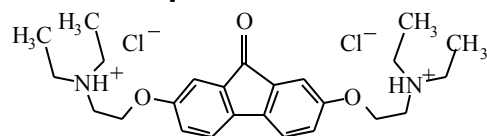


Винахід відноситься до біоорганічної хімії, зокрема до синтезу індукторів інтерферону, і може бути використаний для створення нових противірусних та імунокорегуючих засобів.

Індуктори ендogenous інтерферону являють собою найперспективніший клас противірусних препаратів та імунокоректорів [Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Индукторы интерферона. - М.: Медицина, 1982, 180с.]. Різноманітність вірусів та внутрішньоклітинних паразитів (збудників чисельних захворювань людини та тварин), що характеризуються різною стратегією реплікації та різною біохімією, визначає актуальність поширення списку ефективних засобів для лікування та профілактики захворювань, що спричиняються цими збудниками.

Найближчим аналогом до винаходу, що заявляється, виходячи з біологічної активності є аміксин - противірусний препарат та індуктор інтерферону, здебільшого α - та β -типу [Андронати С.А., Литвинова Л.А., Головенко Н.Я. Пероральный индуктор интерферона "Амиксин" и его аналоги // Журн. АМН Украины. - 1999. - Т.5, №1. - С.53-66.].

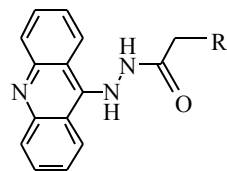


Аміксин

Але, у низці випадків противірусна та інтерфероніндукуюча активність аміксина є недостатньою. Крім того, при парентеральному введенні аміксин індукує вкрай низькі титри інтерферона, що суттєво звужує область застосування препарату.

В основу винаходу поставлено задачу розширення спектра індукторів інтерферону за рахунок створення нових синтетичних низькомолекулярних індукторів.

Поставлена задача вирішена синтезом сполук 1-7, що заявляються, загальної формули:



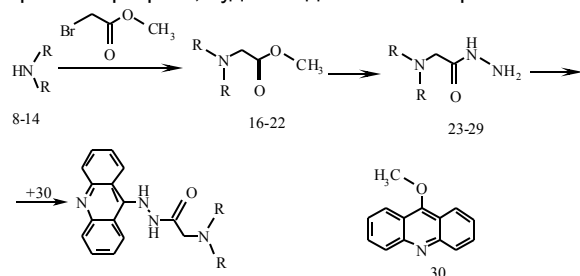
1-7

- де R=C₄H₁₀N-діетиламін (1);
 C₅H₁₀N-піперидин-1-іл (2);
 C₄H₈NO-морфолін-4-іл (3);
 C₆H₁₂N-4-метилпіперидин-1-іл (4);
 C₄H₈N-піролідин-1-іл (5);
 C₆H₁₂N-азепан-1-іл (6);
 C₅H₁₁N₂-4-метилпіперазин-1-іл (7).

До сьогодення не сформульовано структурні вимоги до індукторів інтерферону. Крім того, неочевидним у кожному випадку є спектр інтерферонів, що індукуються.

Прийчинно-наслідкові взаємини між структурою об'єктів, що заявляються, і їхньою біологічною дією полягають, очевидно, у здатності інтеркаляторів, що містять залишок амінокислоти, зв'язуватися з опероном гена інтерферону, що повинне приводити до дерепресії гена, його транскрипції і до наступного синтезу інтерферону.

Сполуки, що заявляються, одержували алкілюванням вторинних амінів (8-14) метиловим естером монобромооцтової кислоти (15) з наступним гідразінолізом метилових естерів відповідних похідних гліцину (16-22). Акридинілювання гідразидів (23-29), що утворювались, яке здійснювали додаванням 9-метоксіакридину (30) до метанольного розчину гідразиду, з послідовними випарюванням реакційної суміші та перекристалізацією залишку з бензолу, приводило до цільових сполук 1-7, чистота яких підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова - даними спектроскопії ¹H-ЯМР.



Інтерфероніндукуючу активність синтезованих сполук вивчали як описано [Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. / За ред. чл.-кор, АМН України О.В. Стефанова. - К: МОЗ, України. ДФЦ, 2001. - 392с.]

Отримання сполук, що заявляються, підтверджено наступними прикладами.

Приклад 1. Отримання діетиламінооцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідразиду (1).

До розчину 104,5см³ (1 моль) діетиламіну у 500см³ бензолу додавали при кімнатній температурі та постійному перемішуванні протягом 3г розчин 44см³ (0,5моль) метилового естеру хлорооцтової кислоти. Суміш кип'ятили 8г, охолоджували до кімнатної температури. Осад, що випав, відфільтровували, промивали на фільтрі бензолом, бензол випарювали у вакуумі.

