



(51) МПК  
*C07D 487/04* (2006.01)  
*A61K 31/4162* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C07D 487/04 (2019.05); A61K 31/4162 (2019.05); A61P 31/00 (2019.05)*

(21)(22) Заявка: 2019105603, 27.02.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 27.02.2019

Дата регистрации:  
 26.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.02.2019

(45) Опубликовано: 26.08.2019 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, ПГНИУ  
 (УИД), Тюриной О.А.

(72) Автор(ы):

Гейн Владимир Леонидович (RU),  
 Бобровская Ольга Васильевна (RU),  
 Селиверстов Григорий Владимирович (RU),  
 Новикова Валентина Васильевна (RU),  
 Махмудов Рамиз Рагибович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет" (ПГНИУ) (RU),  
 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Пермская государственная фармацевтическая академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА) (RU)

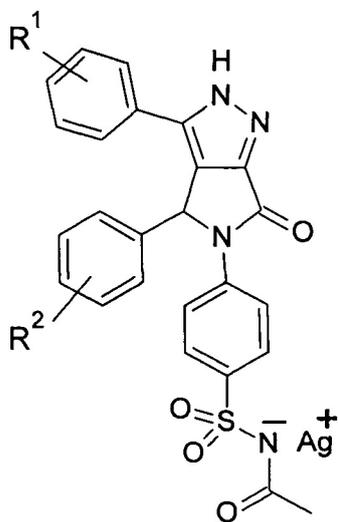
(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2015023898 A1, 19.02.2015. Bobrovskaya O.V., Gein V.L., Seliverstov G.V., Chashchina S.V., Dmitriev M.V. (2017). Synthesis and Biological Activity of 3,4-Diaryl-5-[4-(acetylsulfamoyl)phenyl]-4,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-6(2H)-ones and Their Sodium Salts. Russian Journal of General Chemistry, 87(12), 2776-2782. doi:10.1134/s1070363217120040.

(54) Серебряные соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов, проявляющие противомикробную активность

(57) Реферат:

Изобретение относится к новым биологически активным соединениям - серебряным солям 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов формулы (I, II)

$R^1=H$ ,  $R^2=4\text{-Cl}$  (I),  $R^1=4\text{-Br}$ ,  $R^2=H$  (II),  
обладающим противомикробной активностью и  
низкой токсичностью. 2 табл., 2 пр.



I, II

R U 2 6 9 8 3 2 8 C 1

R U 2 6 9 8 3 2 8 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 698 328** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.  
*C07D 487/04* (2006.01)  
*A61K 31/4162* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07D 487/04 (2019.05); A61K 31/4162 (2019.05); A61P 31/00 (2019.05)*(21)(22) Application: **2019105603, 27.02.2019**(24) Effective date for property rights:  
**27.02.2019**Registration date:  
**26.08.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **27.02.2019**(45) Date of publication: **26.08.2019 Bull. № 24**

Mail address:

**614990, g. Perm, ul. Bukireva, 15, PGNIU (UID),  
Tyurinoj O.A.**

(72) Inventor(s):

**Gejn Vladimir Leonidovich (RU),  
Bobrovskaya Olga Vasilevna (RU),  
Seliverstov Grigorij Vladimirovich (RU),  
Novikova Valentina Vasilevna (RU),  
Makhmudov Ramiz Ragibovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Permskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet"  
(PGNIU) (RU),  
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Permskaya gosudarstvennaya  
farmatsevticheskaya akademiya" Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (PGFA)  
(RU)**(54) **SILVER SALTS OF 5,6-DIARYL-4-[4-(ACETYLAMINOSULPHONYL)PHENYL]-3,5-DIHYDROPIRROLO[3,4-C]PYRAZOL-3-ONES EXHIBITING ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

