



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **37680** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
C07D 213/00
C07C 209/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) КАРБОКСИПОХІДНІ ПЛАНАРНИХ ПОЛІЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК ЯК ІНДУКУЮЧІ ІНТЕРФЕРОН ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ

1

2

(21) u200806645

(22) 15.05.2008

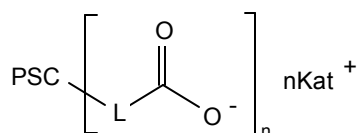
(24) 10.12.2008

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

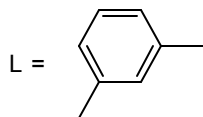
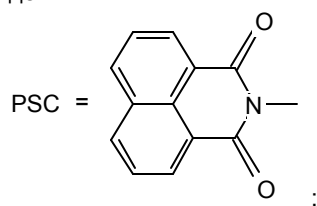
(72) КАРПЕНКО ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ, UA,
ДОРОВСКИХ ІРИНА ВІКТОРІВНА, UA, МАЛЬЦЕВ
ГЕОРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA, ШИБІНСЬКА
МАРИНА ОЛЕГІВНА, UA, ЛЯХОВА ОЛЕНА АНА-
ТОЛІІВНА, UA, ПОГОСОВА ЮЛІЯ ОЛЕКСІІВНА,
UA, ЛЯХОВ СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA, АНД-
РОНАТІ СЕРГІЙ АНДРІЙОВИЧ, UA, ЖОЛОБАК
НАДІЯ МИХАЙЛІВНА, UA, СПІВАК МИКОЛА ЯКО-
ВИЧ, UA

(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БО-
ГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA

(57) Карбоксипохідні планарних поліциклічних
сполук загальної формули:

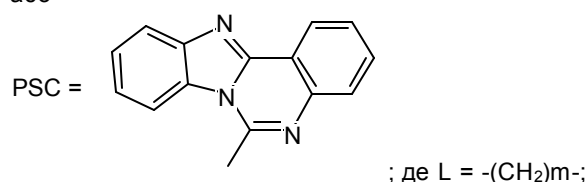


де:

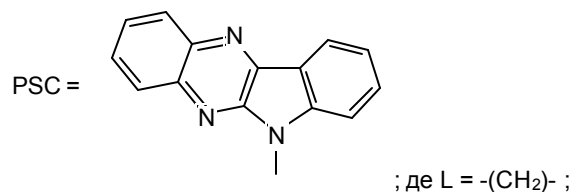


або L = -(CH₂)_m-, m = 1, 2, 3, 5;

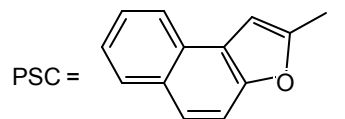
або



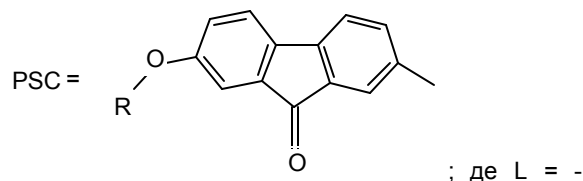
m = 2, 3;
або



або



або



OCH₂-;
де R = C₂H₅, ⁻OOCCH₂;
де Kat⁺ = Na⁺, n = 1, 2;
як противірусні агенти та індуктори інтерферону

Корисна модель відноситься до біоорганічної
хімії і може бути використана при розробці нових
індукторів інтерферону та противірусних агентів.

Сьогодні вже очевидним є те, що індуктори
ендогенного інтерферону є одним з найперспекти-
вніших класів противірусних агентів [див. Співак
М.Я., Карпов О.В., Жолобак Н.М., Назаренко Л.М.,

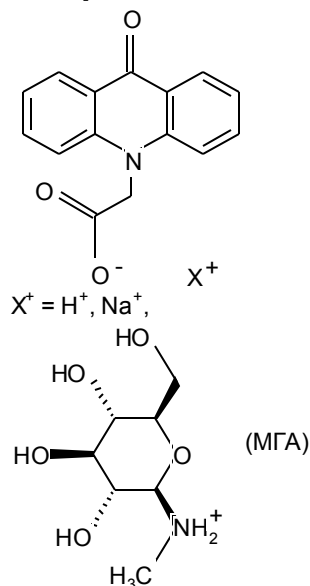
U
(13)

37680
(11)

UA
(19)

Тимошок Н.О., Зошенко В.М., Грабченко Н.І., Ганова Л.О., Михайленко О.М. Індуктори інтерферону - від теорії до практики// Мікробіологічний Журнал. - 2003 - Т.65 - №1-2 - С.191-204.]. Ілюстрацією тому є широке й успішне застосування в клінічній практиці таких препаратів як аміксин, циклоферон, неовір, арбідол, амізон. Але проблему не можна вважати вирішеною з огляду на те, що достатньо значна частина пацієнтів відрізняється гіпореактивністю відносно індукторів, різною є й їх ефективність при різних захворюваннях інфекційного походження. Тому пошук нових низько токсичних та ефективних індукторів все ще залишається актуальним завданням.

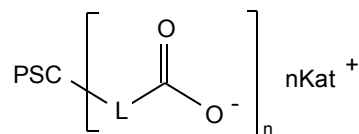
Найближчий аналог за структурою та дією до сполук, що заявляються, є карбоксиметилакридон - СМА, 2-(9,10-дигідроакридин-10-іл)оцтової кислоти (1, де X = H) - неовір (1, де X = Na) і циклоферон (1, де X = МГА) - є представником численної групи поліциклічних планарних карбо- і гетероциклічних сполук, більшість з яких здатна інгібувати вірусну репродукцію й індукувати інтерферон [див. Співак М.Я., Андронаті С.А., Ляхов С.А., Карпов О.В., Жолобак Н.М., Литвинова Л.О., Шай Д.Р. Індуктори інтерферону як противірусні агенти: нові аспекти старої проблеми// Журнал органічної та фармацевтичної хімії. - 2007. - Т.5. - №1. - С.4-20], для якого запропоновано взаємодію зі спеціальними рецепторами клітинної поверхні [див. Piasecki E., Inglot A.D., Czyrski J. A. et al. Interaction of sodium salt of 9-oxo-10-acrideneacetic acid (CMA) and its analogs with serum albumin. A model for study on binding of the interferon inducer with receptor// Arch. Immunol. Ther Exp. - 1985. - Vol.33. - P.299-310.].



