



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **17734** (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) ПОХІДНІ АМІНОАЛКІЛНАФТАЛІМІДІВ ЯК ІНТЕРКАЛЮЮЧІ У ДНК ІНДУКТОРИ ІНТЕРФЕРОНУ ТА ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ

1

2

(21) u200603556

(22) 03.04.2006

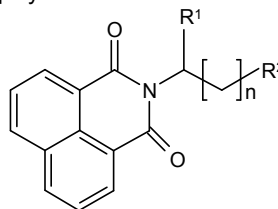
(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Карпенко Олександр Сергійович, Доровских Ірина Вікторівна, Ляхов Сергій Анатолійович, Андронаті Сергій Андрійович, Співак Микола Якович, Жолобак Надія Михайлівна, Олевінська Зоя Мечиславівна

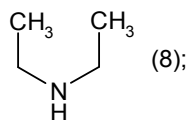
(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ.
О.В.БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ

(57) Похідні аміноалкілнафталімідів загальної формули

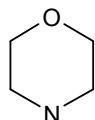


де:
 $R^1 = H$; $n = 1$;

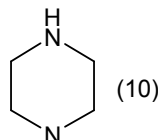
$R^2 =$



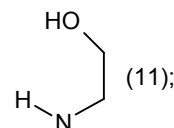
(8);



(9);



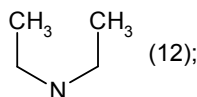
(10);



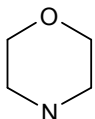
(11);

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

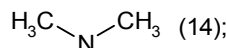
$R^2 =$



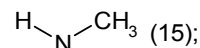
(12);



(13);



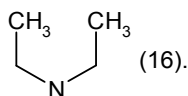
(14);



(15);

$R^1 = CH_3$; $n = 3$;

$R^2 =$



(16).

як інтеркалюючі у ДНК індуктори інтерферону та протівірусні агенти.

Корисна модель відноситься до біоорганічної хімії, зокрема до синтезу індукторів інтерферону, і може бути використана 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.]. Не-

зважаючи на наявність деяких клінічних індукторів (аміксин, циклоферон), цю проблему ще не можна вважати вирішеною.

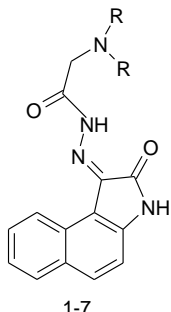
Найближчим аналогом корисної моделі, що заявляється, виходячи з біологічної активності та структури, є аміноацетилгідрозони бензоізатину 1-7. [Карпенко О.С., Шибінська М.О., Ляхов С.А., Литвинова Л.О., Андронаті С.А., Співак Н.Я., Жолобак Н.М., Олевінська З.М. Похідні ізатину як індуктори інтерферону. Деклараційний патент на корисну модель 8418 України, МПК7 С 07 D

(13) **U**

(11) **17734**

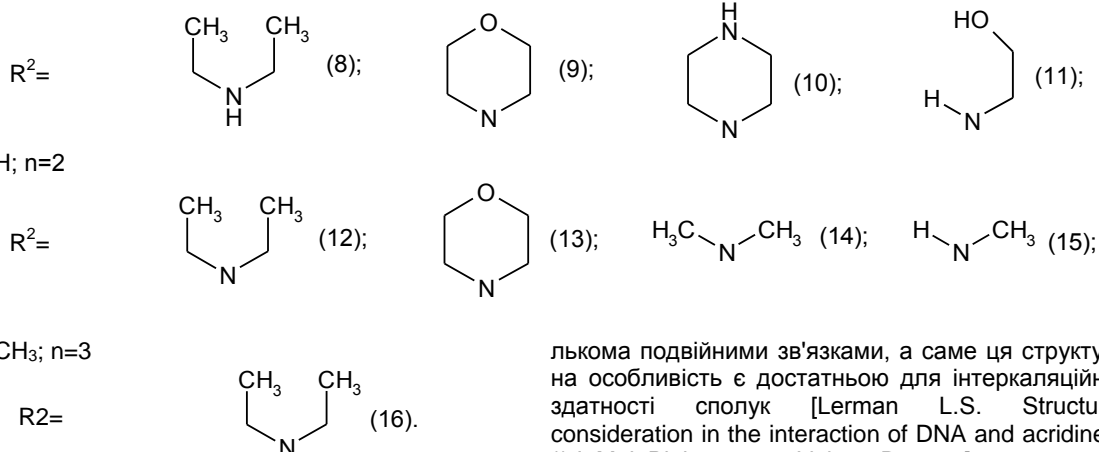
(19) **UA**

213/00, C07C209/00. - Заявка №20041008236; Заявл. 11.10.2004; Опубл. 15.08.2005. Бюл. №8.]



