



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **18602** (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) 6-[2-(ДІЕТИЛАМІНО)ЕТИЛ]-6Н-ІНДОЛО-[2,3-*b*]ХІНОКСАЛІНИ ЯК ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ ТА ІНДУКТОРИ ІНТЕРФЕРОНУ

1

2

(21) u200605305

(22) 15.05.2006

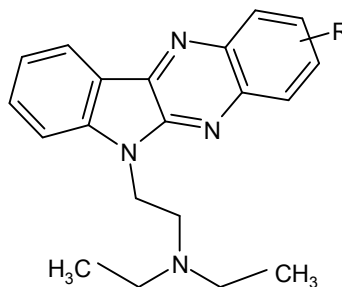
(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Шибінська Марина Олегівна, Ляхов Сергій  
Анатолійович, Жолобак Надія Михайлівна, Оле-  
вінська Зоя Мечиславівна, Співак Микола Якович

(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ.  
О.В.БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
НАУК УКРАЇНИ

(57) 6-[2-(Діетиламіно)етил]-6Н-індоло-[2,3-*b*]  
хіноксалини формули:



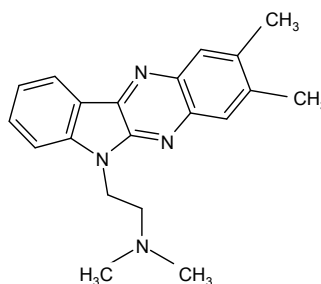
де R=H, 3-CH<sub>3</sub>, 2-NO<sub>2</sub>

як противірусні агенти та індуктори інтерферону.

Корисна модель відноситься до біоорганічної хімії, зокрема до синтезу індукторів інтерферону та противірусних агентів, і може бути використана для створення нових противірусних та імунокорегуючих засобів.

Різноманітність інфекційних хвороб, порушень імунного статусу та онкологічних захворювань роблять пошук ефективних та безпечних імунокоректорів вкрай актуальним. До найбільш ефективних імунокоректорів відносяться індуктори інтерферону (ІФН) [Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Индукторы интерферона. -М: Медицина, 1982, 180с.]. Незважаючи на наявність деяких клінічних індукторів (аміксин, циклоферон) цю проблему ще не можна вважати вирішеною.

Найближчим аналогом корисної моделі, що заявляється, виходячи з біологічної активності та структури є 2,3-диметил-6-[2-(диметиламіно)етил]-6Н-індоло-[2,3-*b*]-хіноксалин, здатний до інгібування реплікації вірусу герпеса у культурі клітин.



2,3-Диметил-6-[2-(диметиламіно)етил]-6Н-індоло-[2,3-*b*]-хіноксалин

До недоліків цієї сполуки слід віднести визначену цитотоксичність, що значно обмежує її використання як противірусного засобу. Відомості про індукцію інтерферону єю відсутні.

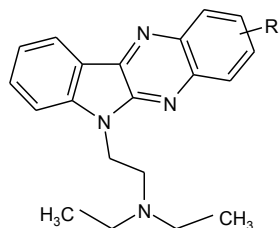
В основу корисної моделі поставлено задачу пошуку нових противірусних агентів серед сполук цього класу та розширення спектру індукторів інтерферону.

Поставлена задача вирішена синтезом сполук, що заявляються, загальної формули:

(13) **U**

(11) **18602**

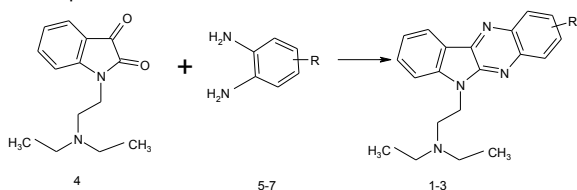
(19) **UA**



де R=H (1), 3-CH<sub>3</sub> (2), 2-NO<sub>2</sub> (3)

Причинно-наслідковий взаємозв'язок між структурою об'єктів, що заявляються, і їхньою біологічною дією полягає, очевидно, у їх здатності до інтерналізації в ДНК, що повинна призводити до дерепресії гена, його транскрипції і до наступного синтезу ІФН. Протівірусна активність може бути зумовлена інгібуванням вірусних нуклеаз.

Сполуки, що заявляються, одержували конденсацією діетиламіноетилізатину (4) з відповідними фенолендіаминами (5-7) при кип'ятінні в безводній оцтовій кислоті.



Чистота цільових сполук 1-3 підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова - даними спектроскопії <sup>1</sup>H-ЯМР та мас-спектрометрії.

Первинне дослідження препаратів проводили по схемі і за умов, що враховували адекватність тест-моделі можливого механізму інтерферогенної активності, що передбачався на підставі аналізу структури хімічної сполуки, яка вивчалась [Вильнер Л.М. Актуальные вопросы скрининга и последующего изучения противовирусных препаратов типа интерферогенов /В сб.: Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. - Минск, 1977. - С.134-136]. Цитотоксичність та 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, та їхні біологічні властивості підтверджено наступними прикладами.

Приклад 1.

6-Діетиламіноетил-6Н-індола [2,3-б]-хіноксалін (1).