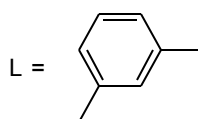
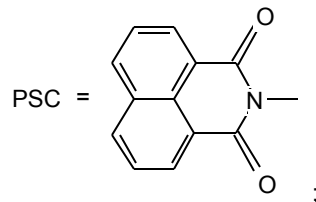
Однак, до сьогодні такі рецептори ще не знайдені і механізм реалізації його інтерферогенної та противірусної активності все ще невідомий.

В основу корисної моделі поставлено задачу знайти противірусні агенти та індуктори інтерферону серед карбоксиподібних планарних поліциклічних сполук.

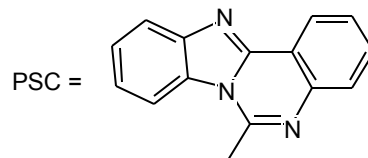
Поставлена задача вирішена синтезом сполук загальної формули:



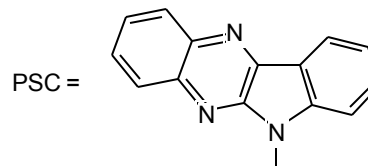
де:



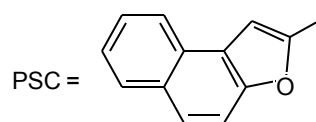
де
або $L = -(CH_2)_m$, $m = 1, 2, 3, 5$;
або



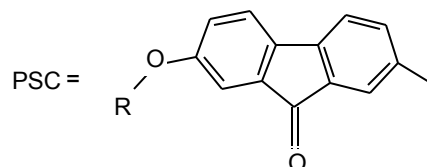
де $L = -(CH_2)_m$; $m = 2, 3$;
або



де $L = -(CH_2)_2$;
або



або

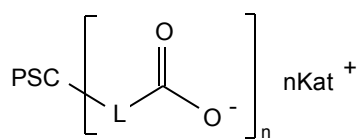


де $L = -OCH_2-$; де $R = C_2H_5, ^-OOCCH_2$;
де $Kat^+ = Na^+$, $n = 1, 2$;

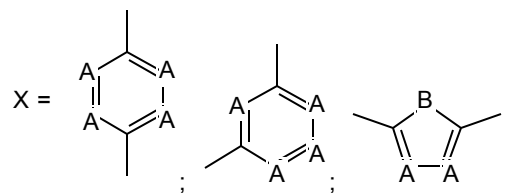
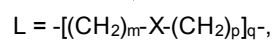
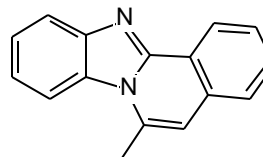
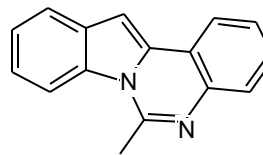
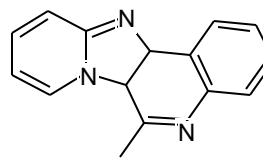
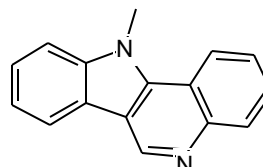
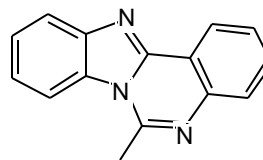
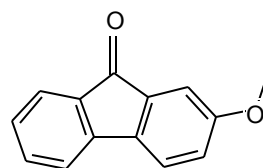
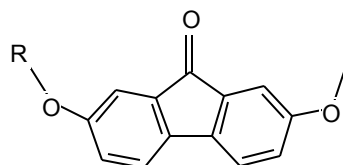
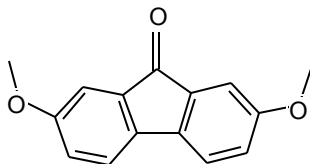
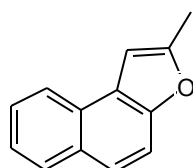
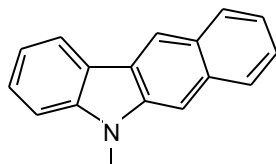
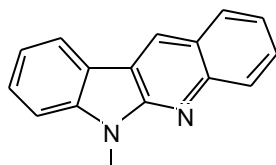
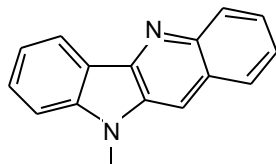
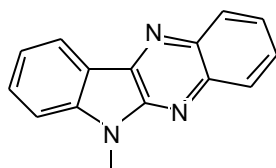
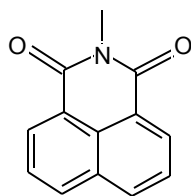
які проявили себе противірусними агентами та індукторами інтерферону.

Причинно-наслідковий зв'язок між структурою об'єктів, що заявляються, і їх біологічною дією полягає, очевидно, у здатності планарних поліциклічних сполук до взаємодії із системою регуляції експресії генів, у тому числі інтерферона.

Були синтезовані сполуки загальної структури



де PCS - планарна поліциклічна система, на-
приклад:

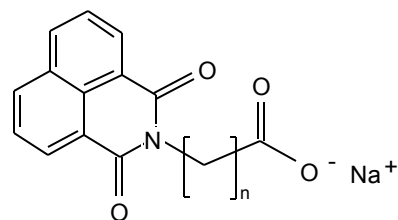


A = N, C; B = S, O, N;

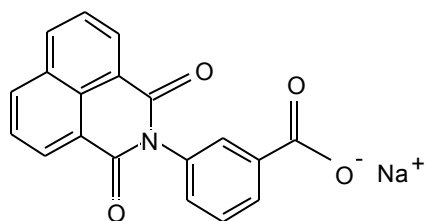
Kat⁺ = Na⁺, K⁺, (NR₁R₂R₃R₄)⁺,

де R₁, R₂, R₃, R₄ = H, алкіл, циклоалкіл, арил,
гетерил;

