

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92174

(13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 213/00

C07C 209/00

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ**

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) 6-АМІНОЕТИЛ-6Н-ІНДОЛО-[2,3-В]ХІНОКСАЛІНИ ЯК ПРОТИВІРУСНІ АГЕНТИ ВІДНОСНО ВІРУСУ ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТУ ТА ІНДУКТОРИ ІНТЕРФЕРОНІВ

1

2

(21) a200714027

(22) 13.12.2007

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.

(72) ШИБІНСЬКА МАРИНА ОЛЕГІВНА, ЛЯХОВ СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, АНДРОНАТІ СЕРГІЙ АНДРІЙОВИЧ, ЖОЛОБАК НАДІЯ МИХАЙЛІВНА, СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ

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

(56) France-Aimee Alphonse et al: "A straightforward synthesis of pyrido-pyrazino[2,3-b]indoles and indolo [2,3-b]-quinoxaline" *Heterocycles*, Vol.55, №.5, 2001, pages 925-940

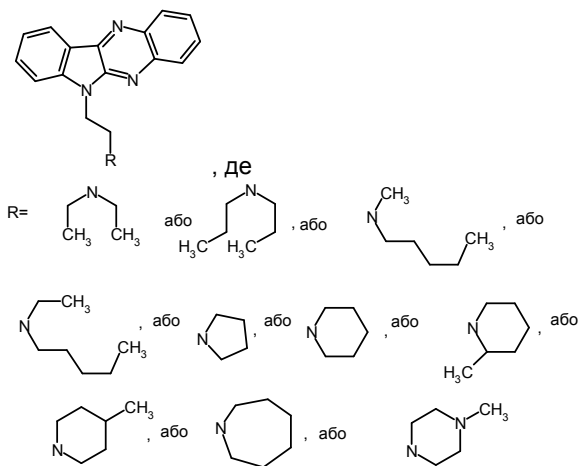
WO. 9600067. A1. 04.01.1996

US, 20010046996, A1, 29.11.2001

US, 4990510, A, 05.02.1991

EP, 023459, A1, 23.09.1987

(57) 6-Аміноетил-6Н-індола- $[2,3-b]$ хіноксаліни загальної формули:



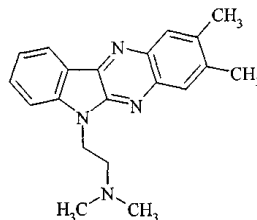
як противірусні агенти відносно вірусу везикулярного стоматиту та індуктори інтерферонів.

Винахід відноситься до біоорганічної хімії, зокрема до синтезу індукторів інтерферонів та протівірусних агентів, і може бути використана для створення нових протівірусних та імунорегуючих засобів.

Різнноманітність 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, 180 с.]. Незважаючи на наявність деяких клінічних індукторів (аміксин, циклоферон) цю проблему ще не можна вважати вирішеною.

Найближчими аналогом винаходу, що заявляється, виходячи із структури є 2,3-диметил-6-[2-(диметиламіно)етил]-6Н-індоло-[2,3-*b*]-хіноксалін, здатний до інгібування реплікації вірусу герпеса у культурі клітин [Harmenbergh J, Wahren B., Bergman J., Akerfeldt S., Lundblad L. Antihherpes virus activity and mechanism of action of indolo[2,3-*b*]quinoxaline

and analogs // Antimicrob. Agents Chemother. - 1988. - Vol. 32. - P. 1720-1724]. Відомості щодо індукції інтерферона цією сполукою відсутні.



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

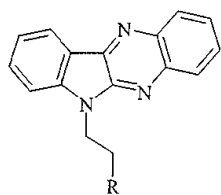
В основу винаходу поставлено задачу пошуку нових противірусних агентів серед сполук цього класу та розширення спектру індукторів інтерферонів.

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

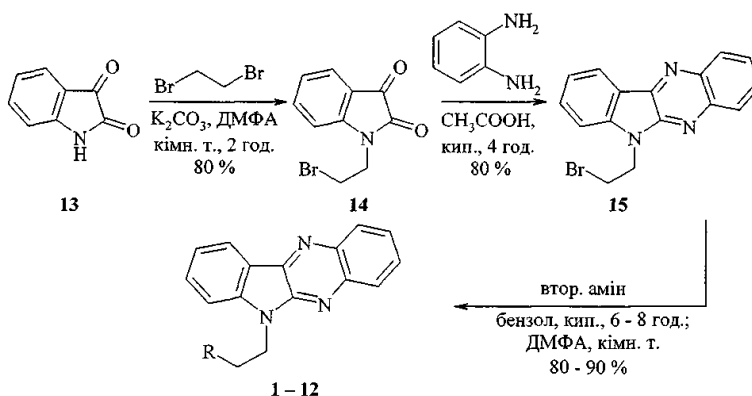
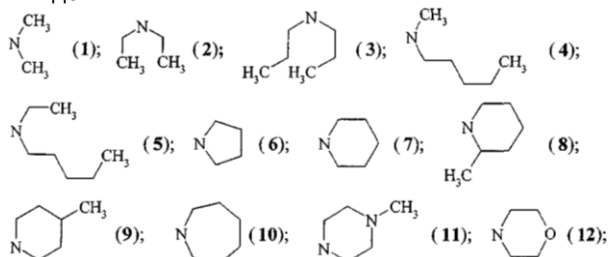
C2⁽¹³⁾

(11) 92174

UA⁽¹⁹⁾



де R=



Сполуки 2-12 отримували амінодегідробромуванням продукту 15 дією надлишку вторинних амінів при кип'ятінні у бензолі. На відміну від них сполуку 1 одержували при кімнатній температурі в диметилформаміді, тому що використовували водний розчин диметиламіну. Чистота усіх синтезованих сполук підтверджена тонкошаровою хроматографією, будова - даними спектроскопії $^1\text{H-NMR}$ та мас-спектрометрії.

