксихолановой кислота	>20.0	>20.0	>20.0	>1.0
	Ледипасвир	10.0	10.0	5.0	2.0

Компьютерный набор: Газиев М.Х.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		