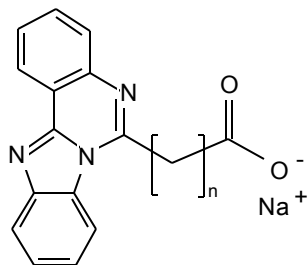
наприклад,



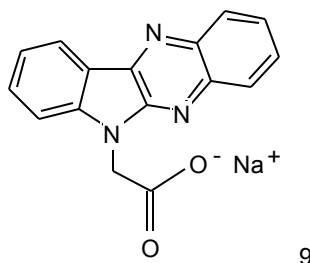
n = 1(2); 2(3); 3(4); 5(5)



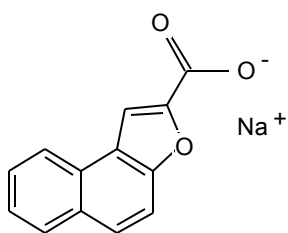
X = 1,3-C₆H₄ (6)



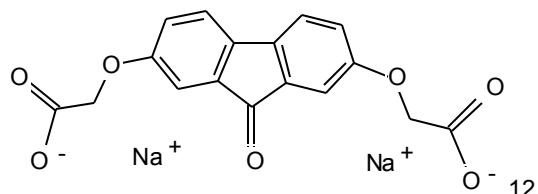
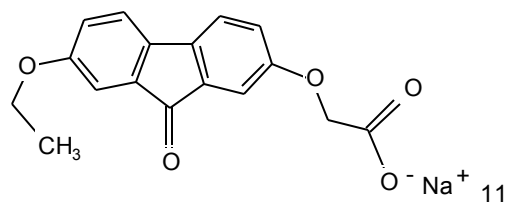
n = 2(7); n = 3(8)



9

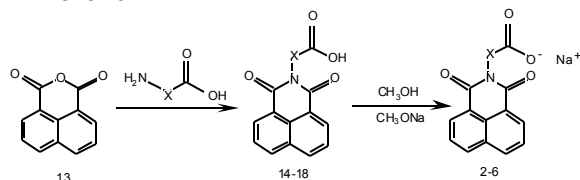


10



Синтез нафталімідокарбонових кислот здійснювали за схемою 1 конденсацією нафталенового ангідриду з ω-амінокарбоновими кислотами та м-амінобензойною кислотою в киплячому ДМФА з наступною обробкою кислот, що утворювались, розрахунковою кількістю титрованого розчину метилату натрію в метанолі з виходами 80-95%.

Схема 1

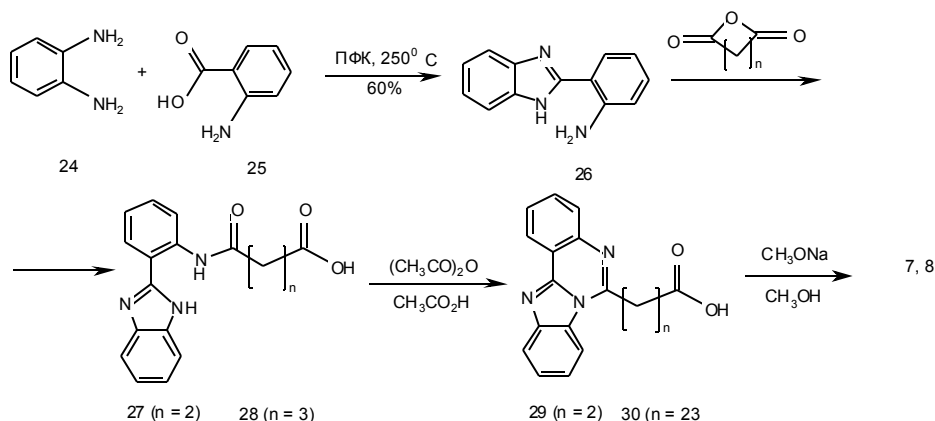


	X = (CH ₂) _m				X = 1,3-C ₆ H ₄
	m = 1	m = 2	m = 3	m = 5	
Амінокислоти:	14	15	16	17	18
Напівпродукти	19	20	21	22	23
Солі	2	3	4	5	6

Похідні бензоімідазохіназоліну (7, 8) отримували за схемою 2 конденсацією о-фенілендіаміну з антраніловою кислотою у поліфосфорній кислоті при 250°C за [див. Hein D.W., Alheim R.J., LeaGitt J.J. The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl and 2-alkyl-substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles// J. Am. Chem. Soc. - 1957. -Гол.79. - P.427-429.], наступним ацилюван-

ням бурштиновим та глутаровим ангідридами в хлороформі, циклізацію нагріванням в оцтовій кислоті в присутності оцтового ангідриду у ω-(бензо[4,5]імідазо[1,2-с]хіназолін-6-іл)-карбонові кислоти 7 и 8 та обробкою розрахунковою кількістю титрованого розчину метилату натрію в метанолі.

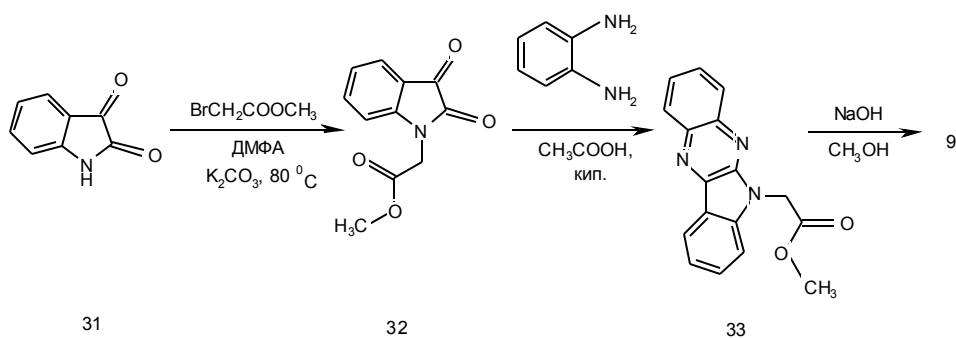
Схема 2



Алкилуванням ізатину (31) дією метилбромоацетату в ДМФА в присутності карбонату калію при 80°C отримували метиловий естер 2-(2,3-Дюксо-2,3-дигідрошдол-1-іл)-оцтової кислоти (32), конденсація якого з фенолендіаміном в оцтовій кислоті

призводила до метилового естеру індоло[2,3-b]-хіноксалін-6-іл-оцтової кислоти (33). Натрієву сіль 9 отримували гідролізом естеру (33) кип'ятінням з гідроксидом натрію в метанолі (схема 3).

