

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039938**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.30

(21) Номер заявки
201991350

(22) Дата подачи заявки
2018.01.10

(51) Int. Cl. *A61P 31/04* (2006.01)
C07C 229/24 (2006.01)
C07C 229/26 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
A61K 31/221 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ И КОМПОЗИЦИИ

(31) **1700404.5**

(32) **2017.01.10**

(33) **GB**

(43) **2020.04.30**

(86) **PCT/SG2018/050012**

(87) **WO 2018/132066 2018.07.19**

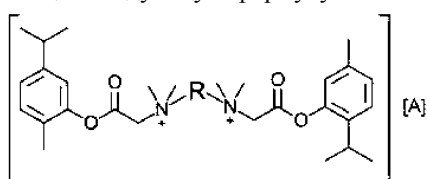
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕА ДЖЕНЕТИКС ПТЕ. ЛТД. (SG)

(72) Изобретатель:
**Бабилян Гайк (ID), Яраванон
Бенджамин (SG)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

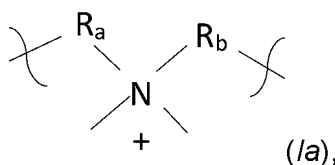
(56) CN-A-1683317

(57) Предложены соединения, имеющие следующую формулу:



(I),

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



(Ia),

где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

B1

039938

039938

B1

Настоящее изобретение относится к соединениям, которые могут быть применены для лечения инфекций, вызванных вирусами Herpesviridae, вируса папилломы человека, бактериальных инфекций и грибковых инфекций.

Уровень техники

Herpesviridae является большим семейством ДНК-вирусов, которые вызывают ряд заболеваний у человека и у животных. Наиболее распространенными представителями Herpesviridae, вызывающими заболевания у людей, являются вирус варицелла-зостер, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус простого герпеса типа 1 и вирус простого герпеса типа 2.

Вирус варицелла-зостер представляет собой широко распространенный вирус, который вызывает ветряную оспу у детей и опоясывающий герпес (опоясывающий лишай) у взрослых.

Вирус Эпштейна-Барр представляет собой вирус, который, как правило, вызывает инфекционный мононуклеоз (железистую лихорадку), помимо этого он также ассоциирован с раковыми заболеваниями, такими как лимфома Ходжкина, лимфома Беркитта и рак желудка.

Цитомегаловирус является еще одним членом семейства вирусов Herpesviridae. Цитомегаловирус человека (ЦМВЧ, или ЦМВ, или герпесвирус человека типа 5 (ГВЧ-5)) представляет собой вирус, который ассоциирован со слюнными железами и в большинстве случаев остается незамеченным у здоровых субъектов, однако может представлять угрозу для жизни субъектов с ослабленным иммунитетом, таких как пациенты с ВИЧ, реципиенты органов при трансплантации и новорожденные.

Вирус простого герпеса типа 1 и вирус простого герпеса типа 2 оба представляют собой вирусы, вызывающие вирусное заболевание - герпетическую лихорадку. Оба вируса могут вызывать инфекции ротовой полости и генитальные инфекции, хотя ВПГ-1 наиболее часто связан с инфекциями ротовой полости (например, герпес ротовой полости), в то время как ВПГ-2 наиболее часто ассоциирован с генитальными инфекциями (например, генитальный герпес). Вирусы простого герпеса вызывают инфекции, которые поражают примерно от 60 до 95% взрослых по всему миру (Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF (April 2009). "Herpes simplex". *Pediatr Rev.* 30 (4)).

Герпес ротовой полости главным образом ассоциирован с областью лица и/или рта и может приводить к появлению маленьких волдырей, которые формируют герпес губ (губная простуда). Герпес ротовой полости может также включать и другие симптомы, такие как воспаление горла, лихорадка, боль в мышцах, увеличение лимфатических узлов, головная боль и чувство общего недомогания, в особенности в течение первого случая после инфицирования пациента.

Генитальный герпес главным образом ассоциирован с гениталиями и может приводить к появлению небольшой сыпи в районе гениталий, внутренней поверхности бедра, ягодиц и/или ануса. Другие типичные симптомы на фоне данного вируса включают боль, зуд, жжение, выделения, лихорадку, головную боль, боль в мышцах, увеличение лимфатических узлов и чувство общего недомогания.

Герпес ротовой полости можно лечить противовирусными препаратами, способными сокращать длительность проявления симптомов, но не полностью убивать соответствующий вирус. После устранения симптомов герпеса ротовой полости вирус герпеса (например, ВПГ-1 или ВПГ-2) обычно сохраняется в неактивном состоянии в ветвях лицевого нерва и может периодически активироваться вновь с появлением герпеса на губах в тех же самых участках рта или лица, что и очаг первичной инфекции. У некоторых людей вирус сохраняется в организме бессимптомно, и, несмотря на это, его передача вполне возможна даже в отсутствие симптомов.

Генитальный герпес также можно лечить противовирусными препаратами, способными сокращать длительность проявления симптомов. Однако, в отличие от герпеса ротовой полости, отсутствуют какие-либо одобренные препараты, которые полностью уничтожают вирус в теле человека.

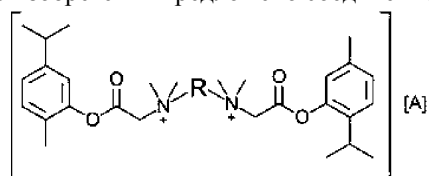
Вирус папилломы человека (ВПЧ) вызывает инфекции папилломавируса человека, которые главным образом не сопровождаются симптомами и исчезают сами по себе. Однако в некоторых случаях инфекция сохраняется и приводит к появлению бородавок или предраковых поражений. Предраковые поражения могут повышать риск нескольких типов рака, которые включают рак шейки матки, влагалища, полового члена, ануса, рта и горла (Ljubojevic, Suzana; Skerlev, Mihael (2014). "HPV-associated diseases". *Clinics in Dermatology.* 32 (2): 227-234.). ВПЧ является самой распространенной в мире инфекцией, передающейся половым путем, и большинство людей заражаются в какой-либо момент их жизни (Milner, Danny A. (2015). *Diagnostic Pathology: Infectious diseases.* Elsevier Health Sciences. p. 40).

Бактериальные и грибковые инфекции широко распространены по всему миру. Были разработаны различные препараты для лечения таких инфекций, они могут быть специфического или широкого спектра действия против видов и штаммов бактерий и грибов. Антибиотикорезистентность, и особенно в последнее время противогрибковая резистентность, преобладает все больше и превращается в неуклонно нарастающую проблему по всему миру. С учетом вышесказанного существует общемировая необходимость в новых лекарственных препаратах, способных помочь в лечении бактериальных и грибковых инфекций.

Принимая во внимание общую распространенность вируса герпеса (в особенности вируса простого герпеса) и вируса папилломы человека, а также ряда заболеваний, ассоциированных с данными вирусами, существует необходимость в терапии, нацеленной на данные вирусы, и которая способна лечить за-

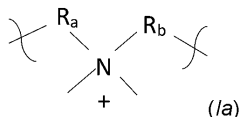
болевания, ассоциированные с данными вирусами.

В первом аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу:



(Формула I),

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



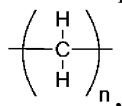
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

R может, например, представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Предпочтительно R представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

R может, например, представлять собой четвертичный амин в соответствии с формулой (Ia), в котором каждый из R_a и R_b представляет собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Каждый из R_a и R_b может представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, имеющую разное число атомов углерода.

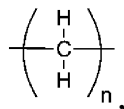
Предпочтительно каждый из R_a и R_b представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

Насыщенная линейная алкановая цепь может быть представлена следующей формулой:



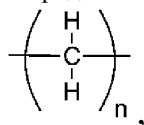
где n равно числу повторяющихся элементов, т.е. представляет собой определенное количество атомов углерода в линейной алкановой цепи.

Таким образом, в случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, то R предпочтительно представляет собой



где n принимает значения от 8 до 16, например 10.

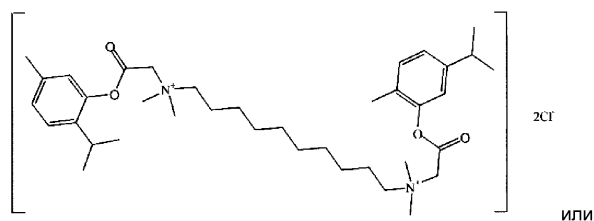
В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий формулу (Ia), соответствующего определению выше, то R_a и R_b предпочтительно представляют собой



где n принимает значения от 8 до 16, например 10.

