



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86087** (13) **C2**
(51) **МПК**
C07D 221/06 (2008.01)
A61P 31/12 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ПОХІДНІ НАФТАЛІМІДООЦТОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ІНТЕРКАЛЮЮЧІ У ДНК ІНДУКТОРИ ІНТЕРФЕРОНУ ТА ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ

1

2

(21) а200702264

(22) 02.03.2007

(24) 25.03.2009

(46) 25.03.2009, Бюл. № 6, 2009 р.

(72) КАРПЕНКО ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ, UA,
ДОРОВСКИХ ІРИНА ВІКТОРІВНА, UA, ЛЯХОВ
СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA, АНДРОНАТІ СЕР-
ГІЙ АНДРІЙОВИЧ, UA, ЖОЛОБАК НАДІЯ МИХАЙ-
ЛІВНА, UA, ОЛЕВІНСЬКА ЗОЯ МЕЧИСЛАВІВНА,
UA, СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, UA

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

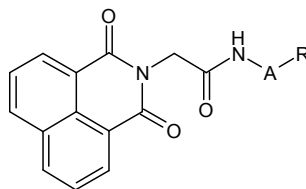
(56) UA 17734 U, 16.10.2006

WO 2004028464 A2, 08.04.2004

JP 48038610 B, 19.11.1973

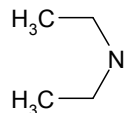
WO 0149290 A1, 12.07.2001

(57) Похідні нафталімідООЦТОВОЇ кислоти загальної
формули

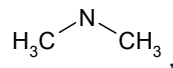
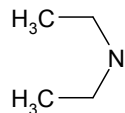


де

A = (CH₂)₂, R =



A = (CH₂)₃, R =



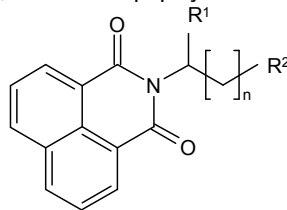
як інтеркалюючі у ДНК індуктори інтерферону та
протівірусні агенти.

Винахід відноситься до біоорганічної хімії, зокрема до синтезу індукторів інтерферону, і може бути використаний для створення нових протівірусних 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 протівірусну 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 протівірусні агенти. Деклараційний патент України на корисну модель №17734, МПК C07D213/00, C07C209/00. Опубл. 16.10.2006. Бюл. №10.], яка пов'язана із здатністю цих сполук до інтеркаляції у ДНК, загальної формули:

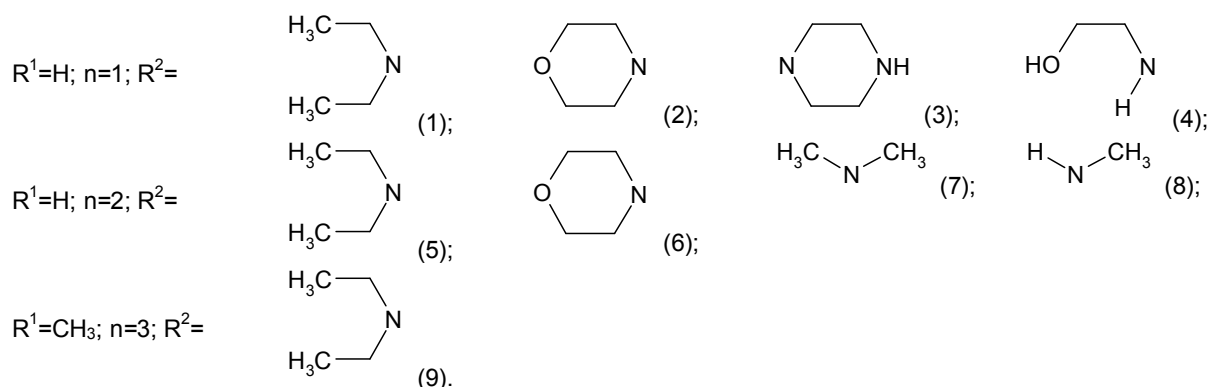


де:

(13) **C2**

(11) **86087**

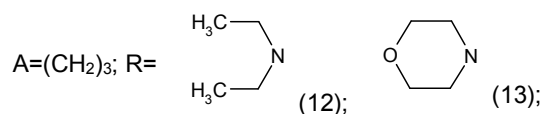
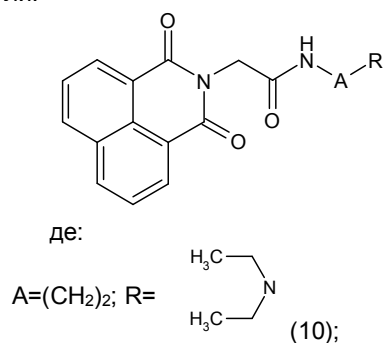
(19) **UA**



Але ці сполуки характеризуються помітною цитотоксичністю.

В основу винаходу поставлено задачу створити нові похідні нафталімідооцтової кислоти інтеркалюючі у ДНК індуктори інтерферону та противірусні агенти, в яких за рахунок модифікації структури бокового ланцюга в сполуках 1-9 забезпечити зниження цитотоксичності.

Поставлена задача вирішена синтезом похідних нафталімідооцтової кислоти загальної формули:

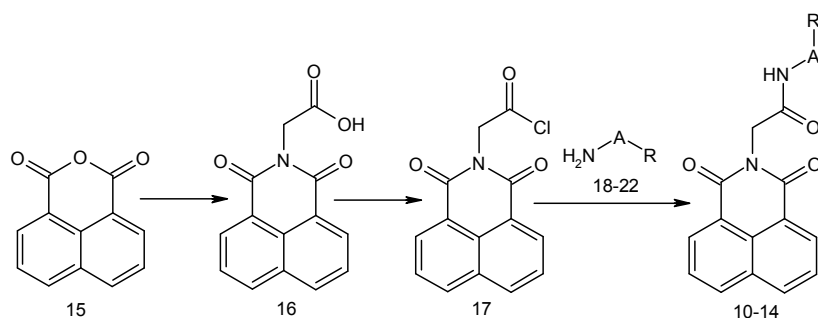


як інтерфероніндукуючих противірусних агентів.

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 протонного ліганду ДНК у клітині, при збереженні нафталімідного фрагменту, який забезпечує інтеркаляцію в ДНК, противірусну та інтерфероніндукуючу активності.

Сполуки 10-13 одержували конденсацією хлорангідриду нафталімідооцтової кислоти (16) з діалкіламіноалкіламінами (17-21), яку здійснювали змішуванням еквімолярної кількості відповідного аміну із розчином хлорангідриду у безводному 1,4-діоксані з наступним виділенням та очисткою цільового продукту.

Чистота цільових сполук 10-13 підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова-даними маспектроскопії та спектроскопії 1H -ЯМР.



Дослідження препаратів 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 синтезо-

ваних 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 нафталімідооцтової кислоти (15).

Розчин 20.81г (0.105моль) нафталенового ангідриду та 7.51г (0.1моль) α -амінооцтової кислоти в 50см³ ДМФА кип'ятили із зворотнім холодильником

2 години, замінювали зворотній холодильник насадкою Вюрца, приєднаною до прямого холодильника. Відганяли дистилат до досягнення температури пари 153°C. Реакційну суміш охолоджували. Осад, що випав, відфільтровували, промивали водою та висушували. Маточний розчин нагрівали до 100°C й додавали гарячу воду до замутнення та відфільтровували. Осад, що випав при охолодженні, відфільтровували та об'єднували із першим осадом, висушували та перекристалізовували з чотирихлористого вуглецю. Вихід 19.80г (74%). $C_{14}H_9NO_4$. M.W. 255.23. Мас-спектр (ЕВ) [M+] = [255]. Т пл. = 245 - 278°C.