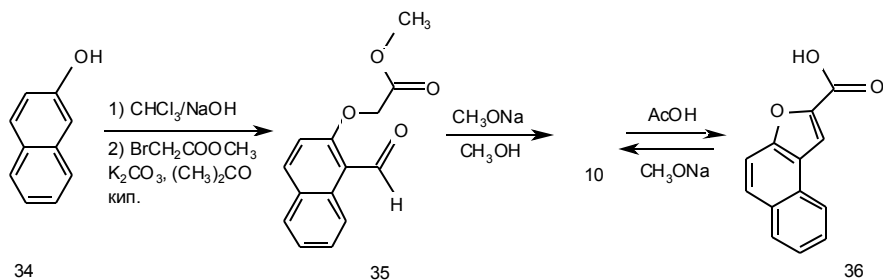
Схема 3



Сполуку 10 синтезували за схемою 4 формулюванням 2-гідроксинафталіну за Реймером-Тіманом [див.Препаративная органическая химия., под ред. Н.С. Вульфсона. –М.: Госхимиздат, 1959. - с.326] з наступним алкилуванням дією метилбромоацетату в ацетоні в присутності карбонату калію та циклі-

зацією естеру 35 метилатом натрію в метанолі, підкисленням розчину та перекристалізацією. Натрієву сіль 10 отримували обробкою нафто[2,1-b]фуранкарбонової кислоти (36) розчином еквімолярної кількості метилату натрію в метанолі.

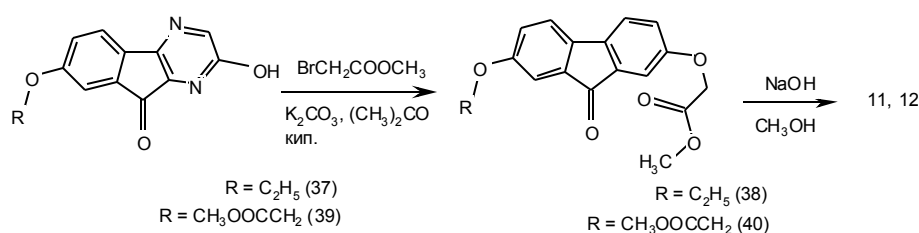
Схема 4



Сполуки 11 та 12 були отримані алкилуванням 2,7-дигідроксифлуоренону-9 та 2-гідрокси-7-етоксифлуоренону-9 дією метилбромоацетату в

ацетоні в присутності карбонату калію з наступним гідролізом дією гідроксиду натрію у метанолі за схемою 5.

Схема 5



Сполуки 2-12, синтезовані нами як аналоги циклоферону за ознакою наявності водночас поліциклічної системи та аніогенної карбоксильної групи, в цілому виявились аналогами циклоферону за дією.

Цитотоксичність синтезованих сполук виявилась дуже низькою. Для усіх сполук діапазон про-

яву цитотоксичних ефектів знаходиться у мілімолярному діапазоні концентрацій. Найменша токсична концентрація (див.таблиця 1) становить близько 1,3мМ для сполуки 9, а найменш токсичні сполуки (2 та 6) практично однакові за токсичністю з циклофероном.

Таблиця 1

Цитотоксичність синтезованих сполук

Сполука	LC ₅₀ , mM	Сполука	LC ₅₀ , mM	Сполука	LC ₅₀ , mM
2	>36	6	>30,5	10	2,4
3	3,1	7	>1,5	11	>2,6
4	16,4	8	>1,4	12	>1,4
5	15	9	>1,3	Циклоферон	34

Інтерфероніндукуючі властивості синтезованих сполук, за винятком сполуки 2, на клітинах L929, аналогічно циклоферону, індукували інтерферон у мікромолярному діапазоні концентрацій

(див. таблиця 2), причому сполука 11 виявилась більш активна за циклоферон, індукуючи синтез тих же титрів, але при меншій концентрації.

Таблиця 2

Інтерфероніндукуючі властивості на клітинах L929

Сполука	ТІФН	С, μM	Сполука	ТІФН	С, μM
2	Н.в.	-	8	1:32	2,3
3	1:12	0,5	9	1:28	1
4	1:10	1	10	1:8	25,6
5	1:24	0,9	11	1:32	0,9
6	1:16	0,9	12	1:8	0,5
7	1:32	2,3	Циклоферон	1:32	1,2

Примітка: Н.в. - інтерферон у культуральному середовищі не визначається; титр інтерферону у контролі становив 2-4

Ступінь протівірусної дії синтезованих сполук при одночасному їх введенні із вірусом (див. таблиця 3), в цілому, виявилась дещо нижчою за дію циклоферону, хоча для більшості сполук вона проявлялась при концентраціях менших, ніж для останнього. Сполуки 9 та 12 справляли протівірусну дію однаково за циклоферон при концентраціях

у 30 разів менших, а 11 - у 15 разів. На клітинах L929, які є значно кращими продуцентами за перивірусних тестикул поросяти (ПТП) , протівірусна активність аніонних індукторів виявилась значно вищою та, здебільшого, не поступалася активності циклоферону.

Таблиця 3

Противірусна активність сполук 2-12 (клітини ПТП, 100 LD₅₀ BBC, введення одночасне з вірусом)

Сполука	IC ₅₀ , мМ	E _{max} %	С, мМ	Сполука	IC ₅₀ , мМ	E _{max} %	С, мМ
2	1,13	50	1,13	8	Н.в.	-	-
3	1	50	1,07	9	0,26	80	0,04
4	1	50	1,02	10	13,2	50	13,2
5	0,23	70	0,94	11	-	80	0,09
6	0,23	80	0,92	12	0,5	50	0,04
7	Н.в.	-	-	Циклоферон	-	100	1,30

Таблиця 4

Противірусна активність сполук 2-12 (клітини L929, 100LD₅₀ BBC, введення за 24г перед внесенням вірусу)

Сполука	IC ₅₀ , мМ	E _{max} %	С, мМ	Сполука	IC ₅₀ , мМ	С, мМ
2	1.13	100	18	8	Н.в.	-
3	4.3	50	4,3	9	3	100
4	-	100	2	10	-	25
5	1.0	100	1,9	11	<0,2	100
6	Н.в.	-	-	12	-	100
7	Н.в.	-	-	Циклоферон	-	100

Досліджені нами карбоксилвмісні поліциклічні планарні сполуки, що складають досить структурно широку групу, в цілому проявили себе як індуктори інтерферону та противірусні агенти з цілком зрозумілими, з огляду на різноманітність будови, відхиленнями у ступені прояву активності та концентраційних діапазонах дії. Важко собі уявити будь-який, окрім ДНК, загальний для всієї групи рецептор. Таким чином, СМА (в його різних формах) не є, якоюсь унікальною сполукою - індуктором інтерферону та противірусним засобом, а є лише одним з представників загальної широкої групи сполук, суттєвими структурними дескрипторами якої є наявність планарної поліциклічної системи та карбоксильної групи.