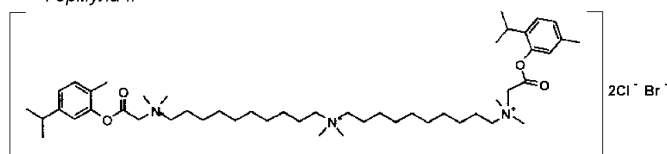
A может, например, содержать галогидные ионы, такие как хлорид-ионы (Cl^-), бромид-ионы (Br^-), иодид-ионы (I^-) и/или фторид-ионы (F^-). A может, например, содержать ионы других органических и неорганических кислот, таких как сульфат (SO_4^{2-}), карбонат (CO_3^{2-}), гидрокарбонат (HCO_3^-), гидросульфат (HSO_4^-), ацетат-ионы (CH_3COO^-) и/или формиат-ионы (HCOO^-). В случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, то A предпочтительно содержит два галогидных иона, например два хлорид-иона, таким образом, имея суммарный заряд -2. В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий формулу (Ia) в соответствии с приведенным выше определением, то A предпочтительно содержит два хлорид-иона и один бромид-ион, таким образом имея суммарный заряд -3.

Предпочтительно соединение формулы I выше имеет следующую формулу:



или

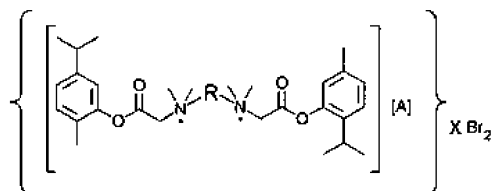
Формула II



Формула III

Касательно формулы II, R представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, имеющую 10 атомов углерода; и А представляет собой два хлорид-иона. Касательно формулы III, R представляет собой четвертичный амин, в котором каждый из R_a и R_b представляет собой линейную алкановую цепь, имеющую 10 атомов углерода, и А представляет собой два хлорид-иона и один бромид-ион.

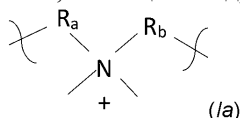
В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу:



Формула IV

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



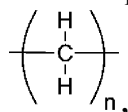
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3; и где X принимает значения 2, 4, 6, 8 или 10.

R может, например, представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Предпочтительно R представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

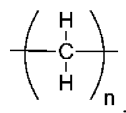
R может, например, представлять собой четвертичный амин в соответствии с формулой (Ia), в которой каждый из R_a и R_b представляет собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Каждый из R_a и R_b может представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, имеющую разное число атомов углерода.

Предпочтительно каждый из R_a и R_b представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

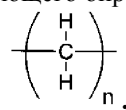
Насыщенная линейная алкановая цепь может быть представлена следующей формулой:



где n представляет собой число повторяющихся элементов, т.е. представляет собой число атомов углерода в линейной алкановой цепи. Таким образом, в случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, то R предпочтительно представляет собой



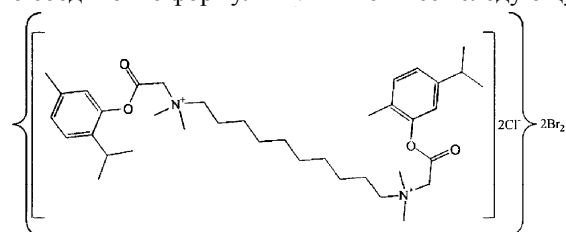
где n принимает значения от 8 до 16, например 10. В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий формулу (Ia), соответствующего определению выше, то R_a и R_b представляют собой



где n принимает значения от 8 до 16, например 10.

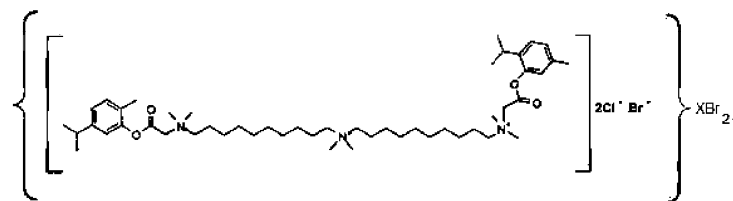
A может, например, содержать галоидные ионы, такие как хлорид-ионы (Cl⁻), бромид-ионы (Br⁻), иодид-ионы (I⁻) и/или фторид-ионы (F⁻). A может, например, содержать ионы других органических и неорганических кислот, таких как сульфат (SO₄²⁻), карбонат (CO₃²⁻), гидрокарбонат (HCO₃⁻), гидросульфат (HSO₄⁻), ацетат-ионы (CH₃COO⁻) и/или формиат-ионы (HCOO⁻). В случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, то A предпочтительно содержит два галоидных иона, например, два хлорид-иона, таким образом имея суммарный заряд -2. В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий формулу (Ia) в соответствии с приведенным выше определением, то A предпочтительно содержит два хлорид-иона и один бромид-ион, таким образом, имея суммарный заряд -3.

Предпочтительно соединение формулы IV выше имеет следующую формулу:



Формула V

или



формула (VI),

где X принимает значения 4, 8 или 10.

В формуле V: R представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, имеющую 10 атомов углерода; и A представляет собой два хлорид-иона.

В формуле VI: R представляет собой четвертичный амин, в котором каждый из R_a и R_b представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, имеющую 10 атомов углерода, и A представляет собой два хлорид-иона и один бромид-ион.

Заявителем обнаружено, что указанные выше соединения, представленные формулами I-VI, проявляют неожиданную антибактериальную и противогрибковую активность. Без привязки к конкретной теории выдвинута гипотеза, что данные антибактериальная и противогрибковая активности могут быть обусловлены комбинацией групп ароматических тимолов и карвакрола, групп четвертичного амина и длинноцепочечных алкильных групп. Кроме того, комплексы соединения согласно формуле I-III с бромом могут дополнительно усиливать антибактериальные и противогрибковые свойства указанных соединений.

Помимо этого, заявителем на основании компьютерного моделирования выявлено, что соединения согласно формулам I-VI, которые включают комбинацию групп тимола, карвакрола, четвертичного амина и длинноцепочечных алканов могут обладать противовирусной активностью, являясь эффективными против, например, вирусов герпеса, например вирусов простого герпеса и вируса папилломы человека.

Без привязки к конкретной теории существует предположение, что соединения формулы I-VI способны обладать непосредственной противовирусной активностью против вирусных частиц до взаимодействия вируса с клеткой-мишенью благодаря химическому взаимодействию с основными биологическими макромолекулами, такими как белки, липиды и нуклеопротеины. Соединения формулы I-VI должны быть способны нарушать раннюю стадию взаимодействия вируса с клеткой-мишенью, включая прикрепление вируса, взаимодействие с клеточным рецептором и проникновение вируса в клетку. В ходе

взаимодействия с клетками, зараженными внутри вирусами, соединения согласно формулам I-VI должны проявлять активность в качестве агентов, индуцирующих апоптотическую гибель клеток.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция (например, фармацевтическая композиция для человека и/или ветеринарная фармацевтическая композиция), содержащая соединение в соответствии с формулами I-VI выше.

Фармацевтическая композиция может быть представлена в форме, подходящей для одного или более путей введения: перорального, ректального, парентерального, трансдермального, внутривенного, внутриартериального, внутрикостной инфузии, внутрицеребрального, интрацеребровентрикулярного, интратекального, внутримышечного, подкожного, интравагинального, внутрибрюшинного, эпидурального, внутрицеребрального, внутрикостной инфузии, интравитреального, трансмукозального, буккального или назального введения.

Фармацевтическая композиция может содержать соединение в соответствии с формулами I-VI, фармацевтически приемлемый носитель, такой как водный раствор, нетоксичные вспомогательные вещества, включая соли и консерванты, буферы и тому подобное.

Примеры подходящих водных и неводных фармацевтических носителей, разбавителей, растворителей или основ включают воду, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное), карбоксиметилцеллюлозу и их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и вводимые путем инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат.

Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ включают антиадгезивы, связующие вещества, вещества покрытия, красители, разрыхлители, ароматические добавки, глйданты, скользящие вещества, консерванты, сорбенты и подсластители.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать добавки, такие как, но не ограничиваясь ими, консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества и диспергирующие агенты. Антибактериальные и противогрибковые агенты могут быть добавлены для предотвращения роста микробов и включают, например, м-крезол, бензиловый спирт, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту и тому подобные. В случае добавления консерванта предпочтительными являются бензиловый спирт, фенол и/или м-крезол; однако выбор консерванта никаким образом не ограничен данными примерами. Кроме того, может быть желательно добавление изотонических агентов, таких как сахара, натрия хлорид и тому подобных.

Фармацевтическая композиция, подходящая для перорального введения, может быть представлена, например, в форме таблетки, пилюли, форме с покрытием с сахаром, порошка, капсулы, жидкости, геля, сиропа, взвеси, суспензии, крахмальной капсулы (cachet) и тому подобное. Композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель, например липосомы, лактозу, трегалозу, сахарозу, маннитол, ксилитол, кристаллическую целлюлозу, хитозан, кальция карбонат, тальк, оксид титана, диоксид кремния и тому подобное.