Приклад 2. Отримання хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти (16).

Суміш 2.55г (0.01моль) нафталімідооцтової кислоти і 3.3см³ (0.03моль) хлористого тіонілу кип'ятили зі зворотним холодильником до повного розчинення осаду, випаровували у вакуумі досуха. Додавали безводний бенол (5см³) і знову випаровували у вакуумі. Операцію повторювали тричі. Сухий залишок висушували у вакуумі та використовували без додаткового очищення. Вихід сирого продукту 2.02г (74%). $C_{16}H_{12}ClNO_3$. M.W. 273.68. Мас-спектр (ЕВ) m/z (%): [M+] = [273+275].

Приклад 3. Отримання N-(2-диетиламіноетил)-2-нафталімідоацетаміду (10).

В 30см³ безводного діоксану при перемішуванні розчиняли 2.73г (0.01моль) хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти і 1.16г (0.01моль) 2-(діетиламіно)етиламіну. Продовжували перемішування при 70°C протягом 4-5 год (контроль за ТШХ). Випаровували реакційну суміш до об'єму 2-3см³ і виливали у 250 см³ води. Додавали розчин карбонату натрію до рН = 9, екстрагували хлороформом (3x50см³). Органічний екстракт підсушували і випаровували досуха. Сухий залишок екстрагували гептаном (5x30см³). При охолодженні випадали кристали цільового продукту. Осад відфільтровували і промивали на фільтрі охолодженням гептаном. Вихід: 2.43г (69%). $C_{20}H_{23}N_3O_3$. M.W. 353.42. Мас-спектр (БША), m/z (%): 354 (100) [M+H]⁺. Т пл.=196-197°C.

Аналогічно отримували сполуки 11-13.

Приклад 4. Отримання N-(2-(морфолін-4-ил)етил)-2-нафталімідоацетаміду (11).

Синтез проводили як описано у прикладі 3, виходячи із 2.73г (0.01моль) хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти і 1.30г (0.01моль) 2-(морфолін-4-ил)етиламіну. Вихід: 1.76г (48%). $C_{20}H_{21}N_3O_4$. M.W. 367.41. Мас-спектр (БША), m/z (%): 368 (100) [M+H]⁺. Т пл.-215-216°C.

Приклад 5. Отримання N-(2-диетиламінопропіл)-2-нафталімідоацетаміду (12).

Синтез проводили як описано у прикладі 3, виходячи із 2.73г (0.01моль) хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти і 1.30г (0.01моль) 2-(диетиламіно)пропіламіну. Вихід: 1.39г (38%). $C_{21}H_{25}N_3O_3$. M.W. 367.45. Мас-спектр (БША), m/z (%): 368 (100) [M+H]⁺. Т пл. (гідрохлорид) = 255-258°C.

Приклад 6. Отримання N-(2-диметиламінопропіл)-2-нафталімідоацетаміду (13).

Синтез проводили як описано у прикладі 3, виходячи із 2.73г (0.01моль) хлороангідриду нафталімідооцтової кислоти і 1.04г (0.01моль) 3-(диметиламіно)пропіламіну. Вихід: 1.49г (44 %). $C_{19}H_{21}N_3O_3$. M.W. 339.40. Мас-спектр (БША), m/z (%): 340 (100) [M+H]⁺. Тпл. = 191-192°C.

Приклад 7. 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 1.324x10⁻³ М (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-метра). Вміст склянки кількісно 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, 5см³ 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) см розчин у 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 C50 (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 2см³ 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 2см^3 розчинів F1-F9 додавали по 2см^3 розчину В (для вивчення витиснення), одержують розчини Н1-Н9.