Тонкі особливості зв'язку структура-активність та механізми реалізації інтерфероніндукуючої та противірусної дії цих сполук безумовно підлягають подальшому дослідженню так само, як і механізм їхньої взаємодії з ДНК.

Отримання сполук, що заявляються, підтверджено наступними прикладами:

Приклад 1. 2-Оксі-7-етоксіфлуоренон-9 (37). Суміш 2.12г (0.01 моль) 2,7-діоксіфлуоринону-9, 0.95см (0.015 моль) йодистого етилу та 2.4г (0.018 моль) тонко розтертого безводного карбонату калію кип'ятили в 50см³ ацетону при перемішуванні до закінчення реакції (приблизно 16год.). Реакційну суміш фільтрували, осад на фільтрі промивали гарячим ацетоном (2х10см), об'єднаний фільтрат випарювали досуха, твердий залишок перекристалізовували з етанолу. Осад, отриманий після фільтрування реакційної суміші, суспендували у воді, ретельно перемішували та титрували до рН < 3, відфільтровували та висушували. Об'єднані тверді залишки вносили у хроматографічну колонку з сілікагелем та елюювали бензолом до відсутності 2,7-діетоксіфлуоринону-9 у елюаті (контроль за ТШХ). Після повного видалення 2,7-

діетоксіфлуоринону-9 змінювали елюент на хлороформ та елюювали до повного виділення 37 (контроль за ТШХ). Випарювання хлороформного елюату досуха у вакуумі давало 1г (27%) сполуки 37. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: т. 1.387 м.ч. (3H, 7.2Гц), кв. 4.145 м.ч. (2H, 7.2Гц); ароматичні протони: м. 6.922 - 7.181 м.ч. (4H); м. 7.545 - 7.650 м.ч. (2H); протони, що обмінюються: д.ш.с. 8.088 м.ч. (1H).

Приклад 2. 2-Етоксі-7-метоксікарбометоксіфлуорен-9-он (38). До розчину 2.40г (0.01 моль) 37 в 50см³ ацетону додавали 3.67см³ (0.015 моль) метилбромоацетату та 2.4г (0.018 моль) тонко розтертого безводного карбонату калію. Суміш кип'ятили при перемішуванні до закінчення реакції (приблизно 5год.). Реакційну суміш відфільтровували, осад на фільтрі промивали гарячим ацетоном (2х10см³), об'єднаний фільтрат випарювали досуха, твердий залишок перекристалізовували з метанолу 2 рази. Вихід 2.54г (95%). C₁₈H₁₆O₅. M.W. 312.33. Т пл. - 139 - 141°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 313 (100) [M+H]⁺. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: т. 1.385 м.ч. (3H, 7.2Гц), с. 3.215 м.ч. (3H), с. 3.704 м.ч. (2H), кв. 4.140 м.ч. (2H, 7.2Гц); ароматичні протони: м. 6.922 - 7.181 м.ч. (4H); м. 7.545 - 7.650 м.ч. (2H).

Приклад 3. (2-Етоксі-9-оксофлуорен-7-ілокі)оцтової кислоти натрієва сіль (11) Суспензію 3.12г (0.01 моль) 38 у 30см³ метанолу виливали у розчин 0.60г (0.15 моль) гідроксиду натрію у 10см³ води. Перемішували реакційну суміш при 60°C протягом 5год. Суспензію розбавляли 100см³ води, осадок відфільтровували, промивали на фільтрі водою та висушували осад у вакуумній сушильній шафі при 70°C протягом 8год. Суху речовину екстрагували киплячим хлороформом (3х15см³). Вихід 3.30г (96%). C₁₇H₁₃O₅Na. M.W. 320.37. Т пл. > 350°C.

Приклад 4. 2,7-Ди-(метоксикарбометокси)флуоренон-9 (40). Кип'ятили 15хв. суміш 2.12г (0.01 моль) дигідроксифлуоренону, 6.9г (0.05 моль) безводного карбонату калію, 2см³ (3.3г, 0.022 моль) метилбромоацетату у 15см³ ДМФА, реакційну суміш переносили у 100см³ води. Осад, що випав, відфільтровували, висушували та перекристалізовували з ацетону. Вихід 2.14г (60%).

Приклад 5. 2,7-Ди-(карбоксилатометокси)флуоренону-9 динатрієва сіль (12). До суспензії 3.56г (0.01 моль) естеру 40 у 35см³ води додавали 0.8г (0.02 моль) гідроксиду натрію, при перемішуванні нагрівали до 90°C, через 1год. розчин фільтрували, охолоджували до 15°C, витримували 30хв. при цій температурі та осад, що випав, відфільтровували, промивали на фільтрі метанолом (3х15см³) та висушували. Вихід 3.55г (95%).

Приклад 6. (1,3-Дюксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-оцтова кислота (14). Розчин 13.97г (0.0705 моль) нафталенового ангідриду й 9.16г (0.07 моль) гліцину в 50см³ ДМФА кип'ятили зі зворотним холодильником 2год., замінювали зворотний холодильник насадкою Вюрца, приєднаною до прямого холодильника. Відганяли дистилат до досягнення температури парів 153°C. Реакційну суміш охолоджували. Осад, що випав, відфільтровували, промивали водою й висушували. Маточний розчин нагрівали до 100°C і додавали гарячу воду до помутніння та відфільтровували, осад, що випав після охолодження, відфільтровували, з'єднували із першим осадом, висушували і перекристалізовували із тетрагидрометану. Вихід: 74%. C₁₄H₉NO₄. M.W. 255.23. Т пл. = 274 - 275°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 256 (100) [M+H]⁺. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: с.4.913 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д.д. 7.937 м.ч. (2Н); д.д. 8.548 м.ч. (2Н); д.д. 8.585 м.ч. (2Н).