Дистильов розчиняли у 250см³ метанолу, додавали 30см³ 100%-го гідразингідрату, кип'ятили 2 години, упарювали у вакуумі досуха, додавали 50см³ води та знову випарювали досуха. Залишок (гідразид діетиламінооцтової кислоти) висушували у вакуумі (10мм.рт.ст.) при 50°C протягом 24г.

До киплячого розчину 7,26г (0,005моль) гідрозиду діетиламінооцтової кислоти в 100см³ метанолу додавали за один раз 10,5г (0,05моль) 9-метоксіакридину. Реакційну суміш кип'ятили 30хв., метанол випаровували у вакуумі досуха, залишок розчиняли у 40см³ теплого бензолу. До отриманого розчину поступово додавали 200см³ теплого гептану та поволі охолоджували до кімнатної температури. Продукт кристалізувався при потиранні склянкою паличкою по стінках склянки. Кристалічний осад відфільтровували, промивали (3х10см³) на фільтрі охолодженою до - 18°С сумішшю бензола з гептаном (1:5), гептаном (2х10см³) та висушували у вакуумі. Вихід 12,1г (75%). Знайдено: С(70,58%); Н(6,71%); N(17,45%); C₁₉H₂₂N₄O; M.W.322.41; Т.пл. 187°С.

Аналогічно була отримана сполука 5. Сполуки 2-4 та 6 отримували аналогічно, з тою лише різницею, що вони кристалізувалися з реакційної суміші та були перекристалізовані з метанолу.

Піперидин-1-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (2). Вихід 83%. Знайдено: С(71,71%); Н(6,72%); N(16,70%); C₂₀H₂₂N₄O; M.W.334.42; Т.пл. 241-242°С.

Морфолін-4-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (3). Вихід 85%. Знайдено: С(67,77%); Н(5,88%); N(16,77%); C₁₉H₂₀N₄O₂; M.W.336.40; Т.пл. 253-253,5°С.

4-Метилпіперидин-1-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (4). Вихід 75%. Знайдено: С(72,34%); Н(6,88%); N(16,15%); C₂₁H₂₄N₄O; M.W.348.45; Т.пл. 246-247°С.

Піролідін-1-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (5). Вихід 53%. Знайдено: С(71,10%); Н(6,36%); N(17,36%); C₁₉H₂₀N₄O; M.W.320.40; Т.пл. 131-131,5°С.

Азепан-1-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (6). Вихід 70%. Знайдено: С(72,34%); Н(6,88%); N(15,96%); C₂₁H₂₄N₄O; M.W.348.45; Т.пл. 214-214,5°С.

4-Метил-піперазин-1-іл-оцтової кислоти N'-акридин-9-іл-гідрозид (7). Вихід 64%. Знайдено: С(68,74%); Н(6,67%); N(19,87%); C₂₀H₂₃N₅O; M.W. 349.44; Т.пл. 249-250°С.

Характеристики спектрів ¹Н-ЯМР синтезованих сполук наведені в таблиці 1.

Приклад 2. Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей.

Інтерфероніндукуючу активність препаратів вивчали в культурі лейкоцитів донорів. Використано лейкоцити донорської крові 0(I) групи в концентрації 3х10⁶кл/мол. До лейкоцитарної маси концентрації 3х10⁶кл/мол. додавали препарати в концентрації 10мкг/мол, інкубували 24 години при 37°С. Потім у надосадовій рідині визначали активність інтерферону з використанням культури клітин Л41 (лімфоїдні клітини людини) за раніше опублікованою методикою [Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації./ За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К:МОЗ, України. ДФЦ, 2001. - 392с.] (пригнічення цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту).

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

За титр інтерферону в ОД (одинацях дії) приймали величину, зворотну розведенню препарату, при якому культура клітин в 50% лунок була повністю захищена від цитопатогенної дії індикаторного вірусу. Розрахунок активності інтерферону в МО ведеться за формулою:

X=титр зразка в ОД/мл х (активність СЗ/титр СЗ),

де

X - активність інтерферону, індукованого в досліді препаратом, що вивчається, виражена в МО/мл,

ОД - титр інтерферону в дослідній групі,

МО - міжнародні одиниці.

СЗ - стандартний зразок,

чисельник - активність інтерферону - СЗ в МО, яка відома заздалегідь,

знаменник - титр інтерферону СЗ, отриманий в даному досліді і виражений в одиницях дії, зворотних до розведення препарату.

Титр індукованого інтерферону (максимальне розведення супернатанта, при якому в 50% лунок цілком запобігалася дегенерація клітинного моношара) визначали в трьох рівнобіжних експериментах.

Дані про інтерфероніндукуючу активність сполук 1-7 наведені в таблиці 2.