Фармацевтическая композиция может быть получена, например, путем объединения соединений согласно настоящему изобретению с твердым вспомогательным веществом, тонкого измельчения смеси (при необходимости) и помещения в капсулу, например в мягкую герметичную капсулу, состоящую из желатиновой капсулы, желатина и покрытия (например, глицерина или сорбитола) или из композиции капсулы, подходящей для вегетарианцев. В случае мягкой капсулы композиция может быть растворена или суспендирована в подходящей жидкости, такой как жирное масло, жидкий парафин или жидкий полиэтиленгликоль, вместе со стабилизатором или без него.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено соединение или фармацевтическая композиция в соответствии с приведенным выше определением для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено соединение или фармацевтическая композиция в соответствии с приведенным выше определением для применения в лечении инфекций вируса герпеса, вируса папилломы человека, бактериальных инфекций и/или грибковых инфекций.

Вирус герпеса может представлять собой один или более вирусов простого герпеса, вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2), вирус варицелла-зостер (ВВЗ), вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, розеоновирус, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, герпесвирусы животных, такие как вирус псевдобешенства и герпесвирус крупного рогатого скота типа 1.

Предпочтительно вирус герпеса представляет собой вирус простого герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 или вирус простого герпеса типа 2) или цитомегаловирус.

Бактериальные инфекции могут включать инфекции, вызванные грамположительными и/или грамотрицательными бактериями.

Бактериальные инфекции могут быть вызваны, например, бактериями *Staphylococcus aureus* и/или *Salmonella enterica*.

Грибковые инфекции могут представлять собой поверхностные микозы, микозы кожи, подкожные микозы и/или системные микозы.

Грибковые инфекции могут быть вызваны, например, *Candida albicans*.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение соединения или фармацевтической композиции в соответствии с приведенным выше определением в получении лекарственного средства для лечения инфекций вируса герпеса, вируса папилломы человека, бактериальных инфекций и/или грибковых инфекций.

Вирус герпеса может представлять собой один или более вирусов простого герпеса, вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2), вирус варицелла-зостер (ВВЗ), вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, розеоовирус, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, герпес-вирусы животных, такие как вирус псевдобешенства и герпесвирус крупного рогатого скота типа 1.

Предпочтительно вирус герпеса представляет собой вирус простого герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 или вирус простого герпеса типа 2) или цитомегаловирус.

Бактериальные инфекции могут включать инфекции, вызванные грамположительными и/или грамотрицательными бактериями.

Бактериальные инфекции могут быть вызваны, например, бактериями *Staphylococcus aureus* и/или *Salmonella enterica*.

Грибковые инфекции могут представлять собой поверхностный микоз, микоз кожи, подкожный микоз и/или системный микоз.

Грибковые инфекции могут быть вызваны, например, *Candida albicans*.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения инфекций вируса герпеса, вируса папилломы человека, бактериальных инфекций и/или грибковых инфекций, содержащих стадию введения субъекту соединения или фармацевтической композиции в соответствии с приведенным выше определением.

Вирус герпеса может представлять собой один или более вирусов простого герпеса, вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2), вирус варицелла-зостер (ВВЗ), вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, розеоовирус, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, герпес-вирусы животных, такие как вирус псевдобешенства и герпесвирус крупного рогатого скота типа 1.

Предпочтительно вирус герпеса представляет собой вирус простого герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 или вирус простого герпеса типа 2) или цитомегаловирус.

Бактериальные инфекции могут включать инфекции, которые вызваны грамположительными и/или грамотрицательными бактериями.

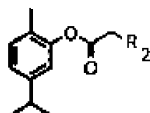
Бактериальные инфекции могут быть вызваны, например, бактериями *Staphylococcus aureus* и/или *Salmonella enterica*.

Грибковые инфекции могут представлять собой поверхностные микозы, микозы кожи, подкожные микозы и/или системные микозы.

Грибковые инфекции могут быть вызваны, например, *Candida albicans*.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединений, соответствующих приведенному выше определению в формулах I-III, включающий следующие стадии:

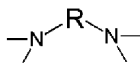
i) проведение реакции карвакрола с R_2CH_2COCl с получением соединения, имеющего формулу:



(формула VII),

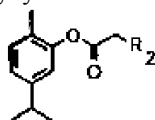
где R_2 представляет собой галоген, например, хлор или бром;

ii) проведение реакции соединения, имеющего формулу



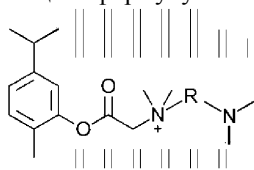
(формула VIII),

с соединением, имеющим формулу



(формула VII)

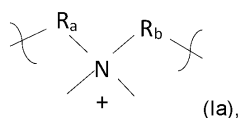
с получением соединения, имеющего формулу



(формула IX),

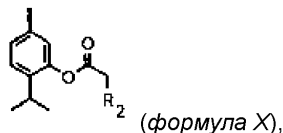
где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



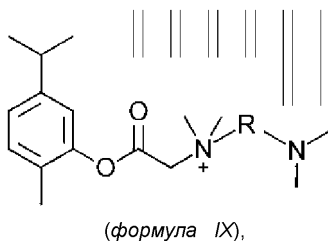
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода;

iii) проведение реакции тимола с R_2CH_2COCl с получением соединения, имеющего формулу

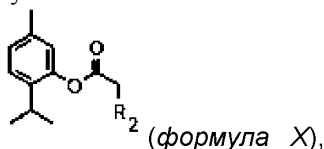


где R_2 представляет собой галоген, например, хлор или бром;

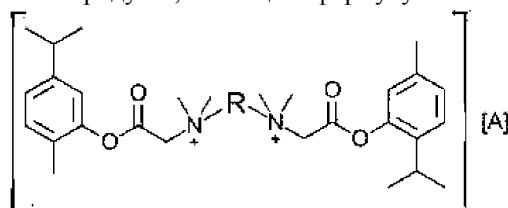
v) проведение реакции соединения, имеющего формулу



с соединением, имеющим формулу

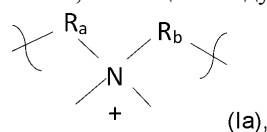


с получением конечного продукта, имеющего формулу



где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода; и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:

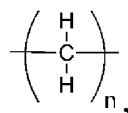


где каждый из R_a и R_b представляют собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

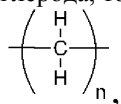
R может, например, представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Предпочтительно R представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

R может, например, представлять собой четвертичный амин в соответствии с формулой (Ia), в котором R_a и R_b представляют собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 18 атомов углерода, например от 8 до 16 атомов углерода, например от 8 до 14 атомов углерода, например от 9 до 15 атомов углерода, например 10 атомов углерода. Каждый из R_a и R_b может представлять собой линейную или разветвленную насыщенную алкановую цепь, имеющую различное число атомов углерода. Предпочтительно каждый из R_a и R_b представляет собой линейную насыщенную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода, например 10 атомов углерода.

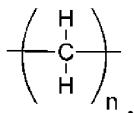
Насыщенная линейная алкановая цепь может быть представлена следующей формулой:



где n представляет собой число повторяющихся звеньев, т.е. представляет собой определенное число атомов углерода в линейной алкановой цепи. Таким образом, в случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, то R предпочтительно представляет собой

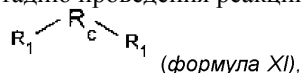


где n принимает значения от 8 до 16, например 10. В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий формулу (Ia) в соответствии с приведенным выше определением, то R_a и R_b предпочтительно представляют собой

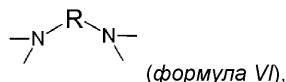


где n принимает значения от 8 до 16, например 10.

В случае если R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, способ может включать дополнительную стадию проведения реакции соединения, имеющего формулу

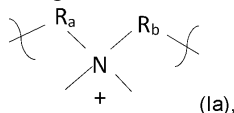


с четырьмя мольными эквивалентами диметиламина с получением третичного диамина, имеющего следующую формулу

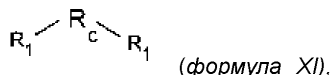


где R_c представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и R_1 представляет собой галоген, например бром или хлор; и R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода.

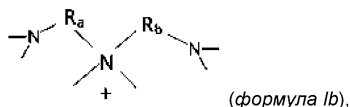
В случае если R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



где каждый из R_a и R_b представляют собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, способ может включать дополнительную стадию проведения реакции соединения, имеющего формулу



с тремя мольными эквивалентами диметиламина с получением четвертичного амина, имеющего следующую формулу

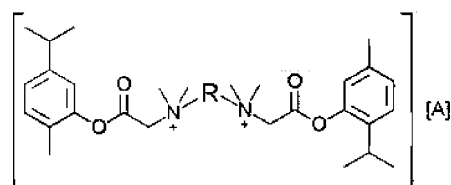


где R_c представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и R_1 представляет собой галоген, например бром или хлор; и где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода.

Обе реакции стадий II и IV могут быть проведены при температуре -10°C .