Додатково готували розчин Н10 змішуючи 2см^3 розчину В, 1см^3 води і 1см^3 розчину С

Проведення вимірів

У кювету спектрофлуориметру додали 2.5см^3 досліджуваного розчину, кювету установили у кюветоутримувач і записували спектр флуоресценції в інтервалі довжин хвиль 520-630нм. Виділяли пік, що відповідає етидію броміду ($\lambda_{\text{max}}=595\pm 2\text{нм}$) і з'єднували мінімуми прямою (базис). З вершини піка опускали перпендикуляр, відзначали точку його перетинання з базисом і вимірювали довжину отриманого відрізка. Процедура повторювали для розчинів G1-G10 і Н1-Н10. Інтенсивність флуоресценції розчинів G1-G9 і Н1-Н9 виражали у відсотках щодо інтенсивності флуоресценції розчинів G10 і Н10 відповідно. Відсоток витиснення етидію броміду з комплексу визначали за формулою:

$$D\% = I\%_{\text{G}} - I\%_{\text{H}}$$

На графіку відкладали величини $D\%$, $I\%_{\text{G}}$ і $I\%_{\text{H}}$ 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 C_{50} . Якщо величина $I\%_{\text{H}}$ не перевищує 5-10%, то будували залежність $I\%_{\text{G}}$ від $\lg C_L$. Отримані значення апроксимували сигмоїдою. Точку, що відповідає $\lg C_L$ 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 8. Визначення цитотоксичності препаратів в умовах *in vitro* клітин за дією на моношар клітин та пригніченням їх життєздатності.

Перещеплювану культуру клітин фібробластів свиней-перевивних тестикул поросяти (ПТП)-виросщували у 96-лункових мікроплатах (в атмосфері, що містить 5% CO_2). 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 $500\text{мкг}/\text{см}^3$ (на одне розведення не менше 4 лунок). Контроль-лунок, 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% CO_2 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: ТЦД_{100} - тканинну цитотоксичну дозу ($\text{мкг}/\text{см}^3$), що викликає повну деструкцію клітин, ТЦД_{50} - тканинну цитотоксичну дозу ($\text{мкг}/\text{см}^3$), що викликає зміну 50% моношару клітин; MBK - максимально витримувану концентрацію - максимальну із досліджених доз речовини ($\text{мкг}/\text{см}^3$), що не викликає незворотніх змін у морфології та життєздатності клітин у порівнянні з контролем (фактично вона відповідає ТЦД_0).

Розрахунок ТЦД_{50} проводили за методом Ріда і Менча за формулами:

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

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

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.

Другим параметром, за яким оцінювали токсичність доз препаратів 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 викликало засвоєння фарбника на 50% вважали токсичним.

Приклад 9. Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей.

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 ПТП. Препарати в різних дозах ($30\text{-}250\text{мкг}/\text{см}$) 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 ТЦД_{50} викликає повну дегенерацію клітин у контролі вірусу (KB) 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* досліджені речовини спричиняють утворення інтерферону (дані - діапазон значень, що отримані у трьох паралельних експериментах - наведені в таблиці).

Дані про цитотоксичність та інтерфероніндукуючу активність сполук 10-13 та сполук порівняння 1-9 наведені в таблиці.

Таблиця

Інтеркалююча здатність, цитотоксичність та інтерфероніндукуюча активність сполук, що заявляються

Сполука	lgK _a	токсичність, -lgLC ₅₀	Противирусна- активність, % живих клітин	Інтерфероніндукуюча активність (X log ₂)			
				L929		ПТП	
				(2.5μM)	(11μM)	(2.5μM)	(11μM)
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	5.54	3.29	100	5	6	0	0
11	5.66	3.17	100	4.8	6.5	4	3
12	5.31	3.31	100	5	2	1	1
13	5.46	3.63	88.8	5	6.5	4.3	3.2

Як видно з наведених даних, сполуки, що заявляються, є інтеркаляторами помірної сили та індукторами інтерферону, причому за своєю актив-

ністю перевершують сполуки порівняння. Водночас, цитотоксична концентрація їх дещо вища за ЦТК сполук порівняння.