Аналогічно одержували сполуки 15-18.

Приклад 7. 4-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-пропанова кислота (15). Вихід: 67%. C₁₅H₁₁NO₄. M.W. 269.26. Т пл. = 225 - 227°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 270 (100) [M+H]⁺. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: т. 2.780 м.ч. (2Н), т. 4.413 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д.д. 7.943 м.ч. (2Н); д.д. 8.510 м.ч. (2Н); д.д. 8.569 м.ч. (2Н).

Приклад 8. 4-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-бутанова кислота (16). Вихід: 91%. C₁₆H₁₃NO₄. M.W. 283.37. Т пл. = 180 - 183°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 284 (100) [M+H]⁺. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: м. 2.049 м.ч. (2Н), т. 2.465 м.ч. (2Н), т. 4.225 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д.д. 7.909 м.ч. (2Н); д.д. 8.499 м.ч. (2Н); д.д. 8.554 м.ч. (2Н).

Приклад 9. 6-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-гексанова кислота (17). Вихід: 93%. C₁₈H₁₇NO₄. M.W. 311.34. Т пл. = 144 - 146°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 312 (100) [M+H]⁺.

Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: м. 1.489 м.ч. (2Н), м. 1.697 м.ч. (2Н), т. 2.344 м.ч. (2Н), т. 4.120 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д.д. 7.907 м.ч. (2Н); д.д. 8.462 м.ч. (2Н); д.д. 8.523 м.ч. (2Н).

Приклад 10. 3-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-бензойна кислота (18). Вихід: 79%. C₁₉H₁₁NO₄. M.W. 317.30. Т пл. = 180 - 183°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 318 (100) [M+H]⁺.

Приклад 11. (1,3-Дюксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-оцтової кислоти натрієва сіль (2). До розчину 0.255г (0.001 моль) 14 у 5см³ метанолу по краплях додавали 1см³ розчину метилату натрію в метанолі (См(CH₃ONa) = 1 моль/л). Осад, що випав, відфільтровували, промивали метанолом та висушували на фільтрі. Вихід: 85%. C₁₄H₈NO₄Na. M.W. 277.24. Т пл. > 340°C.

Аналогічно одержують сполуки 3-6, 10.

Приклад 12. 4-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-пропанової кислоти натрієва сіль (3). Вихід: 88%. C₁₅H₁₀NO₄Na. M.W. 291.24. Т пл. > 300°C.

Приклад 13. 4-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-бутанової кислоти натрієва сіль (4). Вихід: 92%. C₁₆H₁₂NO₄Na. M.W. 305.35. Т пл. > 250°C.

Приклад 14. 6-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-гексанової кислоти натрієва сіль (5). Вихід: 95%. C₁₈H₁₆NO₄Na. M.W. 333.32. Т пл. > 250°C.

Приклад 15. 3-(1,3-діоксо-1Н,3Н-бензо[de]ізохінолін-2-іл)-бензойної кислоти натрієва сіль (6). Вихід: 96%. C₁₉H₁₀NO₄Na. M.W. 339.28. Т пл. > 340°C.

Приклад 16. Нафто[2,1-b]фуран-2-карбонової кислоти натрієва сіль (10). Вихід: 94%. C₁₃H₉O₃Na. M.W. 334.26. Т пл. > 250°C.

Приклад 17. 2-(2-Амінофеніл)бензімідазол (26) В 400см³ поліфосфорної кислоти, вносили суху суміш, що складалася з тонко розтертої 28.1г (0.2 моль) 25 і 21.6г (0.2 моль) 24 і нагрівали при інтенсивному перемішуванні до 250 - 260°C протягом 2.5год. Реакційну суміш охолоджували до 100°C, при інтенсивному перемішуванні виливали в 4000см³ дистильованої води, доводили рН розчину до 9 додаванням 50%-ого розчину NaOH. Осад, який випав, відфільтровували, промивали на фільтрі водою до нейтрального рН промивної води та перекристалізовували з етанолу. Вихід 13.2г (31%). C₁₃H₁₁N₃. M.W. 209.25. Т.пл. = 214.5 - 215.0°C. (Літ. Т. пл. = 213 - 214°C [Hem D.W., Alheim R.J., Leavitt J.J. The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl and 2-alkyl-substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles// J. Am. Chem. Soc. - 1957. - Vol. 79. - P. 427 - 429]). R_f = 0.36 (хлороформ : ацетон (10 : 1)), R_f = 0.55 (бензол : триетиламін (10:1), в UV-254 пляма флуоресує. Мас-спектр (електронний удар), m/z (%): 209 (100) [M]⁺, 182 (12), 118 (7), 104 (17).

Приклад 18. 3-[2-(1Н-бензімідазол-2-іл)фенілкарбамоїл]пропіонова кислота (27). До гарячої суспензії 2г (0.01 моль) 26 в 150см³ хлороформу додавали гарячий розчин 3г бурштинового ангідриду в 20см³ хлороформі, кип'ятили 2хв., після чого нагрівання припиняли. Випадав осад продукту. Реакційну суміш знову доводили до кипіння та кип'ятили ще 5хв. після чого нагрівання знову припиняли. Операцію повторювали 6 разів, після чого відфільтровували реакційну суміш гаря-

чою. Осад з фільтру переносили у стакан, додавали 20 см³ хлороформу, доводили до кипіння та відфільтровували. Операцію повторювали 3 рази. Продукт використовували на наступній стадії без додаткового очищення. Вихід 2.8 г (91%) M.W. 309.33 C₁₇H₁₅N₃O₃. Т.пл. > 220°C (разл.). R_f = 0.02 (елюент - бензол : триетиламин : метанол, 10:1:1).

Приклад 19. 3-Бензімідазо[1,2-с]хіназолін-6-ілпропанова кислота (29). Розчиняли 6.2 г (0.02 моль) 27 у суміші 30 см крижаної оцтової кислоти та 60 см оцтового ангідриду, відфільтровували через паперовий фільтр та охолоджували. Осад, що випав, відфільтровували, промивали на фільтрі оцтовою кислотою, дистильованою водою до нейтрального pH промивної води та висушували. Вихід 4.8 г (82%). M.W. 291.31 C₁₇H₁₃N₃O₂.

