



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87255 (13) C2

(51) МПК
A61P 31/12 (2009.01)
C07D 413/12 (2009.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ N-(2-(МОРФОЛІН-4-ІЛ)ПРОПІЛ)-2-НАФТАЛІМІДОАЦЕТАМІДУ ЯК ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОГО ПРОТИВІРУСНОГО АГЕНТА

1

(21) а200814862

(22) 02.03.2007

(24) 25.06.2009

(62) а200702264, 02.03.2007

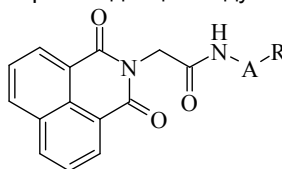
(46) 25.06.2009, Бюл. № 12, 2009 р.

(72) КАРПЕНКО ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ, ДО-
РОВСКИХ ІРИНА ВІКТОРІВНА, ЛЯХОВ СЕРГІЙ
АНАТОЛІЙОВИЧ, АНДРОНАТІ СЕРГІЙ АНДРІЙО-
ВИЧ, СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, ЖОЛОБАК НА-
ДІЯ МИХАЙЛІВНА, ОЛЕВІНСЬКА ЗОЯ МЕЧИСЛА-
ВІВНА(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БО-
ГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

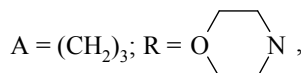
(56) UA 17734 U, 16.10.2006

WO 2004028464 A2, 08.04.2004

2

(57) Застосування N-(2-(морфолін-4-іл)пропіл)-2-
нафталімідоацетаміду

де :



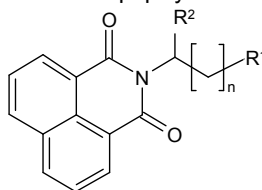
як інтерфероніндукуючого противірусного агента.

Винахід відноситься до вірусології, зокрема до стимулювання противірусного захисту, і може бути використаний для створення нових противірусних та імунокорегуючих засобів.

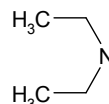
Різноманітність інфекційних хвороб, порушень імунного статусу та онкологічних захворювань роблять пошук ефективних та безпечних імунокоректорів вкрай актуальним. До найбільш ефективних імунокоректорів відносяться індуктори інтерферону (ІФН) [Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Индукторы интерферона. - М: Медицина,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

Найближчим аналогом винаходу, що заявляється, виходячи з біологічної активності та структури, є аміноалкілнафталіміди 1-9, які проявляють виражену інтерфероніндукуючу та противірусну активність [Карпенко О.С., Доровских І.В., Ляхов С.А., Андронаті С.А., Співак Н.Я., Жолобак Н.М., Олевінська З.М. Похідні аміноалкілнафталімідів як інтеркалюючі у ДНК індуктори інтерферону та противірусні агенти. Деклараційний патент України на корисну модель №17734, МПК C07D 213/00, C07C 209/00. Опубл. 16.10.2006. Бюл. №10], яка пов'я-

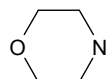
зана із здатністю цих сполук до інтеркаляції у ДНК, загальної формули:



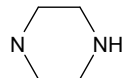
де:

 $R^1 = H; n = 1; R^2 =$ 

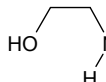
(1);



(2);



(3);

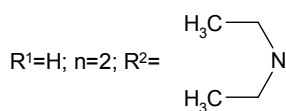


(4);

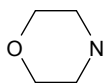
(13) C2

(11) 87255

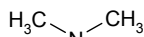
(19) UA



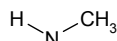
(5);



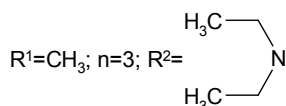
(6);



(7);



(8);

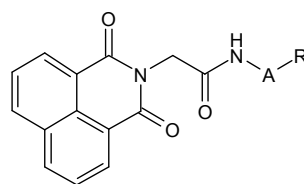


(9).

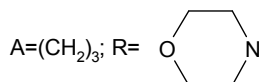
Але ці сполуки характеризуються помітною цитотоксичністю.

В основу винаходу поставлено задачу пошуку похідного нафталімідооцтової кислоти - N-(2-(морфолін-4-іл)пропіл)-2-нафталімідоацетаміду як інтерфероніндукуючого противірусного агенту, в якого за рахунок модифікації структури бокового ланцюга забезпечується зниження цитотоксичності.