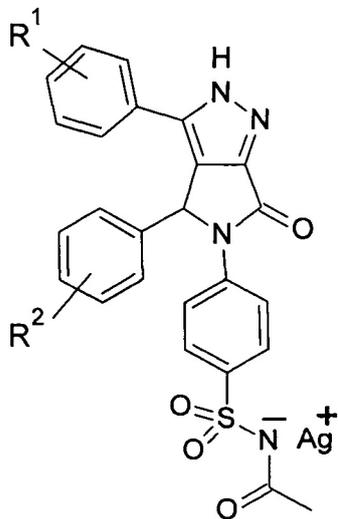
(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to novel biologically active compounds – silver salts of 5,6-diaryl-4-[4-(acetylamino-sulphonyl)phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-ones of formula (I, II)

RU 2 698 328 C1

RU 2 698 328 C1



$R^1=H, R^2=4\text{-Cl}$  (I),  $R^1=4\text{-Br}, R^2=H$  (II).

EFFECT: compound has antimicrobial activity and low toxicity.

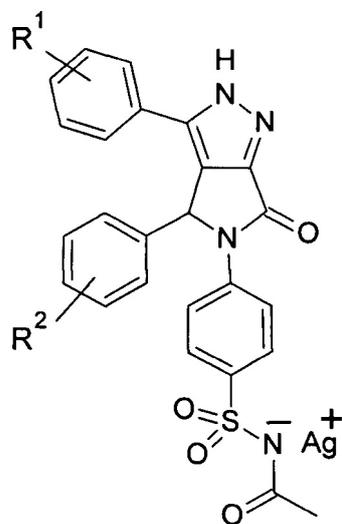
1 cl, 2 tbl, 2 ex

I, II

R U 2 6 9 8 3 2 8 C 1

R U 2 6 9 8 3 2 8 C 1

Изобретение относится к области органической химии, к новым биологически активным веществам класса 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, а именно к серебряным солям 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов формулы (I, II):

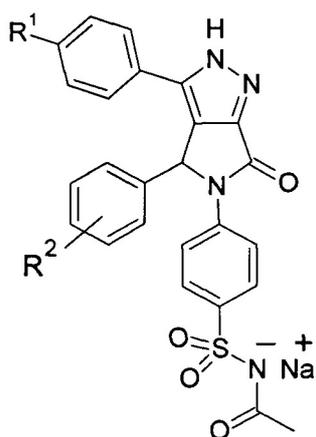


**I, II**

$R^1=H$ ,  $R^2=4-Cl$  (I),  $R^1=4-Br$ ,  $R^2=H$  (II),

обладающим противомикробной активностью, что позволяет предположить возможность их использования в медицине в качестве лекарственных противомикробных средств.

Ближайшими аналогами по структуре и действию заявляемым соединениям являются натриевые соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов (Ia, IIa) [Синтез и биологическая активность 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов и их натриевых солей / О.В. Бобровская, В.Л. Гейн, Г.В. Селиверстов [и др.] // Журн. общей химии. - 2017. - Т. 87, вып. 12. - С. 1957-1964] формулы:



**Ia, IIa**

$R^1=H$ ,  $R^2=4-Cl$  (Ia),  $R^1=4-Br$ ,  $R^2=H$  (IIa).

Структурные аналоги (Ia, IIa) обладают низкой противомикробной активностью (таблица 1).

В медицинской практике широко используются диоксидин и флуконазол в качестве



3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов и их натриевых солей / О.В. Бобровская, В.Л. Гейн, Г.В. Селиверстов [и др.] // Журн. общей химии. - 2017. - Т. 87, вып. 12. - С. 1957-1964].