Приклад 22. 3-Бензімідазо[1,2-с]хіназолін-6-ілпропанової кислоти натрієва сіль (7). Суспендували 1.46 г (0.005 моль) 29 в 5 см³ абсолютного метанолу й додавали за один раз розчин 0.32 г (0.006 моль) метилату натрію в 0.5 см метанолу. Суспензія гомогенізувалася. До отриманого розчину додавали 15 см³ діетилового етеру, осад, що випав, відфільтровували, промивали на фільтрі діетиловим етером (3x5 см³). Вихід 1.3 г (83%). M.W. 313.29 C₁₇H₁₂N₃NaO₂.

Приклад 23. 4-[2-(1Н-бензімідазол-2-іл)фенілкарбамоіл]бутанова кислота (28). Вихід 3.4 г (53%). M.W. 323.35. C₁₈H₁₇N₃O₃. Т. пл. = 315 - 316°C (с розкл.). Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: м. 1.95 - 2.04 м.ч. (2Н), т. 2.35 м.ч. (2Н), т. 2.54 м.ч. (2Н); ароматичні протони: м. 7.22 - 7.31 м.ч. (3Н); м. 7.45 - 7.50 м.ч. (1Н); д. 7.58 м.ч. (1Н); д. 7.76 (1Н); д. 8.10 м.ч. (1Н); д. 8.69 м.ч. (1Н); протони, що обмінюються: д.ш.с. 12.15 м.ч. (1Н); с 13.01 м.ч. (1Н); ш. с 13.15 м.ч. (1Н).

Приклад 24. 4-Бензімідазо[1,2-с]хіназолін-6-ілбутанова кислота (30). Вихід 4.7 г (77%). M.W. 305.34 C₁₈H₁₅N₃O₂. Т. пл. > 315°C (возг. з розкл.). Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: м. 2.18 - 2.28 м.ч. (2Н), т. 2.56 м.ч. (2Н), т. 3.52 м.ч. (2Н); ароматичні протони: м. 7.48 - 7.53 м.ч. (1Н); м. 7.56 - 7.61 м.ч. (1Н); м. 7.67 - 7.73 м.ч. (1Н); м. 7.80 - 7.92 м.ч. (2Н); д. 7.95 м.ч. (1Н); д. 8.25 м.ч. (1Н); д. 8.54 м.ч. (1Н).

Приклад 25. 4-Бензімідазо[1,2-с]хіназолін-6-ілбутанової кислоти натрієва сіль (8). Вихід 1.1 г (83%). M.W. 328.33 C₁₈H₁₅N₃NaO₂. Т. пл. > 350°C (розкл.).

Приклад 26. 2-(2,3-Діоксо-2,3-дигідроіндол-1-іл)-оцтової кислоти метиловий естер (32). До розчину 10 г (0.068 моль) 31 в диметилформаміді додавали 13.8 г (0.1 моль) карбонату калію і 7.6 см (12.2 г, 0.08 моль) метилбромоацетату. Суміш нагрівали до 70°C, включали перемішування й підтримували таку температуру 10 год., охолоджували, осад відфільтровували, промивали на фільтрі ДМФА (3x15 см³). Фільтрат випаровували, сухий залишок розчиняли у воді (500 см³), екстрагували хлороформом (4x150 см³). Хлороформ висушували сульфатом натрію та випарювали. Сухий залишок перекристалізовували з бензолу. Вихід: 11.7 г (78%). C₁₁H₉NO₄; M.W. 219.20. Т.пл. = 119 - 120°C. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: с 3.755 м.ч. (3Н), с 4.480 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д.

6.790 м.ч. (1Н); т. 7.130 м.ч. (1Н); м. 7.523 - 7.643 м.ч. (2Н).

Приклад 27. Індоло[2,3-б]-хіноксалін-6-ш оцтової кислоти метиловий естер (33) Суміш 24.5 г (0.112 моль) 32 і 14.5 г (0.134 моль) о-фенілендіаміну розчиняли в оцтовій кислоті і кип'ятили при перемішуванні протягом 6 год. Реакційну суміш охолоджували. Осад, що при цьому випав, відфільтровували, промивали на фільтрі оцтовою кислотою (3x15 см³), висушували та перекристалізовували з діоксану. Вихід: 20 г (61%). C₁₇H₁₃N₃O₂; M.W. 291.31. Т.пл. = 210 - 211°C. Мас-спектр, m/z (%): 291 (31), 232 (100), 129 (6), 102 (6). Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: с. 3.747 м.ч. (3Н), с. 5.222 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д. 7.332 м.ч. (1Н), т. 7.392 м.ч. (1Н); м. 7.595 - 7.788 м.ч. (3Н); д.д. 8.110 м.ч. (1Н); д.д. 8.340 м.ч. (1Н); д. 8.519 м.ч. (1Н).

Приклад 28. Індоло[2,3-б]-хіноксалін-6-іл оцтової кислоти натрієва сіль (9). У розчин 5.1 г (0.0175 моль) 33 у 200 см³ метанолу додавали розчин 0.876 г (0.0219 моль) NaOH у 10 см³ води. Реакційну суміш кип'ятили при перемішуванні протягом 2 год., потім охолоджували. Осад, що при цьому випав, відфільтровували, промивали на фільтрі метанолом (3x5 см). Вихід: 5 г (95%). C₁₆H₁₀N₃NaO₂; M.W. 299.27. Т.пл. > 250°C.

Приклад 29. Метиловий естер (1-формілнафталін-2-оксі)оцтової кислоти (35) До конічної колби об'ємом 300 см³ вносили 17.2 г (0.1 моль) 2-гідроксинафталдегіду, 20.7 г (0.15 моль) карбонату калію, 150 см³ ацетону, 14.2 см³ (23 г, 0.15 моль) метилбромоацетату та кип'ятили з зворотнім холодильником при ефективному перемішуванні 8 год. Контролювали хід синтезу за ТШХ (елюент - суміш хлороформу з ацетоном 10:1), обробляючи хроматограму розчином хлористого заліза. Реакційну суміш охолоджували, відфільтровували, осад на фільтрі промивали ацетоном. Фільтрат випаровували досуха. Сухий залишок промивали гарячою водою (4x50 см) та перекристалізовували з метанолу й висушували. Вихід 72%. C₁₄H₁₂O₄. M.W. 244.25. Тпл = 112.5 - 114.0°C. Спектр ¹H ЯМР: аліфатичні протони: с 3.804 м.ч. (6Н); с 4.866 м.ч. (2Н); ароматичні протони: д. 7.119 м.ч. (1Н), м. 7.456 м.ч. (1Н); м. 7.648 м.д. (1Н); д. 7.773 м.ч. (1Н), д. 8.025 м.ч. (1Н), д. 9.281 м.ч. (1Н). с 10.971 м.ч. (1Н).