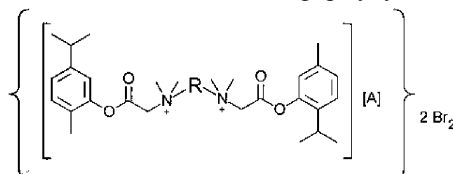
Способ может дополнительно включать одну или более стадий разделения и/или экстракции, например, стадия разделения может включать колоночную хроматографию, жидкостную хроматографию низкого давления, высокоэффективную жидкостную хроматографию и тому подобное. Стадия очистки может включать стандартные процессы очистки, известные в данной области техники, например фильтрацию, выпаривание, жидкофазную экстракцию, кристаллизацию, адсорбцию, перекристаллизацию, хроматографию, дистилляцию и тому подобное.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединения, имеющего формулу IV-VI в соответствии с приведенным выше определением, где указанный способ включает проведение реакции (например, комплексообразования) соединения, имеющего формулу



(Формула I),

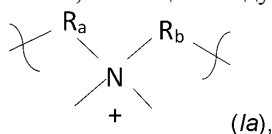
с бромом с получением соединения, имеющего формулу



(формула IV),

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:

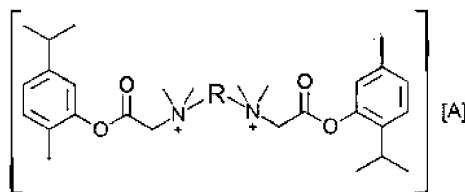


(Ia),

где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединения, приведенный по существу в настоящем описании со ссылкой на фиг. 1, фиг. 2 или фиг. 3.

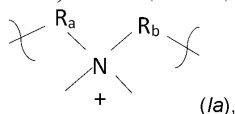
В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу:



(формула I)

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода; и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



(Ia),

где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3;

и при этом указанное соединение необязательно представлено в виде комплекса с бромом.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на приложенные чертежи, фиг. 1-7, где

на фиг. 1 изображен пример способа синтеза соединения согласно настоящему изобретению;

на фиг. 2 изображен пример способа синтеза ещё одного соединения согласно настоящему изобретению;

на фиг. 3 изображен пример способа синтеза ещё одного соединения согласно настоящему изобретению;

на фиг. 4 изображены результаты исследования на цитотоксичность соединения согласно настоящему изобретению в концентрациях от 0 до 50 мкг/мл на клетках Vero и влияние соединения настоящего изобретения на распространение и бляшкообразование вируса простого герпеса типа 1 в клетках Vero;

на фиг. 5 изображены результаты исследования на цитотоксичность другого соединения согласно настоящему изобретению в концентрациях от 0 до 100 мкг/мл на клетках Vero и влияние другого соединения согласно настоящему изобретению на распространение и бляшкообразование вируса простого герпеса типа 1 в клетках Vero;

на фиг. 6 изображены результаты исследования на цитотоксичность другого соединения согласно

настоящему изобретению в концентрациях от 0 до 100 мкг/мл на клетках Vero;

на фиг. 7 изображены результаты влияния соединений согласно настоящему изобретению на бляшкообразование вируса осповакцины в клетках BSC 40.

Способ получения соединения согласно настоящему изобретению

Соединение 2

N^1 -{2-[2-этил-5-(пропан-2-ил)фенокси]-2-оксоэтил}- N^1, N^1, N^{10}, N^{10} -тетраметил- N^{10} -{2-[5-метил-2-(пропан-2-ил)фенокси]-2-оксоэтил}декан-1,10-бис(аммоний) дихлорид

На фиг. 1 изображен пример способа синтеза Соединения 2, которое представляет собой соединение согласно настоящему изобретению в соответствии с определением по формуле II выше.

На первой стадии 1,10-дибромдекан (Соединение 5) подвергают взаимодействию с 4 мольными эквивалентами диметиламина с получением 1,10-бис(диметиламино)декана (Соединение 6). Реакцию проводят при 4-5°C в бензоле, после чего следует стадия экстракции кислотой с последующей обработкой щелочью и экстракцией диэтиловым эфиром. Извлеченные фракции сушат над сульфатом магния и затем очищают с помощью вакуум-перегонки.

На второй стадии карвакрол (2-метил-5-(1-метилэтил)-фенол) (Соединение 7) подвергают взаимодействию с хлорацетилхлоридом с получением Соединения 8. Реакцию проводят при -10°C в течение 1 ч и затем осуществляют перемешивание при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь затем промывают кислотой с последующей обработкой натрия бикарбонатом, а затем водой. Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют под вакуумом.

На третьей стадии Соединение 8 подвергают взаимодействию с 1,10-бис(диметиламино)деканом (Соединение 6) с получением Соединения 9. Реакцию проводят при кипении Соединения 6 и Соединения 8 в бензоле в течение 15 мин и затем реакционную смесь оставляют при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем в реакционную смесь добавляют этилацетат, верхний слой удаляют, а нижний слой выделяют в виде остатка. Далее остаток (содержащий Соединение 9) используют на пятой стадии.

На четвертой стадии тимол (2-изопропил-5-метилфенол) (Соединение 10) подвергают взаимодействию с хлорацетилхлоридом с получением Соединения 11. Реакцию проводят при -10°C в течение 1 ч и затем осуществляют перемешивание при комнатной температуре в течение 5 ч. Затем реакционную смесь промывают кислотой с последующей обработкой натрия бикарбонатом, а затем водой. Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют под вакуумом.

На пятой стадии остаток из третьей стадии (содержащий Соединение 9) подвергают взаимодействию с соединением 11 с получением конечного продукта: Соединение 2. Реакцию проводят при кипении Соединения 9 и 11 в бензоле в течение 15 мин и затем реакционную смесь оставляют при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем в реакционную смесь добавляют этилацетат, верхний слой удаляют, а нижний слой выделяют в виде остатка.

Полученный остаток затем растворяют в ацетоне и Соединение 2 осаждают путем добавления диэтилового эфира.

Следует понимать, что в способ также могут быть включены дополнительные стадии очистки и разделения, например между каждой из указанных выше стадий, а также по окончании способа для очистки конечного соединения (Соединения 2).

Стадии разделения могут включать стадии проведения колоночной хроматографии, жидкостной хроматографии низкого давления, высокоэффективной жидкостной хроматографии и тому подобное. Стадии очистки могут включать стандартные процессы очистки, известные в данной области техники, например фильтрацию, выпаривание, жидкофазную экстракцию, кристаллизацию, адсорбцию, перекристаллизацию, хроматографию, дистилляцию и тому подобное.

Соединение 2 выделяли в виде гигроскопичного порошка коричневого цвета имеющего следующие характеристики.

Внешний вид: гигроскопичный порошок коричневого цвета

Молекулярная формула: $C_{38}H_{62}N_2O_4Cl_2$

Молекулярная масса: 681,81 г/моль

Температура плавления: 92-96°C

pH водного раствора = 6

Растворимость: растворимо в воде, ацетоне, ацетонитриле, диметилсульфоксиде (ДМСО); нерастворимо в диэтиловом эфире, этилацетате и гексане.

1H ЯМР (ДМСО/ CCl_4 - 1/3) δ 1,18 (d, 6H, $-CH_3$), 1,22 (d, 6H, $-CH_3$), 1,37-1,40 (m, 12H, $-CH_2-$), 1,81-1,85 (m, 4H, $-CH_2-$), 2,17 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,32 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,87 (q, 1H, $-CH$), 3,04 (q, 1H, $-CH$), 3,47 (s, 12H, $+N(CH_3)_2$), 3,80-3,85 (m, 4H, $+N-CH_2$), 5,33 (s, 4H, $-(C=O)-CH_2-N+$), 6,96-7,02 (m, 4H, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H).

Соединение 4

Дибромовый комплекс

N^1 -{2-[2-метил-5-(пропан-2-ил)фенокси]-2-оксоэтил}- N^1, N^1, N^{10}, N^{10} -тетраметил- N^{10} -{2-[5-метил-2-(пропан-2-ил)фенокси]-2-оксоэтил}декан-1,10-бис(аммоний) дихлорид

На фиг. 2 изображен пример способа синтеза Соединения 4, которое также является соединением

согласно настоящему изобретению и соответствует определению по формуле V выше.

Соединение 2 синтезировали в соответствии со способом, определенным выше для Соединения 2.

После получения соединения 2 его подвергают реакции с бромом с получением Соединения 4.

В соответствии с приведенным выше определением для Соединения 2 следует понимать, что в способ также могут быть включены дополнительные стадии очистки и разделения, например между каждой из указанных выше стадий, а также по окончании способа для очистки конечного соединения (Соединение 4).

Стадии разделения могут включать стадии выполнения колоночной хроматографии, жидкостной хроматографии низкого давления, высокоэффективной жидкостной хроматографии и тому подобное. Стадии очистки могут включать стандартные процессы очистки, известные в данной области техники, например фильтрацию, выпаривание, жидкофазную экстракцию, кристаллизацию, адсорбцию, перекристаллизацию, хроматографию, дистилляцию и тому подобное.

Соединение 4 выделяли в виде смолы оранжевого цвета, имеющей следующие характеристики.