Суміш 1,5г (0.006моль) діетиламіноетилізатину (4) і 0,65г (0.006моль) о-фенілендіаміну (5) розчинили в оцтовій кислоті і кип'ятили при перемішуванні протягом 6год. Реакційну суміш охолодили, вилили в 200см<sup>3</sup> води, додали насичений розчин NaHCO<sub>3</sub> до рН=8 і провели екстракцію бензолом 4х70см<sup>3</sup>. Бензол висушили сульфатом натрію і випарили. Сухий залишок перекристалізували з гептану. Вихід: 1,3г (69%); C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>; M.W. 318.43; Т пл.=107-108<sup>0</sup>С. Мас-спектр - m/z (I, %): 318 (1) - M<sup>+</sup>; 100 (13); 86 (100); 58 (5). Спектр ПМР: аліфатичні СН: т. 0,813м.д. (6Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); кв. 2,549м.д. (4Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); т. 2,962м.д. (2Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); т. 4.655м.д. (2Н,

(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); ароматичні СН: м. 7,434-7,488 м.д. (1Н); скл. м. 7,753-7,904м.д. (4Н); д.д. 8,160м.д. (1Н); д.д. 8,312м.д. (1Н); д. 8,452м.д. (1Н).

Приклад 2.

3-Метил-6-діетиламіноетил-6Н-індола [2,3-б] - хіноксалін (2).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1,23г (0,005моль) діетиламіноетилізатину (4) та 0,77г (0,005моль) 1,2-діаміно-4-метилбензолу (6). Вихід: 1,16г (70%). C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>; M.W. 332.45. Т пл. = 250-251<sup>0</sup>С. Мас-спектр - m/z (I, %): 332 (1) - M<sup>+</sup>; 100 (12); 86 (100); 58 (5). Спектр ПМР: аліфатичні СН: погано розрішенні сигнали при 1,241м.д., 2,600м.д., 3,276м.д. и 4,894м.д.; ароматичні СН: набір мультиплетів при 7,409 - 8,372м.д.

Приклад 3.

2-Нітро-6-діетиламіноетил-6Н-індола[2,3-б]-хіноксалін (3). Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1,23г (0,005моль) діетиламіноетилізатину (4) та 0,61г (0,005моль) 1,2-діаміно-4-нітробензолу (7). Вихід: 1,16г (64%). C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>; M.W. 363.42. Т пл. = 135<sup>0</sup>С. Мас-спектр - m/z (I, %): 363 (1) - M<sup>+</sup>; 100 (3); 86 (100); 58 (6). Спектр ПМР: аліфатичні СН: т. 0,852м.д. (6Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); кв. 2,887м.д. (4Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); т. 3,366м.д. (2Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); т. 4,499м.д. (2Н, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); ароматичні СН: д. 7,392м.д. (1Н); м. 8,318-8,450м.д. (4Н); м. 7,795-7,855м.д. (2Н); д. 8,721м.д. (1Н).

Приклад 4.

Визначення цитотоксичності препаратів в умовах in vitro клітин за дією на моношар клітин та пригніченням їх життєздатності на культурі клітин L929.

Культуру клітин перевивної лінії фібробластів мишей (L929) вирощували у 96-лункових мікроплатах (в атмосфері, що містить 5% CO<sub>2</sub>). Через 24год з лунок, де сформувався суцільний моношар клітин видаляли середовище росту і вносили підтримуюче середовище із розчиненими препаратами в діапазоні концентрацій від 0,5 до 500мкг/см<sup>3</sup> (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 48год після інкубації плат при 36<sup>0</sup>С в умовах 5% CO<sub>2</sub> клітини розглядали 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 чотирьохплюсовою системою. Визначали: ТЦД<sub>100</sub> - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см<sup>3</sup>), що викликає повну деструкцію клітин, ТЦД<sub>50</sub> - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см<sup>3</sup>), що викликає зміну 50% моношару клітин; МВК - максимально витримувану концентрацію - максимальну із досліджених доз речовини (мкг/см<sup>3</sup>), що не викликає незворотніх змін у морфології та життєздатності клітин у порівнянні з контролем (фактично вона відповідає ТЦД<sub>0</sub>).

Розрахунок ТЦД<sub>50</sub> проводили за методом Ріда і Менча за формулами:

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

$$\log_2 TЦД_{50} = \log_2 B + (a-50) \cdot \log_2 d / (a-b),$$

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.

Статистичну обробку результатів виконували згідно з [Лакин Г.Ф. Биометрия. -М: Высшая школа, 1990, с.298-303] при  $P < 0,05$ .

Дані про цитотоксичність сполук 1-3 наведені у таблиці 1.

Приклад 5.

Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей на культурі клітин СНЕВ.

Інтерфероніндукуючу активність синтезованих сполук вивчали як описано [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 СНЕВ - лінії клітин нирки ембріону свині версенізовані. Препарати в різних дозах 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. [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 год, коли доза внесеного вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) 100 ТЦЦ<sub>50</sub> викликає повну дегенерацію клітин у контролі вірусу (КВ) за відсутністю 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.

Дані про інтерфероніндукуючу активність сполук 1-3 наведені у таблиці 2.