Пример 1. Получение заявляемого соединения (I). К горячему раствору 2,03 г (0,004 моль) 4-(4-ацетиламиносульфонилфенил)-6-фенил-5-(4-хлорфенил)-3,5-дигидропирроло [3,4-с]пиразол-3-она (IV) в 35 мл смеси этанол-ДМФА в соотношении 2:1 добавляют горячий раствор 0,68 г (0,004 моль) серебра нитрата в 34 мл этанола (2% раствор). Выпавший при охлаждении осадок отфильтровывают, промывают на фильтре от следов серебра нитрата этанолом и водой, высушивают, снова промывают этанолом и высушивают. Выход 1,42 г (58%). Т. пл. 285-287°C. Найдено, %: С 48.81; Н 2.98; N 9.08; S 5.28. C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>AgClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S. Вычислено, %: С 48.92; Н 2.96; N 9.13; S 5.22. ИК спектр (Specord M-80, в таблетках с KBr, ν, см<sup>-1</sup>): 3440 (NH), 1700 (СО<sub>лакт.</sub>), 1620 (СО<sub>амид.</sub>), 1340, 1140 (SO<sub>2</sub>). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (Bruker Avance III HD, рабочая частота 400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, δ, м.д.): 1.90 с (3H, CH<sub>3</sub>CO), 6.85 с (1H, C<sup>5</sup>H), 7.21-7.87 м (13H, CH<sub>Ar</sub>), 13.90 с (1H, N<sup>1</sup>H). Масс-спектр (Waters ACQUITY UPLC I-Class с детектором Xevo TQD, m/z): 615 [M+H]<sup>+</sup>.

Заявляемое соединение (I) представляет собой белое кристаллическое вещество с сероватым оттенком, растворимое при нагревании в диметилформамиде (ДМФА), диметилсульфоксиде (ДМСО), ледяной уксусной кислоте и нерастворимое в воде, этаноле, изопропаноле.

Пример 2. Получение заявляемого соединения (II). К горячему раствору 2,21 г (0,004 моль) 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-фенил-3,5-дигидропирроло [3,4-с]пиразол-3-она (IV) в 35 мл смеси этанол-ДМФА в соотношении 2:1 добавляют горячий раствор 0,68 г (0,004 моль) серебра нитрата в 34 мл этанола (2% раствор). Выпавший при охлаждении осадок отфильтровывают, промывают на фильтре от следов серебра нитрата этанолом и водой, высушивают, снова промывают этанолом и высушивают. Выход 1,66 г (63%). Т. пл. 291-293°C. Найдено, %: С 45.74; Н 2.72; N 8.58; S 4.79. C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>AgBrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S. Вычислено, %: С 45.61; Н 2.76; N 8.51; S 4.87. ИК спектр (Specord M-80, в таблетках с KBr, ν, см<sup>-1</sup>): 3304, 3256 (NH), 1720 (СО<sub>лакт.</sub>), 1612 (СО<sub>амид.</sub>), 1344, 1140 (SO<sub>2</sub>). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (Bruker Avance III HD, рабочая частота 400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, δ, м.д.): 1.88 с (3H, CH<sub>3</sub>CO), 6.76 с (1H, C<sup>5</sup>H), 7.08-7.88 м (13H, CH<sub>Ar</sub>), 14.00 с (1H, N<sup>1</sup>H). Масс-спектр (Waters ACQUITY UPLC I-Class с детектором Xevo TQD, m/z): 658 [M]<sup>+</sup>.

Заявляемое соединение (II) представляет собой белое кристаллическое вещество со слегка желтоватым оттенком, растворимое при нагревании в ДМФА, ДМСО, ледяной уксусной кислоте и нерастворимое в воде, этаноле, изопропаноле.

Исследование противогрибковой, антибактериальной активности и острой токсичности заявляемых соединений (I, II).

Острую токсичность (ЛД<sub>50</sub>, мг/кг) соединений (I, II) изучали на белых мышах (самках) массой 16-18 г при однократном внутрибрюшинном введении [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева, О.Л. Верстаковой, М.В. Журавлевой, В.К. Лепихина, Н.В. Коробова, В.А. Меркулова, С.Н. Орехова, И.В. Сакаевой, Д.Б. Утешева,

А.Н. Яворского. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. 944 с.]. За животными вели наблюдение в течение 10 суток, фиксируя поведение, интенсивность и характер двигательной активности, наличие судорог, координацию движений, тонус скелетной мускулатуры, реакции на тактильные, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, окраску видимых слизистых оболочек, потребление воды и пищи, изменение массы тела.

Рассчитывали острую токсичность, соблюдая рекомендации государственного фармакологического комитета по изучению общетоксического действия биологически активных веществ [Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. Утв. 25. 12. 97 / Вестн. фармакоп. комитета. - 1998. - №1. - С. 27-32].