1-7

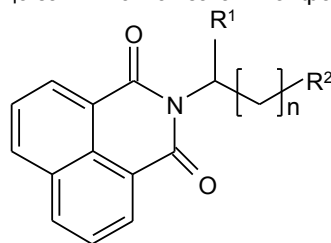
Основними недоліками, притаманними сполукам 1-7, як і іншим індукторам інтерферону є перехресна гіпореактивність та обмежений спектр дії [Stringfellow D.A. Production of the interferon protein: hyporesponsiveness. // *Tex. Rep. Biol. Med.* - 1977. - Vol. 35. - P.126-131], що зумовлює актуальність пошуку нових малотоксичних індукторів ІФН.



Раніше було припущено, що індукція ІФН аміксином реалізується за рахунок дерепресії генів ІФН, що є наслідком інтеркаляції молекули аміксіну до ДНК [Ляхов С.А., Литвинова Л.А. О взаимодействии аминоксифлуоренонов с нуклеиновыми кислотами и олигонуклеотидами. // *Физико-химический институт АН УССР. - Одесса, 1989. - 13с. - Рус. - Деп. в ВИНТИ 03.10.89г., №6264-B89.; Sergey A. Lyakhov Intercalative antiviral drugs: mode of action. // Abstracts of 6th International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Gdansk, Poland, 9-12 July, 1997, p.137]. Для сполук 8-16 здатність до інтеркаляції очікувана тому, що в їх структурі є три конденсовані плоскі цикли з декі-*

В основу корисної моделі поставлено задачу розширення спектру індукторів ІФН за рахунок створення нових синтетичних малотоксичних низькомолекулярних індукторів - похідних нафталіміду.

Поставлена задача вирішена синтезом сполук, що заявляються загальної формули:



8-16

а саме:

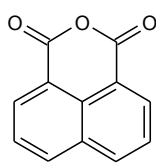
$R^1 = H; n = 1$

лькама подвійними зв'язками, а саме ця структурна особливість є достатньою для інтеркаляційної здатності сполук [Lerman L.S. Structural consideration in the interaction of DNA and acridines. // *J. Mol. Biol.* - 1961. - Vol.3. - P.18-30].

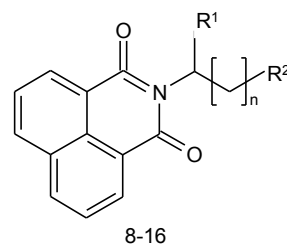
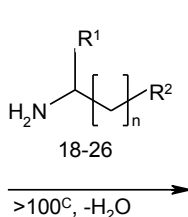
Причинно-наслідковий зв'язок між структурою об'єктів, що заявляються, і їхньою біологічною дією полягає, очевидно, у здатності сполук 8-16 до інтеркаляції в ДНК, що повинна призводити до дерепресії гена, його транскрипції і до наступного синтезу ІФН.

Сполуки, що заявляються, одержували конденсацією нафталенового ангідриду (17) з відповідними первинними амінами (18-26) з наступним виділенням та очисткою цільового продукту.

Чистота цільових сполук 8-16 підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова - даними мас-спектрометрії та спектроскопії 1H -ЯМР.



17



Інтеркалюючу здатність сполук якісно підтверджено за позитивними результатами тестів:

- збільшення характеристичної в'язкості розчинів ДНК у присутності ліганду (при сталості pH, іонної сили і температури) [Geller K., Reinert K.E., Schulze W. Interaction of DNA with tilorone derivatives: viscometric investigations // Biomed. Biochim. Acta. - 1985 - Vol.44, №7-8. - P.1095-1103];

- батохромний зсув в електронних спектрах довгохвильових смуг хромофору при одночасному гіпохромізмі [Sturm J., Schreiber L., Daune M. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice. II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotides // Biopolymers. - 1981. - Vol.20, №4. - P.765-785; Waring M.J. Drugs and DNA: uncoiling of the DNA double helix as evidence of intercalation // Humangenetik. - 1970. - Vol.9, №3. - P.234-236.];

- зменшення інтенсивності флуоресценції інтеркалюючих лігандів (етидію броміду, акридинового жовтого, профлавіну і т.д.) [Baguley B.C., Denny W.A., Atwell G.J., Cain B.F. Potential antitumor agents. 34. Quantitative relationships between DNA binding and molecular structure for 9-anilinoacridines substituted in the anilino ring. // J. Med. Chem. - 1981. - Vol.24, №2. - P.170-177].