Приклад 6.

Вивчення антивірусної активності на культурі клітин L929.

Вплив сполук на противірусну резистентність культур клітин L929 вивчали за допомогою мікрометоду скринінгу антивірусних сполук [Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений: Метод, рекомендации

/Вотьяков В.И., Бореко Е.И., Владыко Г.В. и др. - Минск. - 1986.].

В 96-лункові пластикові панелі вносили суспензію клітин в концентрації, необхідній для формування суцільного шару клітин. На 2-3-й день (в залежності від активності росту культури) середовище зливали, моношар промивали середовищем для культур клітин без сироватки і вносили досліджувані препарати в серійних розведеннях в вертикальних рядах. На кожне розведення відводили 3 лунки для визначення антивірусної активності, одну - для контролю токсичності. Враховували також контроль клітин та вірусу. Клітини інкубували з препаратами 24 год. при 37°C, після чого середовище вилучали з лунок. В лунки для визначення контролю клітин та токсичності вносили середовище для підтримання росту клітин, у всі інші - вірусну суспензію ВВС. Для визначення ефективності захисту клітин проводили досліди із застосуванням ВВС в різних дозах: 10, 100, 1000 ЦТД<sub>50</sub>.

Мікропанелі інкубували в термостаті з постійним рівнем CO<sub>2</sub> при 37°C та вологості 98% до настання 100% цитопатичного ефекту (ЦПЕ) в лунках контролю вірусу. Потім визначали ступінь інгібування вірусоспецифічного ЦПЕ. Аналіз пригнічення вірусної реплікації проводили через 24 год. Антивірусну активність препаратів МК оцінювали за цито-патичним ефектом в формі некрозу (визначення проценту клітин, що загинули за допомогою прямого підрахунку під мікроскопом).

Визначали: ІД<sub>100</sub> - дозу препарату (мкг/мл), що повністю інгібує розвиток вірусспецифічного ЦПЕ; ІД<sub>50</sub> - дозу (мкг/мл), що затримує ЦПЕ вірусу на 50%.

Основна характеристика речовини з противірусною дією як можливого лікувального чи діагностичного засобу - ширина інтервалу між пороговими токсичною та специфічно активними дозами. Вона являє собою відношення ТЦД<sub>50</sub> до ІД<sub>50</sub> чи ХТІ - хіміотерапевтичний індекс - відношення між MBK (величину MBK визначали, досліджуючи токсичність препаратів-інтерферогенів) і МАК (мінімальною активною концентрацією), за яку приймали величину ІД<sub>50</sub> (визначається найбільш точно).

Хіміотерапевтичний індекс визначали за формулою: ХТІ=MBK/ІД<sub>50</sub>.

ХТІ, що складав 8 і більше, свідчив про ефективність препарату щодо досліджуваних вірусів [Кремерман Н.Б., Приймаги Л.С., Ершов Ф.И. Экспериментальное изучение интерферогенной и противовирусной активности некоторых биологически активных веществ //Вопр.вирусол. - 1984. - Т.29, №5. - С.549-552.]

Дані про антивірусну активність сполук 1-3 наведені у таблиці 3. Як видно з наведених даних, сполуки, що заявляються, є ефективними індукторами інтерферону і противірусними агентами.

Таблиця 1

Цитотоксичність сполук, що заявляються  
відносно культури фібробластів мишей лінії L929.

Сполука	Концентрація, $\mu\text{M}$		
	ЦД <sub>100</sub>	ЦЦ <sub>50</sub>	МВК
1	н.в.	н.в.	128,77
2	123,34	н.в.	7,40
3	н.в.	н.в.	125,04

Таблиця 2

Інтерфероніндукуюча активність  
сполук, що заявляються на культурі клітин СНЕВ

Сполука	ІФН-індукуючі концентрації сполук та титри ІФН, що вони індукують	
	С, $\mu\text{M}$	Титр
1	15,33	1:8
	8,9	1:64
2	14,80	1:8
	8,63	1:32
3	15,00	1:2
	8,80	1:64

Таблиця 3

Антивірусна ефективність сполук, що заявляються

Модель	Сполука	Активна концентрація ( $\mu\text{M}$ )			ХТІ	
		100	75	50	100	50
1	1	7,67	н. в.	н. в.	>16,79	н. в.
	3	н. в.	125,04	100,03	-	>1,25
2	1	7,67	н. в.	н. в.	>16,79	н. в.
	3	62,52	н. в.	25,01	>2	>5
3	1	7,67	н. в.	н. в.	>16,79	

Примітки: Активна концентрація (мкМ) - концентрація сполуки, що забезпечує захист клітин від ЦПД ВВС на вказаний відсоток; моделі 1 - 3 - клітини L929, сполуки вводили за 1год перед внесенням ВВС; модель 1 - використовували 10 ЦТД<sub>50</sub> ВВС; модель 2 - використовували 100 ЦТД<sub>50</sub> ВВС; модель 3 - використовували 1000 ЦТД<sub>50</sub> ВВС; н.в. - нижчі концентрації не вивчалися; „-” - антивірусна активність не реєструється.