Установлено, что ЛД<sub>50</sub> составляет для соединения (I) >1300 мг/кг, для соединения (II) >1600 мг/кг. Следовательно, заявляемые соединения (I, II) менее токсичны, чем эталон сравнения диоксидин, ЛД<sub>50</sub> которого 750 мг/кг [<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/dioxydine>] в 1,73 раза (соединение I), и, соответственно, в 2,13 раз (соединение II), а также менее токсичны, чем эталон сравнения флуконазол, ЛД<sub>50</sub> которого 1273 мг/кг [Drugs in Japan V., P. 983, 1990. - Режим доступа: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>].

Согласно классификации токсичности препаратов соединения (I, II) относятся к классу практически нетоксичных веществ [Измеров Н.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии (справочник). - М.: Медицина, 1977. - С. 196-197].

Противогрибковую и антибактериальную активность заявляемых соединений (I, II) определяли пробирочным методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева, О.Л. Верстаковой, М.В. Журавлевой, В.К. Лепехина, Н.В. Коробова, В.А. Меркулова, С.Н. Орехова, И.В. Сакаевой, Д.Б. Утешева, А.Н. Яворского. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. 944 с.]. Скрининг противомикробной активности осуществляли в отношении типовых штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885-653. Исследуемые соединения массой 0,05 г растворяли в 5 мл ДМСО, получая основной раствор вещества в концентрации 10<sup>4</sup> мкг/мл. Данный раствор служил основой для рабочего раствора, имеющего концентрацию 2×10<sup>3</sup> мкг/мл, который последовательно разводили двукратно в жидкой питательной среде в ряду из 10 пробирок. Концентрация исследуемых соединений в первой пробирке ряда разведений в питательной среде составляла 1000,0 мкг/мл. Для определения антибактериальной активности использовали питательный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск), для определения противогрибковой активности - бульон Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на агаре Сабуро. Для определения антибактериальной активности использовали типовые суточные культуры, выращенные на питательном агаре. Концентрация микробных клеток в опыте составила 2-5×10<sup>5</sup> КОЕ/мл (для бактерий), 2-5×10<sup>4</sup> КОЕ/мл (для грибов). В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы

инкубировали в термостате при температуре  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (для грибов),  $37\pm 2^\circ\text{C}$  (для бактерий).  
Оценку роста бактерий проводили визуально через 20-24 ч инкубирования, антимикотическую активность - на 40-48 ч и 70-72 ч инкубирования. В качестве значения МПК (минимальной подавляющей концентрации) принимали концентрацию соединения в последней прозрачной пробирке серии разведения.

Полученные результаты заявляемых соединений (I, II) по антибактериальной активности сравнивали с экспериментальными данными диоксидина (таблица 1, 2), фунгистатический эффект исследуемых соединений (I, II) сравнивали с литературными данными флуконазола [Cordeiro R.A., Teixeira C.E.C., Brilhante R.S.N, et al. / Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol // Medical Mycology, January 2013, Vol. 51, Issue 1, P. 53-59]. Кроме того, противомикробную активность заявляемых соединений (I, II) сравнивали с активностью аналогов по структуре (Ia, IIa) Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Таблица 1

## Противомикробная активность и острая токсичность соединений (I, II)

Соединение	Острая токсичность соединений ЛД <sub>50</sub> , мг/кг, (в/б)	Противомикробная активность МПК, мкг/мл		
		<i>S. aureus</i> ATCC 6538-Р	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
Заявляемое соединение (I)	>1300	2,0	1,0	2,0
Заявляемое соединение (II)	>1600	7,8	15,6	2,0
Структурный аналог (Ia)	–	250	1000	1000
Структурный аналог (IIa)	–	500	1000	1000
Диоксидин (1% раствор)	750*	62,5	31,2	–
Флуконазол	1273**	–	–	2,0 – >64,0***

\*, \*\*, \*\*\* -данные литературы:

\*Режим доступа: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/dioxydine>.