Константи асоціації сполук отримано методом конкуренції з етідієм бромідом за описаною методикою [Antonini I., Polucci P., Kelland L.R., Menta E., Pescalli N., Martelli S. 2,3-Dihydro-1H,7H-pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-trione derivatives, a class of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships // J. Med. Chem. - 1999. - Vol. 42, №14. - P.2535-2541].

Первинне 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 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. 2-(2-Діетиламіноетил)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (8).

Суміш 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.162г (0.01моль, 1.42см³) 2-(діетиламіно)етиламіну (18) при перемішуванні нагрівають до 110°C і витримують при цій температурі 2-3 год. Реакційну суміш екстрагують киплячим бензолом (4×30см³). Бензол випарюють. Сухий залишок екстрагують киплячим гептаном (5×25см³), екстракт охолоджують до -18°C, осад відфільтровують і промивають на фільтрі 5см³ охолодженого до -18°C гептану. Вихід: 2.27г (77%). C₁₈H₂₀N₂O₂. М.В. 296.37. Т пл. (гідрохлорид)>250°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 297 (100)

[M+H]⁺. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.164т (6H, (CH₃ CH₂)₂N, 7.2), 2.752к (4H, (CH₃ CH₂)₂N, 7.2), 3.380с (2H, COCH₂N), 7.946 д д (2H, H5, 8.1 і 7.2), 8.566 д д (2H, H6, 8.1 і 0.8), 8.601 д д (2H, H4, 6.9 і 0.9).

Аналогічно одержують сполуки 9-16.

Приклад 2. 2-(2-Морфолін-4-іл-етил)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (9).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.16г (0.01моль) 2-(морфолін-4-іл)етиламіну (19). Вихід: 2.02г (65%). C₁₈H₁₈N₂O₃. М.В. 310.33. Т пл.=156.0-157.5°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 311 (100) [M+H]⁺. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.418-1.498м (2H, O(CH₂CH₂)₂N, 5.1), 1.622-1.696м (4H, O(CH₂CH₂)₂N, 5.1), 2.723-2.735м (4H, O(CH₂CH₂)₂N, 5.1), 3.274с (2H, COCH₂ N), 7.952 д д (2H, H5, 8.1 і 7.2), 8.573 д д (2H, H6, 8.3 і 0.9), 8.601 д д (2H, H4, 7.5 і 0.9).

Приклад 3. 2-(2-Піперазин-1-іл-етил)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (10).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.14г (0.01моль) 2-(піперазин-1-іл)етиламіну (20). Вихід: 1.73г (56%). C₁₈H₁₉N₃O₂. М.В. 309.37. Т пл. (гідрохлорид)=240-244°C (із розкладанням та возгонкою). Мас-спектр (БША), m/z (%): 310 (100) [M+H]⁺. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 2.737-2.785м (4H, N(CH₂CH₂)₂N, 5.4), 3.358с (2H, CCH₂ N), 3.755т (4H, N(CH₂CH₂)₂N, 5.4), 7.950 д д (2H, H5, 8.1 і 7.2), 8.571 д д (2H, H6, 8.3 і 0.9), 8.606 д д (2H, H4, 7.5 і 0.9).

Приклад 4. 2-[2-(2-Гідроксietiламіно)-етил]-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (11).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.04г (0.01моль) 2-(2-аминоетиламіно)етанолу (21). Вихід: 1.44г (51%). C₁₆H₁₆N₂O₃. М.В. 284.32. Т пл.=103-105°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 285 (100) [M+H]⁺. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.615т (4H, HOCH₂CH₂N, 3.3), 2.757-2.809м (4H, HOCH₂CH₂ N), 3.451с (2H, CCH₂ N), 7.948 д д (2H, H5, 8.7 і 7.8), 8.568 д д (2H, H6, 8.4 і 0.9), 8.607 д д (2H, H4, 7.2 і 0.6).