Внешний вид: смола оранжевого цвета

Молекулярная формула: $C_{38}H_{62}N_2O_4Cl_2Br_4$

Молекулярная масса: 1001,41 г/моль

Растворимость: растворимо в диметилсульфоксиде (ДМСО); нерастворимо в воде.

1H ЯМР (ДМСО/ CCl_4 - 1/3) δ 1,18-1,23 (m, 12H, $-CH_3$), 1,37-1,40 (m, 24H, $-CH_2-$), 1,81-1,85 (m, 4H, $-CH_2-$), 2,17 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,32 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,87 (q, 1H, $-CH$), 3,04 (q, 1H, $-CH$), 3,47 (s, 12H, $+N(CH_3)_2$), 3,80-3,85 (m, 4H, $+N-CH_2$), 5,33 (s, 4H, $-(C=O)-CH_2-N+$), 6,96-7,02 (m, 4H, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H).

Соединение 3

Систематическое название: N^1 -{2-[2-метил-5-(пропан-2-ил)фенокси]-(2-оксоэтил)(диметил)азаниумилбромид} децил}- N^{10} -{2-[5-метил-2-(пропан-2-ил)фенокси]-2-оксоэтил}- N^1, N^1, N^{10}, N^{10} -тетраметил-декан-1,10-бис(аммоний) дихлорид

На фиг. 3 представлен пример способа синтеза Соединения 3, которое также является соединением согласно настоящему изобретению и соответствует определению по формуле III выше.

На первой стадии 1,10-дибромдекан 5 подвергают взаимодействию с 3 мольными эквивалентами диметиламина с получением Соединения 12. Реакцию проводят при 4-5°C в бензоле, после чего следует стадия экстракции кислотой с последующей обработкой щелочью и экстракцией диэтиловым эфиром. Извлеченные фракции сушат над сульфатом магния и затем очищают с помощью вакуум-перегонки.

На второй стадии тимол (2-изопропил-5-метилфенол) (Соединение 10) подвергают взаимодействию с хлорацетилхлоридом с получением Соединения 11. Реакцию проводят при -10°C в течение 1 ч и затем осуществляют перемешивание при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь затем промывают кислотой с последующей обработкой натрия бикарбонатом, а затем водой. Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют под вакуумом.

На третьей стадии Соединение 11 подвергают взаимодействию с Соединением 12 с получением Соединения 13. Реакцию проводят при кипении Соединения 11 и 12 в бензоле в течение 15 мин и затем реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на 24 ч. Затем в реакционную смесь добавляют этилацетат, верхний слой удаляют, а нижний слой выделяют в виде остатка. Далее остаток (содержащий Соединение 13) используют на пятой стадии.

На четвертой стадии карвакрол (2-метил-5-(1-метилэтил)фенол) (Соединение 7) подвергают взаимодействию с хлорацетилхлоридом с получением Соединения 8. Реакцию проводят при -10 С в течение 1 ч и затем осуществляют перемешивание при комнатной температура в течение 5 ч. Затем реакционную смесь промывают кислотой с последующей обработкой натрия бикарбонатом, а затем водой. Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют под вакуумом.

На пятой стадии остаток из третьей стадии (содержащий Соединение 13) подвергают взаимодействию с Соединением 8 с получением конечного продукта: Соединение 3. Реакцию проводят при кипении Соединения 8 и 13 в бензоле в течение 15 мин и затем реакционную смесь оставляют при комнатной температуре в течение 24 ч.

Затем в реакционную смесь добавляют этилацетат, верхний слой удаляют, а нижний слой выделяют в виде остатка.

Остаток затем растворяют в ацетоне и Соединение 3 осаждают путем добавления диэтилового эфира.

Следует понимать, что в способ могут быть также включены дополнительные стадии очистки и разделения, например между каждой из указанных выше стадий, а также по окончании способа для очистки конечного соединения (Соединения 3).

Стадии разделения могут включать стадии выполнения колоночной хроматографии, жидкостной хроматографии низкого давления, высокоэффективной жидкостной хроматографии и тому подобное. Стадии очистки могут включать стандартные процессы очистки, известные в данной области техники, например фильтрацию, выпаривание, жидкофазную экстракцию, кристаллизацию, адсорбцию, перекристаллизацию, хроматографию, дистилляцию и тому подобное.

Соединение 3 выделяли в виде гигроскопичного порошка коричневого цвета имеющего следующие характеристики.

Внешний вид: гигроскопичный порошок коричневого цвета

Молекулярная формула: $C_{50}H_{88}N_3O_4ClBr$

Молекулярная масса: 946,06 г/моль

Температура плавления: 75-78°C

pH водного раствора = 7,2

Растворимость: растворимо в воде, ацетоне, диметилсульфоксиде (ДМСО); нерастворимо в диэтиловом эфире и этилацетате.

Проявляет свойства поверхностно-активного вещества

1H ЯМР (ДМСО/ CCl_4 - 1/3) δ 1,18-1,23 (m, 12H, $-CH_3$), 1,38-1,42 (m, 24H, $-CH_2-$), 1,80-1,84 (m, 8H, $-CH_2-$), 2,18 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,34 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,90-3,10 (m, 2H, $-CH$), 3,45-3,50 (m, 18H, $+N(CH_3)_2$), 3,75-3,80 (m, 8H, $+N-CH_2-$), 5,22 (s, 4H, $-C(=O)-CH_2-N+$), 6,96-7,02 (m, 4H, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H).

Пример 1.

Для Соединений 2, 3 и 4 было проведено исследование антибактериальной и противогрибковой активности.

Для каждого соединения было проведено исследование минимальной подавляющей концентрации (МПК) для определения чувствительности методом разведений в бульоне.

Оборудование

Стандарт мутности МакФарланда 0,5

Пробирка Falcon круглодонная 5 мл

Одноразовые петли (1 мкл и 10 мкл)

Градуированные пипетки (20-1000 мкл)

Одноразовые чашки Петри

Среды

Стерильный физиологический раствор

ТСБ (триптический соевый бульон)

ТСА (триптический соевый агар)

Штаммы бактерий и грибов

Salmonella enterica серовар Typhimurium ATCC 14028

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Candida albicans ATCC 10231

Соединения 2, 3 и 4 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до 10 мг/мл и далее разбавляли двукратно для испытания в ТСБ.

Метод

День 1

Стандартизация инокулюма

Из чистой культуры, инкубированной в течение ночи, отбирали материал по меньшей мере из 3-4 колоний и полностью суспендировали его в пробирках с 4 мл физиологического раствора. Суспензию перемешивали.

Для соответствия стандарту мутность инокулюма корректировали визуальным сравнением со стандартом МакФарланда 0,5, используя лист белой бумаги с черными линиями на фоне.

Для проведения анализа данных видов микроорганизмов суспензию МакФарланда 0,5 разбавляли следующим образом:

Грамотр.: 10 мкл стандарта МакФарланда 0,5 в 10 мл бульона

Грампол.: 50 мкл стандарта МакФарланда 0,5 в 10 мл бульона

Данные суспензии использовали для инокуляции в течение 15 мин.

Инокуляция и инкубирование

В круглодонные пробирки Falcon 5 мл добавляли с использованием градуированной пипетки по 500 мкл суспензии инокулята и 500 мкл антимикробного агента в двойном разведении.

Пробирки герметично закрывали и инкубировали при 37°C в течение 18-22 ч. Это было выполнено во избежание потери питательной среды и перекрестной контаминации.

Стандарт МакФарланда 0,5 содержит примерно 10^8 КОЕ/мл. Стандартизация инокулюма крайне важна, так как интерпретация результатов производится исходя из конкретного инокулюма.

В каждой пробирке содержалось примерно по 5×10^5 - 1×10^6 КОЕ/мл после инокуляции бактерий и 5×10^3 - 1×10^4 КОЕ/мл дрожжей.

День 2

Проверяли чистоту суспензии инокулюма.

Проверяли рост в 3 пробирках с положительным контролем.

Регистрировали минимальную подавляющую концентрацию (МПК) в виде наименьшей концентрации антимикробного агента при отсутствии видимого роста.

Результаты приведены в таблице ниже.

Подводя итог, следует отметить, что все испытываемые соединения демонстрировали выраженную противогрибковую активность против *Candida albicans*, а также антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* и *Salmonella enterica* серовар Typhimurium.