\*\*DrugsinJapan V., P. 983, 1990. - Режим доступа: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>.

\*\*\*Cordeiro R.A., Teixeira C.E.C., Brilhante R.S.N. et al. / Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol // Medical Mycology, January 2013, Vol. 51, Issue 1, P. 53-59.

Как видно из таблицы 1, структурные аналоги (Ia, IIa) обладают низкой противомикробной активностью. Замена ионов натрия на ионы серебра в структуре

5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов с образованием серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов (I, II) приводит к резкому усилению биологического действия в отношении изучаемых культур.

5 Кроме того, заявляемые соединения (I, II) по противогрибковой активности сравнимы с современным антимикотиком флуконазолом и превосходят по антибактериальной активности эталон сравнения диоксидин в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 653 8-Р ~ в 8-31 раз (МПК 62,5/7,8 и 62,5/2,0), *Escherichia coli* ATCC 25922 ~ в 2-31 раз (МПК 31,2/15,6 и 31,2/1,0), а также менее токсичны, чем флуконазол и диоксидин.

10 Заявляемые соединения (I, II) были подвергнуты углубленному исследованию в отношении других типовых штаммов бактерий Государственной коллекции патогенных микроорганизмов *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* №5055 NCTC, *Proteus vulgaris* №НХ 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella abony* №103/39, *Bacillus cereus* ATCC 10702. Результаты испытаний представлены в таблице 2.

Таблица 2

## Антибактериальная активность соединений (I, II)

Соединение	МПК, мкг/мл						
	<i>P. vulgaris</i> №НХ 19/222	<i>K. pneumoniae</i> №5055 NCTC	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. abony</i> №103/39	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>B. cereus</i> ATCC 10702
Заявляемое соединение (I)	3,9	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	7,8
Заявляемое соединение (II)	15,6	31,2	15,6	15,6	7,8	62,5	15,6
Диоксидин (1% раствор)	7,8	15,6	500,0	7,8	500,0	500,0	31,2

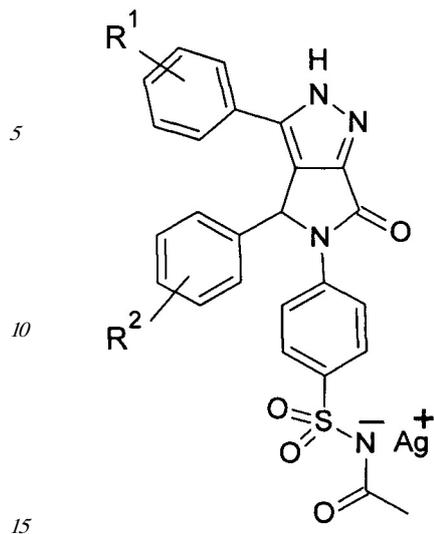
35 Установлено, что заявляемое соединение (I) обладает высокой антибактериальной активностью, превышающей активность эталона сравнения (раствор диоксидина 1%) в отношении *Proteus vulgaris* №НХ 19/222 и *Bacillus cereus* ATCC 10702 в 2 и 4 раза (МПК 7,8/3,9 и 31,2/7,8); заявляемое соединение (II) проявляет высокую антибактериальную активность, превышающую активность эталона сравнения (раствор диоксидина 1%) в отношении *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 в 64 раза (МПК 500/7,8).

40 Таким образом, серебряные соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов (I, II) проявляют более высокую противомикробную активность по сравнению со структурными аналогами (Ia, IIa) и эталонами сравнения (раствор диоксидина 1% и флуконазол), а также являются практически нетоксичными, что делает возможным использование их для создания новых лекарственных средств, обладающих противомикробной активностью.

## (57) Формула изобретения

Серебряные соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло

[3,4-с]пиразол-3-онов общей формулы (I, II)



I, II

20  $R^1=H$ ,  $R^2=4-Cl$  (I),  $R^1=4-Br$ ,  $R^2=H$  (II), обладающие противомикробной активностью и низкой токсичностью.

25

30

35

40

45