Приклад 5. 2-(3-Діетиламінопропіл)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (12).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.30г (0.01моль) 3-(діетиламіно)пропіламіну (22). Вихід: 2.23г (72%). C₁₉H₂₂N₂O₂. М.В. 310.40. Т пл.=53-55°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 311 (100) [M+H]⁺. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.926 д (6H, (CH₃ CH₂)₂N 5.7), 1.263-1.367м (3H), 1.650-1.682м (2H), 2.189т (2H, 12.9), 3.179-3.217м (2H), 3.287с (2H, (CH₃CH₂)₂N), 7.958 д д (2H, H5, 8.1 і 7.2), 8.581 д д (2H, H6, 9.6 і 0.9), 8.613 д д (2H, H4, 7.5 і 0.9).

Приклад 6. 2-(3-(Морфолін-4-іл)пропіл)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (13).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.44г (0.01моль) 3-(морфолін-4-іл)пропіламіну (23). Вихід: 2.14г (66%). $C_{19}H_{20}N_2O_3$. M.W. 324.38. Т пл.=137-138°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 325 (100) $[M+H]^+$. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.624-1.663м (4Н, $O(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 1.673-1.810м (4Н, $O(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 2.871-2.909м (4Н, $O(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 3.470с (2Н, $CO \underline{CH_2} N$), 7.972 д д (2Н, Н5, 7.8), 8.568 д д (2Н, Н6, 8.1), 8.599 д д (2Н, Н4, 8.4).

Приклад 7. 2-(3-Диметиламінопропіл)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (14).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 1.02г (0.01моль) 3-(диметиламіно)пропіламіну (24). Вихід: 1.97г (70%). $C_{17}H_{18}N_2O_2$. M.W. 282.35. Т пл.=116.0-117.5°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 283 (100) $[M+H]^+$. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 2.229с (3Н, $\underline{CH_3} N(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 2.463м (4Н, $\underline{CH_3} N(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 2.756м (4Н, $\underline{CH_3} N(\underline{CH_2CH_2})_2N$), 3.330с (2Н, $CO \underline{CH_2} N$), 7.957 д д (2Н, Н5, 8.4 і 7.5), 8.582 д д (2Н, Н6, 8.1 і 0.6), 8.613 д д (2Н, Н4, 7.8 і 0.6).

Приклад 8. 2-(3-Метиламінопропіл)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (15).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 0.88г (0.01моль) 3-(метиламіно)пропіламіну (25). Вихід: 12.9г (67%). $C_{16}H_{16}N_2O_2$. M.W. 268.32. Т пл.=111.0-112.5°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 269 (100) $[M+H]^+$. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 2.926с (3Н, $(\underline{CH_3})_2N$, 5.7), 1.263-1.367м (3Н), 1.650-1.682м (2Н), 2.189т (2Н, 12.9), 3.179-3.217м (2Н), 3.287с (2Н, $C \underline{CH_2} N$), 7.958 д д (2Н, Н5, 8.1 і 7.2), 8.581 д д (2Н, Н6, 9.6 і 0.9), 8.613 д д (2Н, Н4, 7.5 і 0.9).

Приклад 9. 2-(4-Діетиламіно-1-метилбутіл)-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон (16).

Синтез проводили як описано у прикладі 1, виходячи із 1.98г (0.01моль) нафталенового ангідриду (17) та 0.88г (0.01моль) 4-(діетиламіно)-1-(метил)бутіламіну (26). Вихід: 1.39г (47%). $C_{19}H_{20}N_4O_3$. M.W. 296.37. Т пл. (гідрохлорид)=158-159°C. Мас-спектр (БША), m/z (%): 339 (100) $[M+H]^+$. ЯМР-спектр (ДМФА-d7): 1.624-1.663м (4Н, $(\underline{CH_2CH_2CH_2})_2N$), 1.673-1.810м (4Н, $(\underline{CH_2CH_2CH_2})_2N$), 2.871-2.909м (4Н, $(\underline{CH_2CH_2CH_2})_2N$), 3.470с (2Н, $CO \underline{CH_2} N$), 7.972 д д (2Н, Н5, 7.8), 8.568 д д (2Н, Н6, 8.1), 8.599 д д (2Н, Н4, 8.4).

Приклад 10. Вивчення афінитету до ДНК.