Поставлена задача вирішена застосуванням N-(2-(морфолін-4-іл)пропіл)-2-нафталімідоацетаміду наступної формули:



де :

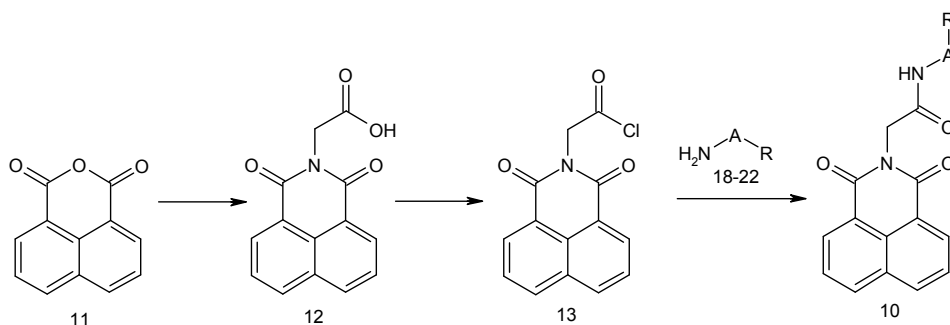


як інтерфероніндукуючий противірусний агент.

Причинно-наслідковий взаємозв'язок між структурою об'єктів, що заявляються, і їхньою біологічною дією полягає, очевидно, у здатності наявного в їх структурі амідного зв'язку до гідролізу у фізіологічних умовах і, як наслідок, скорочення часу дії протонізованого ліганду ДНК у клітині, при збереженні нафталімідного фрагменту, який забезпечує інтеркаляцію в ДНК, противірусну та інтерфероніндукуючу активності.

Сполуку одержували конденсацією хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти з морфолінопропіламіном, яку здійснювали змішуванням еквімольної кількості відповідного аміну із розчином хлороангідриду у безводному 1,4-діоксані з наступним виділенням та очисткою цільового продукту.

Чистота цільової сполуки 10 підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова - даними мас-спектрометрії та спектроскопії 1H -ЯМР.



Дослідження препарату проводили за схемою 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 синтезованої сполуки 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 сполуки, що заявляється, підтверджено прикладами.

Приклад 1. Отримання N-(2-(морфолін-4-іл)пропіл)-2-нафталімідоацетаміду (10).

Синтез проводили як описано у прикладі 3, виходячи із 2.73г (0.01 моль) хлороангідриду нафта-

лімідооцтової кислоти і 1.44г (0.01 моль) 3-(морфолін-4-іл)пропіламіну. Вихід: 1.75г (46%). $C_{21}H_{23}N_3O_4$. M.W. 381.44. Мас-спектр (БША), m/z (%): 382 (100) $[M+H]^+$. Т пл. = 208-209°C.

Приклад 2. Вивчення афінитету до ДНК.

Приготування вихідних концентрованих розчинів

Розчиняли 70мг ДНК у 100см³ води (одержали розчин "α"). 545мг NaCl розчиняли у 100см³ води (одержали розчин "β"). 36мг ЕДТА розчиняли у 100см³ води (одержали розчин "δ"). 52.2мг етидію броміду розчиняли у 100см³ води; одержали розчин з концентрацією $1,324 \times 10^{-3}M$ (розчин "ε").

Приготування концентрованого буферного розчину (розчин "χ")

Розчиняли у склянці на 50см³ 164мг безводного ацетату натрію в 20см³ води і додавали по краплях розведену водою (1:3) оцтову кислоту до рН=5 (контролювали рН за допомогою повіреного й відкалібованого рН-метру). Вміст склянки кількі-

сно перенесли у мірну колбу на 100см³ і додали воду до мітки.

Приготування контрольного розчину для "гасіння"

Внесли у мірну колбу на 50см³ 4см³ розчину α, 5см³ розчину β, 5см³ розчину χ, 5см розчину δ і 0,151 (0,150-0,152)см³ розчину ε. Додали воду до мітки (одержали розчин А).

Приготування контрольного розчину для "витиснення"

Внесли у мірну колбу на 50см³ 0,1см³ розчину α, 5см³ розчину β, 5см³ розчину χ, 5см³ розчину δ і 0,096 (0,09-0,100)см³ розчину ε. Додали воду до мітки (одержали розчин В).

Приготування буфера розведення

Внесли у мірну колбу на 50см³ 10см³ розчину β, 10см³ розчину χ, 10см³ розчину δ. Додали воду до мітки (одержали розчин С).

Приготування концентрованого розчину ліганду

Розрахункову кількість ліганду розчиняли у 100см дистильованої води, прагнучи одержати розчин з концентрацією у 20-30 разів більшою, ніж очікуване значення С₅₀ (одержали розчин D).

Приготування вихідних розчину ліганду

Додали у 8 мірних колб на 25см³ 0,5, 0,9, 1,3, 2,5, 4,0, 7,5, 10,0, 15,0, см³ розчину D. Додали воду до мітки (одержали розчини E1-E8). Як розчин E9 використовували розчин D.

Приготування робочих розчинів ліганду

У 9 пробірках змішували по 1см³ розчинів E1-E9 з 1см³ розчину С (одержали розчини F1-F9).