Антимикробная активность различных образцов при испытании в независимых экспериментах (n=4) методом разведений в бульоне

Культуры	Число бактериальных/дрожжевых клеток (КОЕ/мл)#	МПК образца (мкг/мл) ¹		
		Соединение 2	Соединение 3	Соединение 4
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6x10 ³	62,5-125*	31,25-62,5	31,25-62,5
	3x10 ³	62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
	6x10 ³	62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
	6,5x10 ³	62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2.1x10 ⁶	31,25-62,5	15,6-31,25	15,6-31,25
	1,2x10 ⁶	31,25-62,5	15,6-31,25	31,25-62,5
	2x10 ⁶	31,25-62,5	15,6-31,25	15,6-31,25
	1,4x10 ⁶	31,25-62,5	15,6-31,25	15,6-31,25
<i>Salmonella enterica</i> серовар Typhimurium ATCC 14028	5x10 ⁵	62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
		62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
		62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5
		62,5-125	31,25-62,5	31,25-62,5

Представляет собой число бактериальных/дрожжевых клеток (КОЕ/мл) при испытании в 2-х повторах в 4 независимых экспериментах;

* числа, выделенные жирным шрифтом, получены при высевании для установления конечного титра бактериальных/дрожжевых клеток. Это означает, что числа, выделенные жирным шрифтом, представляют собой бактерицидную концентрацию, а числа без выделения жирным шрифтом представляют собой бактериостатическую концентрацию соединений в диапазоне МПК;

1 - определение МПК методом разведения в жидкой питательной среде с использованием Sensititre. 4th Ed. April 2003 Edited by: Rene S. Hendriksen (DFVF).

Пример 2.

Противовирусный эффект и цитотоксичность соединений настоящего изобретения изучали испытанием соединений 2, 3 и 4 на различных клеточных линиях млекопитающих.

Материалы и методы

Клетки и вирусы

Было проведено исследование обоих вирусов: вирус простого герпеса-1 (ВПГ-1) и вирус осповакцины (BOB); использованные клеточные линии включали клетки HeLa, BSC 40 и Vero.

Клетки HeLa, Vero и BSC 40 культивировали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco) в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C.

Western Reserve штамм вируса осповакцины (WR-BOB) выращивали в клетках BSC40, титровали и хранили при -80°C.

Вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) выращивали в клетках Vero, титровали и хранили при -80°C.

Соединения и реагенты

Соединения 2, 3 и 4 (в форме порошка) растворяли в абсолютном этаноле, получая основной раствор с концентрацией 0,2 г в 1 мл. Аликвоты хранили при -20°C. Перед проведением эксперимента непосредственно выполняли серийное разведение в питательной среде, не содержащей сыворотку (DMEM).

Цитотоксичность

Цитотоксический эффект химических соединений исследовали на клетках HeLa, BSC40 и Vero. Клетки высевали на 12-луночных планшетах, так чтобы на следующий день клеточный монослой занимал 80% поверхности чашки. Клетки обрабатывали Соединениями 2, 3 и 4 в различных концентрациях. После 30-минутной предварительной обработки к клеткам добавляли питательную среду в присутствии одинаковых концентраций Соединений 2, 3 и 4. Наблюдение за клетками проводили ежедневно, фиксацию и окрашивание проводили через 48 ч или 72 ч после обработки с последующим фотографированием. Все образцы фиксировали в 4% растворе формальдегида в H₂O в течение 20 мин при комнатной температуре с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым в течение 30 мин при комнатной температуре.

Вирусные инфекции и анализ бляшкообразования

Свежеслившиеся (freshly confluent) клетки инфицировали WR-BOB и ВПГ-1 (примерно 20-300 БОЕ на лунку в 6-луночном планшете или 12-луночном планшете) при 37°C в течение 1 ч. Клетки промывали, культивировали в питательной среде, содержащей 1% агарозы, и проводили фиксацию на 2-й день после

инфицирования.

В другом случае клетки предварительно обрабатывали не содержащей сыворотку средой Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), или DMEM, содержащей различные концентрации соединений перед инфицированием. Соединения 2 и 3 оставались в культуре на всем протяжении эксперимента до тех пор, пока клетки не фиксировали как описано выше. В некоторых экспериментах анализ бляшкообразования проводили без агара.

Результаты

Цитотоксичность соединений в различных клеточных линиях млекопитающих

Для того, чтобы исследовать противовирусный эффект соединений 2, 3 и 4 подходящее разбавление для соединений подбирали так, чтобы соединения были не токсичны для клеток и чтобы отсутствовало влияние на жизнеспособность клеток. Исследование проводили в диапазоне концентраций соединений в различных клеточных линиях млекопитающих, таких как клетки HeLa, BSC40 и Vero.

Культивируемые в течение ночи клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин соединениями 2, 3 и 4 в дозах от высокого уровня к низкому в среде, не содержащей сыворотку. Затем среду заменяли нормальной питательной средой, содержащей соединения 2, 3 и 4 на протяжении всего эксперимента. Наблюдение за клетками проводили ежедневно до 72 ч включительно с последующей фиксацией, окрашиванием и фотографированием. В соответствии с изображениями на фиг. 4, 5 и 6 в данном эксперименте обнаружено, что для всех трех соединений клетки переносят воздействие соединениями 2, 3 и 4 в концентрациях от 25 до 100 мкг/мл. На каждой из фиг. 4 и 5 и на фиг. 6 строки с пометкой "С" отображены результаты обработки клеток Vero, которые не были инфицированы ВПГ-1 и были обработаны соединениями 2, 3 и 4.

Распространение ВПГ-1 и бляшкообразование вируса

Подавляющий эффект соединений 2 и 3 наблюдался в клетках Vero. Клетки предварительно обрабатывали различными концентрациями соединений 2 и 3 с последующей обработкой буфером или буфером, содержащим ВПГ-1. Через два дня после инфицирования проводили фиксирование, окраску и фотографирование клеток. Для того чтобы определить, могут ли соединения подавлять распространение и бляшкообразование ВПГ-1, проводили анализ бляшкообразования в жидкости с целью определения распространения (строка А на фиг. 4 и 5), а также в агаре с целью определения числа бляшек (строка В на фиг. 4 и 5). У соединений 2 и 3 наблюдался выраженный подавляющий эффект, что показано на фиг. 4 и 5, соответственно. Оба соединения эффективно снижали распространение ВПГ-1, а также число бляшек в клетках Vero дозозависимым образом.

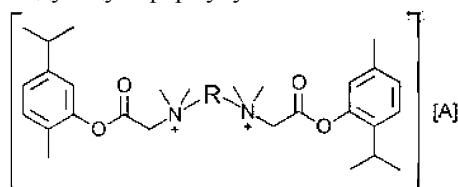
Соединения 2 и 3 не обладают подавляющим эффектом в отношении бляшкообразования вируса осповакцины.

Для исследования специфичности соединений 2 и 3 в отношении ВПГ-1 данные соединения также испытывали на вирусе осповакцины, который представляет собой также ДНК-вирус. Клетки BSC 40 были не обработаны или их предварительно обрабатывали соединениями в концентрации 50 мкг/мл, затем их инфицировали вирусом осповакцины и параллельно наблюдали за ходом эксперимента. Как показано на фиг. 7, ни одно из соединений 2 или 3 не подавляло на бляшкообразование у вируса осповакцины (BOV), что указывает на то, что подавляющий эффект соединений 2 и 3 является высокоспецифичным по отношению к инфекции ВПГ-1.

Исходя из упомянутых выше экспериментов, можно заключить, что все испытываемые клетки могут переносить воздействие соединений 2, 3 и 4 в концентрациях от 0 до 100 мкг/мл. Соединения 2 и 3 оба демонстрируют выраженный противовирусный эффект против ВПГ-1 в инфицированных клетках Vero, как в отношении распространения вируса, так и в отношении бляшкообразования. В присутствии 50 мкг/мл соединения инфекционность снижалась на 50%. В присутствии 100 мкг/мл соединения инфекционность снижалась на 80%. Ни одно из исследуемых соединений не проявляло активность в отношении вируса осповакцины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

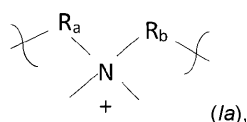
1. Соединение, имеющее следующую формулу:



(I),

где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2;

или R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



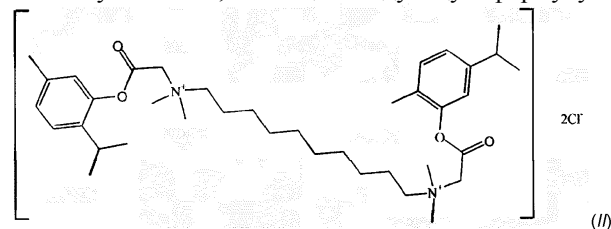
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

2. Соединение по п.1, в котором R представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода.

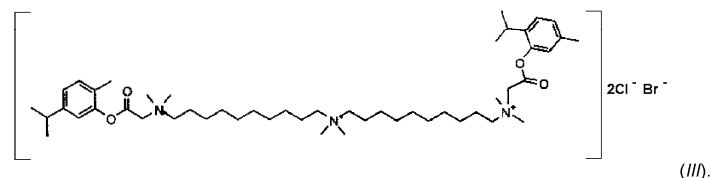
3. Соединение по п.1, в котором R_a и R_b представляют собой насыщенные линейные алкановые цепи, содержащие от 8 до 16 атомов углерода.

4. Соединение по любому из пп.1-3, в котором указанные один или более анионов выбраны из хлорид-анионов и бромид-анионов.