Приклад 30. Нафто[2,1-б]фуран-2-карбонова кислота (36). В конічній плоскодонній колбі розчиняли 12.2 г (0.05 моль) альдегіду 35 у 150 см³ теплового (45°C) метанолу. При перемішуванні повільно додавали 57 см³ розчину метилату натрію в метанолі (6 г натрію в 250 см³ метанолу) та кип'ятили при перемішуванні 4 год. Після закінчення реакції синтез охолоджували, випаровували 200 см³ метанолу та розбавляли п'ятикратним об'ємом 10%-го розчину оцтової кислоти. Осад відфільтровували та промивали водою. Вихід 76%. C₁₃H₈O₃. M.W. 212.21. Тпл > 335°C. Спектр ¹H ЯМР: м. 7.52 - 7.47 м.д. (1Н); м. 7.62 - 7.68 м.д. (1Н); д. 7.83 м.д. (1Н); д. 7.95 м.д. (1Н); д. 8.06 м.д. (1Н); с 8.08 (1Н); д. 8.39 м.д. (1Н).

Приклад 31. Визначення цитотоксичності препаратів в умовах *in vitro* клітин за дією на моношар клітин та пригніченню їх життєздатності.

Перещеплювану культуру клітин фібробластів свиней - перевивних тестикул поросяти (ПТП) - вирощували у 96-лункових мікроплатах (в атмосфері, що містить 5% CO₂). Через 24 год з лунок, де сформувався суцільний моношар клітин видаляли середовище росту і вносили підтримуюче середовище та розчинені препарати в діапазоні концентрацій від 5 до 500 мкг/см³ (на одне розведення не менше 4 лунок). Контроль - лунки, в які було внесене тільки середовище для підтримання росту. Плати поміщали в термостат. Через 24 та 48 год після інкубації плат при 36°C в умовах 5% CO₂ клітини проглядали за допомогою інвертованого мікроскопу при малому збільшенні з метою виявлення цитопатичної дії (ЦПД) препаратів, яку оцінювали за порушенням цілісності моношару, появою осередків дегенерованих клітин та визначали за чотириплюсовою системою. Визначали: ТЦД₁₀₀ - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см³), що викликає повну деструкцію клітин, ТЦД₅₀ - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см³), що викликає зміну 50% моношару клітин; МВК - максимально витримувану концентрацію - максимальну із досліджених доз речовини (мкг/см³), що не викликає незворотніх змін у морфології та життєздатності клітин у порівнянні з контролем (фактично вона відповідає ТЦД₀).

Розрахунок ТЦД₅₀ проводили за методом Ріда і Менча за формулами:

$$\log_2 \text{ТЦД}_{50} = \log_2 A - (50 - b) \log_2 d / (a - b) \text{ чи}$$

$$\log_2 \text{ТЦД}_{50} = \log_2 B + (a - 50) \log_2 d / (a - b),$$

де $\log_2 A$ і $\log_2 B$ - логарифми концентрацій за основою 2, що викликали ефекти відповідно більше чи менше 50%, але найближчі до 50%; a і b - ефект, викликаний концентраціями A і B , %; $\log_2 d$ - логарифм за основою 2 співвідношення між досліджуваними концентраціями.

Другим параметром, за яким оцінювали токсичність доз препаратів було пригнічення їх життєздатності, [див. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа. Методические указания. Сост. проф. В.И. Ильенко. -Л.: - 1977. - 35с]. Підрахунок клітин та визначення їх життєздатності через 24 та 48 годин інкубації проводили після фарбування клітин водним розчином вітального фарбника трипанового синього. При відсутності токсичного ефекту клітини засвоювали вітальний барвник. Забарвлення контрольних культур приймали за 100%. Розведення препарату, що викликало засвоєння фарбника на 50% вважали токсичним.

Приклад 32. Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей.

Інтерфероніндукуючу активність синтезованих сполук вивчали як описано [див. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. За редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова.// Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр., Київ, 2001. С.392].

Інтерфероніндукуючу активність препаратів в умовах *in vitro* вивчали в культурі клітин ПТП. Препарати в різних дозах (30 - 250 мкг/см³) додавали до сформованого моношару клітин і культивували при 37°C на протязі 24 та 48 год, після чого надосадову рідину збирали і в ній визначали активність інтерферону за раніше опублікованою методикою, [див. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. За редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова.// Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр., Київ, 2001. С.392] (пригнічення цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту).

Визначення активності інтерферону здійснювали через 24 - 48 годин, коли доза внесеного вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) 100 ТЦД₅₀ викликає повну дегенерацію клітин у контролі вірусу (КВ) за відсутності дегенерації у неінфікованій культурі.

За титр інтерферону в одиницях дії (ОД) приймали величину, зворотну розведенню препарату, при якому культура клітин в 50% лунок була повністю захищена від цитопатогенної дії індикаторного вірусу.

Титр індукованого інтерферону (максимальне розведення супернатанту, при якому в 50% лунок цілком запобігалася дегенерація клітинного моношару) визначали в трьох паралельних експериментах.

Приклад 33. Вивчення протівірусної активності.

Дослідження протівірусної дії сполук ґрунтується на вивченні цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). Розчини досліджуваних сполук (0.125 - 250 мкг/мл) у відповідному середовищі додають (0.2 мл в кожен лунку) до моношару клітин вирощеному у 96-лункових мікроплатах (Falcon) при 37°C у атмосфері, вмішуючій 5% CO₂ за 24 години до (попереднє застосування) або одразу після інфікування вірусом (одночасне застосування). Цитопатична дія вірусу вивчається через 24 години після інфікування.

Як видно з наведених даних, сполуки, що за являються, є індукуючі інтерферон протівірусні агенти.