Таблиця 1

Характеристики спектрів ¹Н-ЯМР синтезованих сполук

| Сполука | Дані спектру ¹ Н-ЯМР |
|---------|--|
| 1 | Аліфатич.: т. 1.032м.ч., 7.2Гц (6H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N); кв. 2.609м.ч., 7.2Гц (4H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N); с. 3.246м.ч., (2H, COCH ₂ N). Ароматич. CH: м. 7.051м.ч., (1H); м. 7.124м.ч., (1H); м. 7.212м.ч., (1H); м. 7.365м.ч., (2H); м. 7.521м.ч., (1H); м. 8.177м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.557м.ч., (1H); д.ш.с. 11.069м.ч., (1H). |
| 2 | Аліфатич.: м. 1.460м.ч., 5.4Гц (2H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N); м. 1.580-1.670м.ч., 5.4Гц (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N); т. 2.582м.ч., 5.4Гц (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N)); с. 3.177м.ч., (2H COCH ₂ N). Ароматич. CH: м. 7.081м.ч., (1H); м. 7.197м.ч., (1H); м. 7.248м.ч., (1H); м. 7.411м.ч., (2H); м. 7.552м.ч., (1H); м. 8.204м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.600м.ч., (1H); д.ш.с. 11.066м.ч., (1H). |
| 3 | Аліфатич.: т. 2.644м.ч., 7.2Гц (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N); т. 3.710м.ч., 7.2Гц (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N); с. 3.231м.ч., (2H COCH ₂ N). Ароматич. CH: м. 7.086-7.137м.ч., (1H); м. 7.163-7.261м.ч., (2H); м. 7.374-7.464м.ч., (2H); м. 7.535-7.605м.ч., (1H); м. 8.180-8.250м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.568м.ч., (1H); д.ш.с. 10.975м.ч., (1H). |
| 4 | Аліфатич.: н/р т. 1.809м.ч., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N); н/р т. 2.700м.ч., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3.350м.ч., (2H COCH ₂ N). Ароматич. CH: м. 7.035-7.128м.ч., (2H); м. 7.208-7.235м.ч., (1H); м. 7.369-7.395м.ч., (2H); м. 7.486-7.536м.ч., (1H); м. 8.112-8.210м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.523м.ч., (1H); д.ш.с. 11.018м.ч., (1H). |
| 5 | Аліфатич.: д. 0.918м.ч., 6.6Гц (3H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N); м. 1.300-1.420м.ч., (1H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N); набір мультиплетів 1.165-1.295м.ч. (2H), 1.613-1.655 (2H), 2.168-2.242 (2H), |

| | |
|---|--|
| | 2.752 - 2.861 (2H) ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$); с. 3.153м.ч., (2H, COCH_2N). Ароматич. СН: м. 7.030-7.081м.ч., (1H); м. 7.101-7.151м.ч., (1H); м. 7.198-7.242м.ч., (1H); м. 7.378-7.402м.ч., (2H); м. 7.501-7.552м.ч., (1H); м. 8.148-8.206м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.408м.ч., (1H); д.ш.с. 11.018м.ч., (1H). |
| 6 | Аліфатич.: набір мультиплетів ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ₂ N 1.537-1.721м.ч., (6H); 2.749-2.784м.ч., (4H): м. 3.315-3.340м.ч., (2H); с. 3.354м.ч., (2H, COCH_2N). Ароматич. СН: м. 7.075-7.126м.ч., (1H); м. 7.154-7.205м.ч., (1H); м. 7.229-7.255м.ч., (1H); м. 7.402-7.451м.ч., (2H); м. 7.532-7.583м.ч., (1H); м. 8.209-8.260м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.507м.ч., (1H); д.ш.с. 11.051м.ч., (1H). |
| 7 | Аліфатич.: с. 2.240м.ч., (3H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$); н/р м. 2.280-2.500м.ч., (4H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$); н/р м. 2.578-2.711м.ч., (4H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$); с. 3.207м.ч., (2H, COCH_2N). Ароматич. СН: м. 7.063-7.114м.ч., (1H); м. 7.175-7.241м.ч., (2H); м. 7.391-7.445м.ч., (2H); м. 7.547-7.598м.ч., (1H); м. 8.167-8.206м.ч., (2H). NH: ш.с. 10.548м.ч., (1H); ш.с. 10.981м.ч., (1H). |

Таблиця 2

Інтерфероніндукуюча активність сполук, що заявляються

| Сполука | Титр інтерферону | Сполука | Титр інтерферону |
|---------|------------------|---------|------------------|
| 1 | 1280 | 5 | 20 |
| 2 | 20 | 6 | 1280 |
| 3 | 1280 | 7 | 80 |
| 4 | 640 | Аміксин | 320 |

Як видно з наведених даних, сполуки, що заявляються, є індукторами інтерферону, причому за своєю активністю 3 з них значно перевищують аміксин.