Приготування розчинів ліганду для вивчення гасіння

У 9 пробірок, що містять по 2см³ розчинів F1-F9 додавали по 2см розчину А (для вивчення гасіння), одержують розчини G1-G9 (одержали розчини G1-G9).

Додатково готували розчин G10 змішуючи 2см³ розчину А, 1см³ води і 1см³ розчину С.

Приготування розчинів ліганду для вивчення витиснення

У 9 пробірок, що містять по 2см³ розчинів F1-F9 додавали по 2см розчину В (для вивчення витиснення), одержують розчини H1-H9.

Додатково готували розчин H10 змішуючи 2см³ розчину В, 1см води і 1см розчину С.

Проведення вимірів

У кювету спектрофлуориметру додали 2,5см³ досліджуваного розчину, кювету установили у кюветоутримувач і записували спектр флуоресценції в інтервалі довжин хвиль 520-630нм. Виділяли пік, що відповідає етидію бромиду (λ_{max}=595±2нм) і з'єднували мінімуми прямою (базис). З вершини піка опускали перпендикуляр, відзначали точку його перетинання з базисом і вимірювали довжину отриманого відрізка. Процедуру повторювали для розчинів G1-G10 і H1-H10. Інтенсивність флуоресценції розчинів G1-G9 і H1-H9 виражали у відсотках щодо інтенсивності флуоресценції розчинів G10 і H10 відповідно. Відсоток витиснення етидію бромиду з комплексу визначали за формулою:

$$D\% = I\%_G - I\%_H$$

На графіку відкладали величини D%, I%_G і I%_H як функції від концентрації. Проводили пряму

D%=50% і з точки її перетину з графіком D%=F(3) опускали перпендикуляр. Отримане значення концентрації приймали за С₅₀. Якщо величина I%_H не перевищує 5-10%, то будували залежність I%_G від IgC_L. Отримані значення апроксимували сигмоїдою. Точку, що відповідає IgC_L визначали як точку перегину, а її довірчий інтервал - як ширину коридору помилок при 50% витисненні.

Логарифм константи асоціації ліганду з ДНК визначали за формулою:

$$\lg K_a = \lg C_E - \lg C_{50} + 7$$

Приклад 3. Визначення цитотоксичності препарату в умовах in vitro клітин за дією на моношар клітин та пригніченням 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 500мкг/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; MBK - 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:

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

$$\log_2 \text{ТЦД}_{30} = \log_2 B + (a - 50) \cdot \log_2 d / (a - b),$$

де log₂A і log₂B - логарифми концентрацій за основою 2, що викликали ефекти відповідно більше чи менше 50%, але найближчі до 50%; а і b - ефект, викликаний концентраціями А і В, %; log₂d - логарифм за основою 2 співвідношення між досліджуваними концентраціями.

Другим параметром, за яким оцінювали токсичність доз препарату було пригнічення їх життєздатності. [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 викли-

кало засвоєння фарбника на 50% вважали токсичним.

Приклад 4. Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей.

Інтерфероніндукуючу активність синтезованої сполуки 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 препарату в умовах *in vitro* вивчали в культурі клітин ПТП. Препарати в різних дозах (30-250мкг/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. [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 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.

Виявлено, що в умовах *in vitro* досліджена речовина спричиняє утворення інтерферону (дані - діапазон значень, що отримані у трьох паралельних експериментах - наведені в таблиці).

Дані про цитотоксичність та інтерфероніндукуючу активність сполук 10-14 та сполук порівняння 1-9 наведені в таблиці.

Таблиця

Інтеркалююча здатність, цитотоксичність та інтерфероніндукуюча активність сполук, що заявляються

Сполука	lgK _a	токсичність, - lgLC ₅₀	Противірусна активність, % живих клітин	Інтерфероніндукуюча активність (X log2)			
				L929		ПТП	
				(2.5 μM)	(11 μM)	(2.5 μM)	(11 μM)
1	6,99	4,42	30,5	3	5	1	1
2	5,38	3,54	72,2	2,4	4,5	0,5	-
3	5,29	3,89	44,4	5	7	2	4
4	5,57	4,40	16,6	4,5	7	2	2
5	6,56	4,44	16,6	4	6	3	4
6	6,93	3,87	30,5	4,5	7	3,5	4
8	5,57	4,38	2,8	4	6,5	2	3
9	5,50	3,58	100	5	7	0	0
10	5,46	3,63	100	5	6	0	0

Як видно з наведених даних, сполука, що заявляється, є інтеркалятором помірної сили та індуктором інтерферону, причому за своєю активністю

перевершує сполуки порівняння. Водночас, цитотоксична концентрація її дещо вища за ЦТК сполук порівняння.