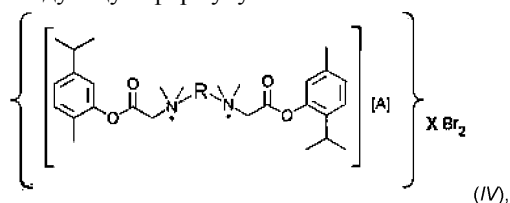
5. Соединение по любому из пп.1-4, имеющее следующую формулу:



или

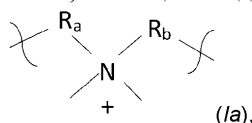


6. Соединение, имеющее следующую формулу:



где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



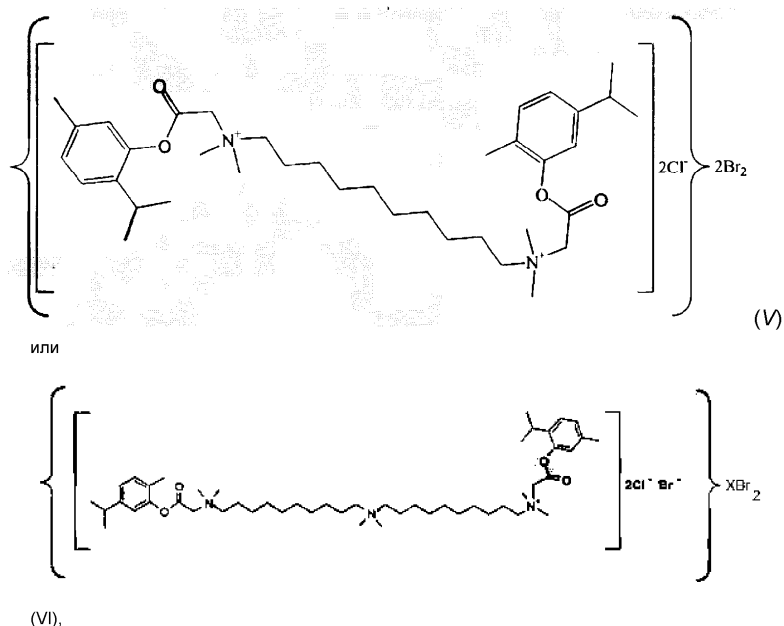
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3; и где X принимает значения 2, 4, 6, 8 или 10.

7. Соединение по п.6, в котором R представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода.

8. Соединение по п.6, в котором R_a и R_b представляют собой насыщенные линейные алкановые цепи, содержащие от 8 до 16 атомов углерода.

9. Соединение по любому из пп.6, 7 или 8, в котором указанные один или более анионов выбраны из хлорид-анионов и бромид-анионов.

10. Соединение по любому из пп.6, 7, 8 или 9, имеющее следующую формулу:



где X принимает значения 4, 8 или 10.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Применение соединения по любому из пп.1-10 в качестве лекарственного средства.

13. Применение соединения по любому из пп.1-10 для лечения грибковых инфекций и/или бактериальных инфекций.

14. Применение соединения по любому из пп.1-10 для лечения вируса герпеса и/или вируса папилломы человека.

15. Применение по п.14, где указанный вирус герпеса представляет собой вирус простого герпеса или цитомегаловирус.

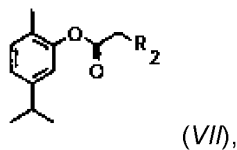
16. Применение по п.15, где указанный вирус простого герпеса представляет собой вирус простого герпеса типа 1 или вирус простого герпеса типа 2.

17. Применение соединения по любому из пп.1-10 для получения лекарственного средства для лечения вируса герпеса, вируса папилломы человека, грибковых инфекций и/или бактериальных инфекций.

18. Способ лечения вируса герпеса, вируса папилломы человека, грибковых инфекций и/или бактериальных инфекций, включающий стадию введения субъекту соединения по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по п.11.

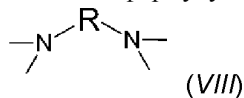
19. Способ получения соединения по любому из пп.1-5, включающий:

i) проведение реакции карвакрола с R_2CH_2COCl с получением соединения, имеющего формулу:

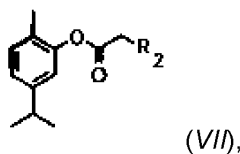


где R_2 представляет собой галоген;

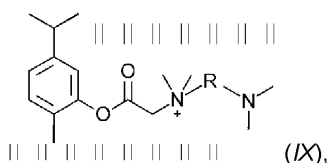
ii) проведение реакции соединения, имеющего формулу



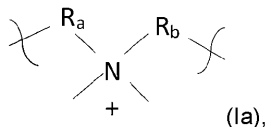
с соединением, имеющим формулу



с получением соединения, имеющего формулу

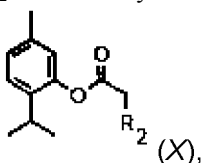


где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода; или R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



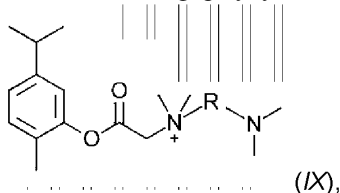
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода;

iii) проведение реакции тимол с R_2CH_2COCl с получением соединения, имеющего формулу

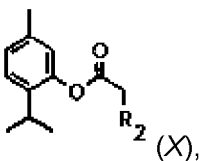


где R_2 представляет собой галоген;

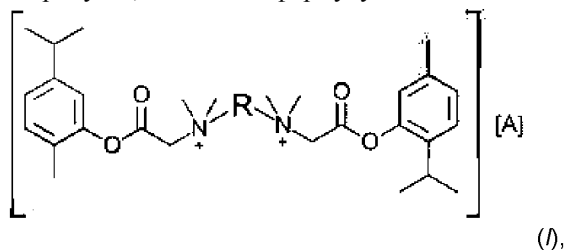
iv) проведение реакции соединения, имеющего формулу



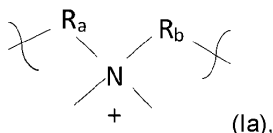
с соединением, имеющим формулу



с получением конечного продукта, имеющего формулу



где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



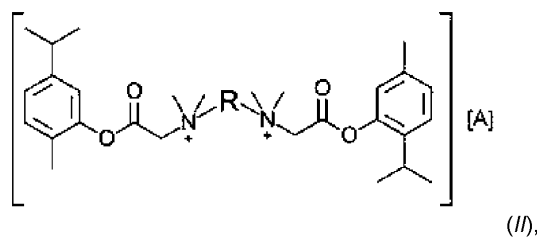
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и A представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3.

20. Способ по п.19, в котором R представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода.

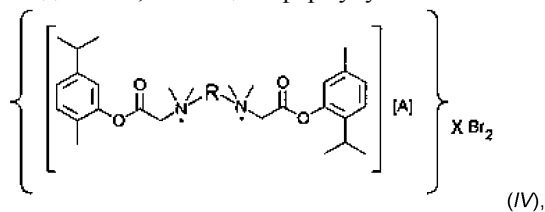
21. Способ по п.19, в котором каждый из R_a и R_b представляет собой насыщенную линейную алкановую цепь, содержащую от 8 до 16 атомов углерода.

22. Способ по любому из пп.19-21, где каждая из стадий i-iv дополнительно включает одну или более стадий разделения и/или экстракции.

23. Способ получения соединения по любому из пп.6-10, включающий проведение реакции соединения, имеющего формулу