Приготування вихідних концентрованих розчинів

70мг ДНК розчиняли у 100см³ води (одержали розчин "α"). 545мг NaCl розчиняли у 100см³ води (одержали розчин "β"). 36мг етилендіамінотетраацетату натрію 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 pH=5 (контролювали pH за допомогою повіреного й відкаліброваного pH-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)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 100см³ дистильованої води, прагнучи одержати розчин з концентрацією у 20-30 разів більшою, ніж очікуване значення C_{50} (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. Як розчин Е9 використовували розчин D (одержали розчини Е1-Е9).

Приготування робочих розчинів ліганду

У 9 пробірках змішували по 1см³ розчинів Е1-Е9 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), одержуючи 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 2см³ розчину В (для вивчення витиснення), одержуючи розчини H1-H9.

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

Проведення вимірів

У кювету спектрофлуориметру додали 2.5см³ досліджуваного розчину, кювету встановили у кю-

ветоутримувач і записували спектр флуоресценції в інтервалі довжин хвиль 520-630нм. Виділяли пік, що відповідає етидію броміду ($\lambda_{\max}=595\pm 2\text{нм}$) і з'єднували мінімуми прямою (базис). З вершини піка опускали перпендикуляр, відзначали точку його перетинання з базисом і вимірювали довжину отриманого відрізка. 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 броміду 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 C_{50} . Якщо величина $I\%_H$ не перевищує 5-10%, то будували залежність $I\%_G$ 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 11. 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) - вирощували у 96-лунокових мікро платах (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 500мкг/см^3 (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% 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 чотирьохплюсовою системою. Визначали: ТЦД_{100} - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см^3), що викликає повну деструкцію клітин, ТЦД_{50} - тканинну цитотоксичну дозу (мкг/см^3), що викликає зміну 50% моношару клітин; МВК - максимально витримувану концентрацію - максимальну із досліджених доз речовини (мкг/см^3), що не викликає незворотних 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:

$$\lg_2 \text{ТЦД}_{50} = \lg_2 A - (50 - b) \cdot \lg_2 d / (a - b), \text{ чи}$$

$$\lg_2 \text{ТЦД}_{50} = \lg_2 B + (a - 50) \cdot \lg_2 d / (a - b),$$

де $\lg_2 A$ і $\lg_2 B$ - 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, %: $\lg_2 d$ -

логарифм за основою 2 співвідношення між досліджуваними концентраціями.

Другим параметром, за яким оцінювали токсичність доз препаратів було пригнічення життєздатності клітин. [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.

В результаті 11 із 14 досліджених сполук в концентрації 250мкг/см^3 виявились нетоксичними для перевивних клітин ПТП. Сполука 8 у вказаній концентрації викликала 50% деструкцію моношару клітин та пригнічення їх життєздатності, 30% клітин загинуло при застосуванні вказаної концентрації сполуки 11. Концентрація сполуки $14-100 \text{мкг/см}^3$ становила для клітин ТЦД_{100} , а МВК склала 60мкг/см^3 . Отримані дані свідчать про низьку токсичність (за виключенням трьох вказаних сполук) переважної більшості досліджених речовин.

Приклад 12. 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 ($30-250 \text{мкг/см}^3$) додавали до сформованого моношару клітин і культивували при 37°C протягом 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) 100ТЦД_{50} 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 моно-

шару) 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 8-16 наведені в таблиці.

Таблиця

Інтеркалююча здатність, цитотоксичність та інтерфероніндукуюча активність сполук, що заявляються

Сполука	lgKa	токсичність, - lgLC ₅₀	Противірусна активність, (% живих клітин)	Інтерфероніндукуюча активність			
				L929		ПТП	
				(2.5μM)	(11μM)	(2.5μM)	(11μM)
8	6.99	4.42	30.5	3	5	1	1
9	5.38	3.54	72.2	2.4	4.5	0.5	-
10	5.29	3.89	44.4	5	7	2	4
11	5.57	4.40	16.6	4.5	7	2	2
12	6.56	4.44	16.6	4	6	3	4
13	6.93	3.87	30.5	4.5	7	3.5	4
15	5.57	4.38	2.8	4	6.5	2	3
16	5.50	3.58	100	5	7	0	0

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

ністю деякі з них не поступаються аміксину. Водночас, цитотоксична концентрація їх набагато вища за ЦТК аміксину, що вказує на їх вкрай низьку токсичність.