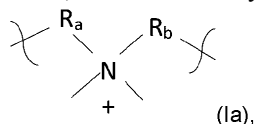


с бромом с получением соединения, имеющего формулу

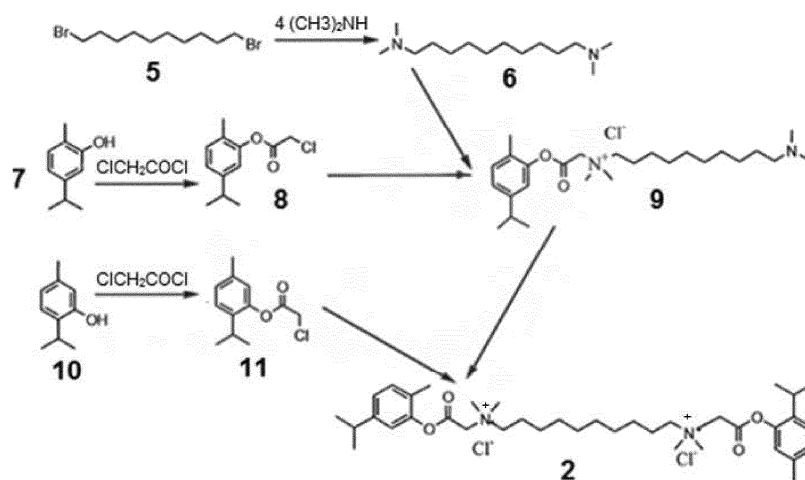


где R представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -2; или

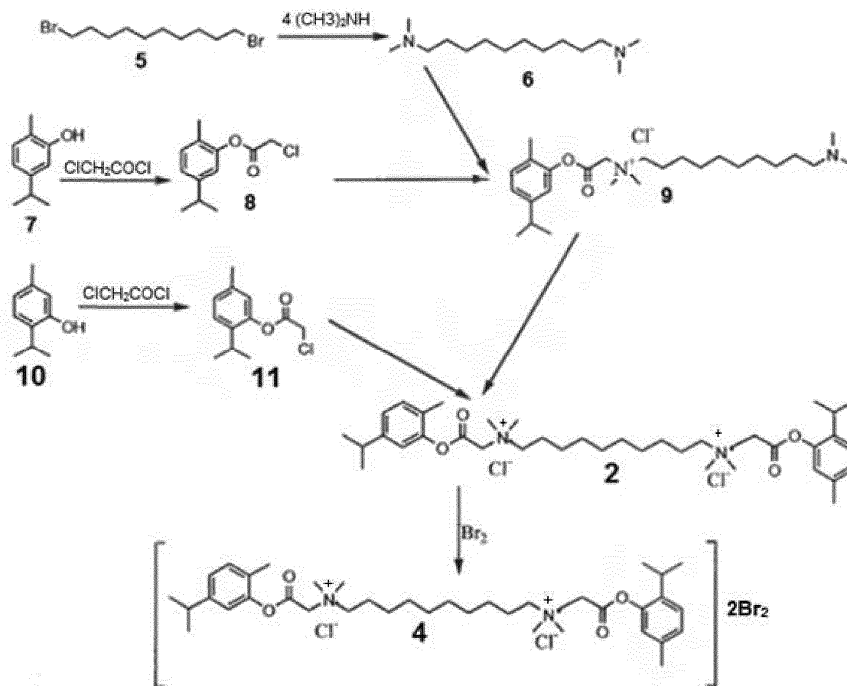
R представляет собой четвертичный амин, имеющий следующую формулу:



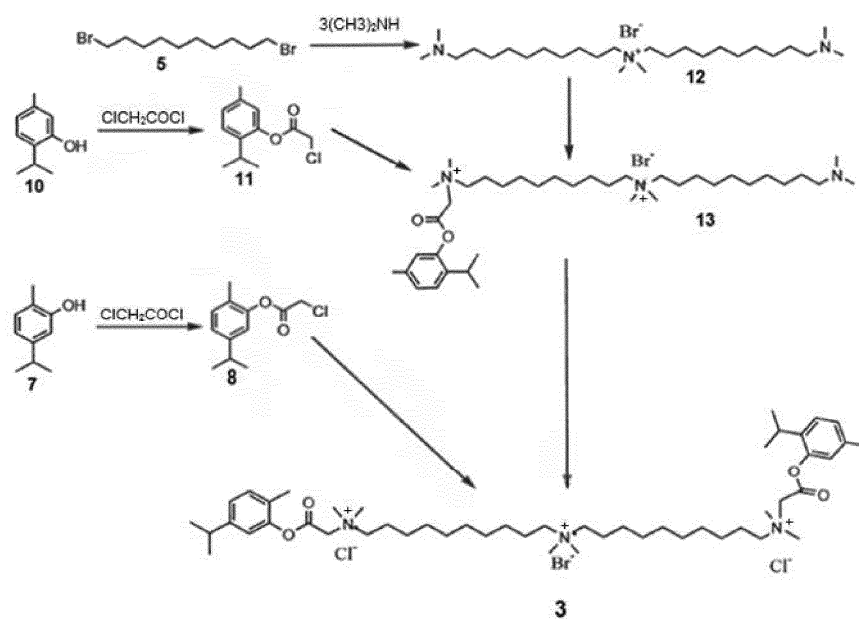
где каждый из R_a и R_b представляет собой алкановую цепь, содержащую от 8 до 20 атомов углерода, и А представляет собой один или более анионов, имеющих суммарный заряд -3; и где X принимает значения 2, 4, 6, 8 или 10.



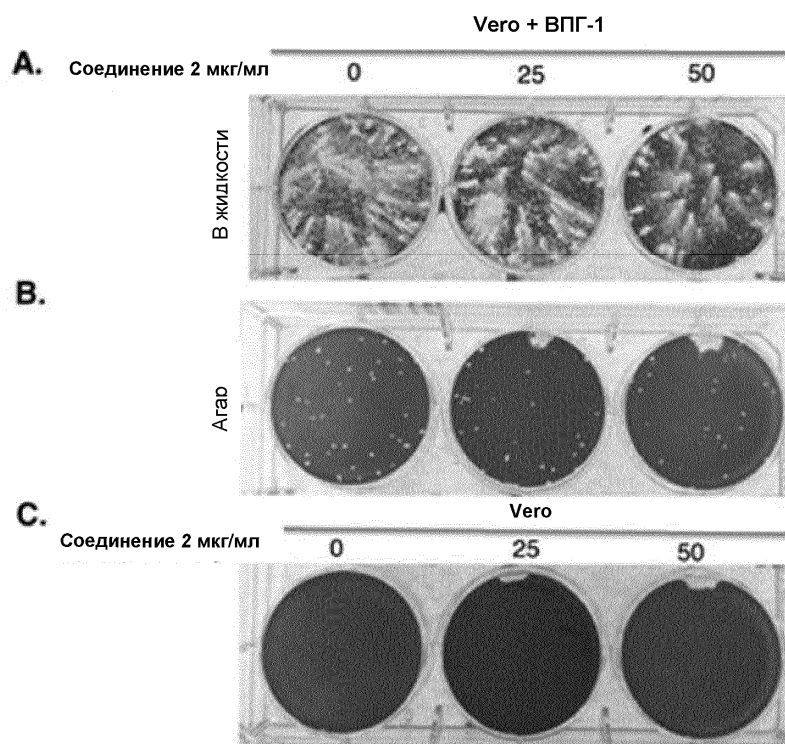
Фиг. 1



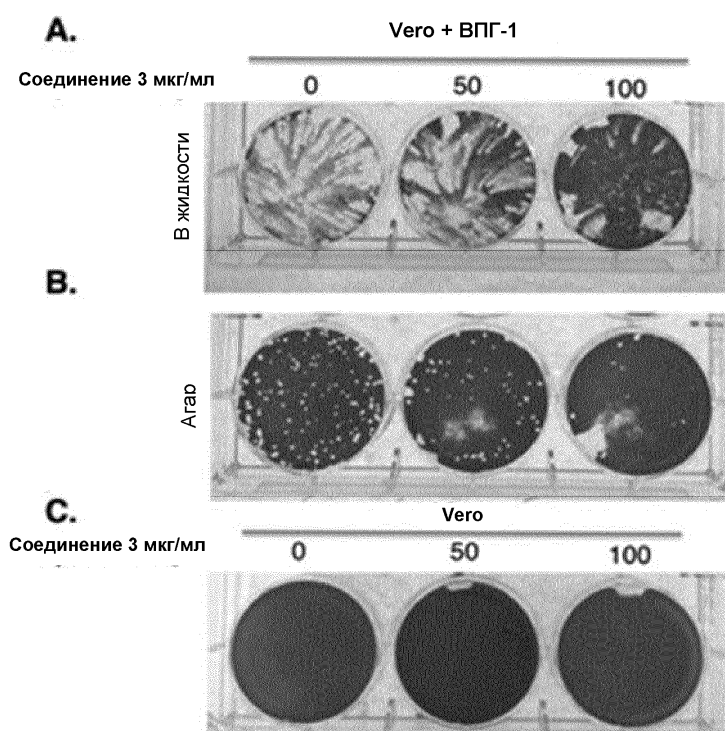
Фиг. 2



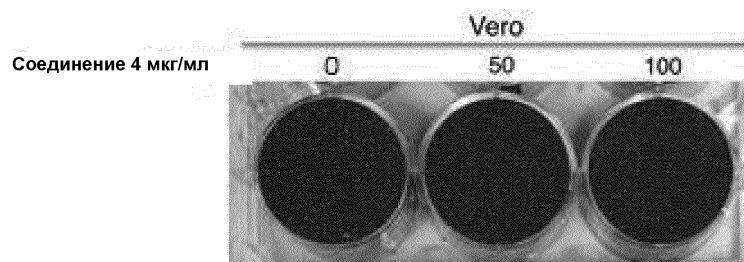
Фиг. 3



Фиг. 4

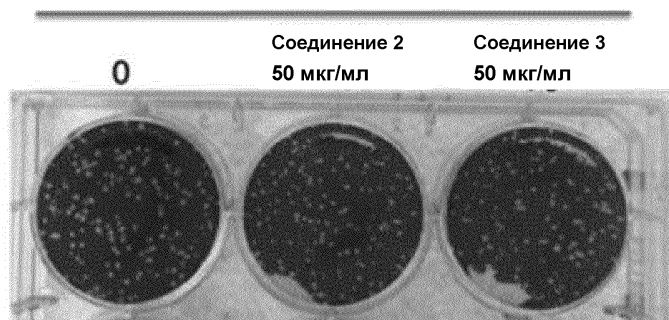


Фиг. 5



Фиг. 6

BSC 40+ BOB



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2