Вивчення біологічної активності препаратів 1-12 проводили за схемою і в умовах, що враховували адекватність тест-моделі можливого механізму інтерферогенної активності, що передбачається 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, інтерфероніндукуючу та протівірусну активність синтезованих сполук вивчали як описано [Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К: МОЗ, Україна. ДФЦ, 2001. - 392 с.].

Отримання сполук, що заявляються, та їхні біологічні властивості підтверджено наступними прикладами.

Приклад 1.

1-(2-Бромоетил)-1H-індол-2,3-діон (14).

Сполуки, що заявляються, отримували у три стадії виходячи з 1H-індол-2,3-діону (13). Алкілювання 1H-індол-2,3-діону дією надлишку диброметану у диметилформаміді у присутності карбонату калія при кімнатній температурі приводило до 1-(2-бромоетил)-1H-індол-2,3-діону (14), подальшою конденсацією якого із о-фенілендіаміном в киплячій крижаній оцтовій кислоті отримували 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-b]хіноксалін (15).

До розчину 10 г (0.068 моль) 1H-індол-2,3-діону у диметилформаміді додали 33.5 г (0.17 моль) карбонату калія та ретельно перемішали, потім додали 117.2 см³ (255.5 г, 1.36 моль) диброметану. Отриману реакційну суміш перемішували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Відфільтрували неорганічний осад, промили на фільтрі диметилформамідом 3×5 см³. Фільтрат випарили, кубовий залишок промили водою та відфільтрували. Продукт перекристалізували із етанолу. Вихід: 13.8 г (80%); C₁₀H₈BrNO₂; M.W. 254.08; Т пл.=132.8-133.4°C. Мас-спектр - m/z (I, %): 255 (21), 253 (20) - M⁺; 146 (100); 132 (55); 90 (7), 77 (10). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні CH: т. 3.601 м.д., 6.9 Гц (2H, BrCH₂CH₂N); т. 4.136 м.д., 6.9 Гц (2H, BrCH₂CH₂N); ароматичні CH: д. 7.007 м.д., 8.4 Гц (1H); т. 7.134 м.д., 7.5 Гц (1H); м. 7.577-7.627 м.д. (2H). R_f 0.43 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.63 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 2.

6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-b]хіноксалін (15).

Суміш 10 г (0.04 моль) 1-(2-бромоетил)-1H-індол-2,3-діону (14), 4.32 г (0.04 моль) о-фенілендіаміну та 60 см³ крижаної оцтової кислоти кип'ятили протягом 4 год. Осад, що утворився після охолодження реакційної суміші, відфільтрували та промили на фільтрі крижаною оцтовою кислотою 3×5 см³. Продукт перекристалізували із крижаної оцтової кислоти. Вихід: 10.4 г (80%). C₁₆H₁₂BrN₃; M.W. 326.20. Т пл.=169-170°C. Мас-

спектр - m/z (I, %): 329 (14); 327 (21) - M^+ ; 232 (4); 220 (5); 219 (96); 102 (8); 90 (15); 69 (6); 60 (32); 45 (100); 43 (58). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: т. 3.863 м.д., 7.2 Гц (2H, $BrCH_2CH_2N$); т. 4.843 м.д., 7.2 Гц (2H, $BrCH_2CH_2N$); ароматичні CH: т. 7.386 м.д., 7.5 Гц (1H); д. 7.523 м.д., 8.1 Гц (1H); м. 7.662-7.791 м.д. (3H); д.д. 8.132 м.д., 8.4 Гц, 1.5 Гц (1H); д.д. 8.333 м.д., 8.1 Гц, 1.5 Гц (1H); д. 8.503 м.д., 7.5 Гц (1H). R_f 0.60 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.84 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 3.

(2-Індоло[2,3-*b*]хіноксалін-6-іл-етил)-диметиламін (1).

Розчинили 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) в 50 cm^3 ДМФА, додали 1.3 cm^3 (0.225 г, 0.005 моль) 33%-вого водяного розчину диметиламіну. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 6 год., потім випарили. Кубовий залишок розчинили в 25 cm^3 бензолу, екстрагували 10%-ою оцтовою кислотою ($3 \times 30 cm^3$). У водний екстракт додали насичений розчин Na_2CO_3 до pH=9. Осад, що випав, відфільтрували, промили на фільтрі водою ($3 \times 5 cm^3$) та висушили. Вихід: 0.57 г (78%). $C_{18}H_{18}N_4$. M.W. 290.37. Т пл.=95-95.5 °C. Мас-спектр - m/z (I, %): 291 (100) - MH^+ ; 246 (16); 232 (8); 219 (12); 72 (20); 57 (55). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: с. 2.408 м.д. (6H, $(CH_3)_2N$); т. 2.878 м.д., 6.9 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); т. 4.613 м.д., 7.2 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); ароматичні CH: т. 7.355 м.д., 7.5 Гц (1H); д. 7.520 м.д., 7.8 Гц (1H); м. 7.625-7.752 м.д. (3H); д.д. 8.124 м.д., 8.1 Гц, 1.2 Гц (1H); д.д. 8.289 м.д., 8.1 Гц, 1.5 Гц (1H); д. 8.460 м.д., 7.5 Гц (1H). R_f 0.46 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.08 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 4.

Діетил-(2-індоло[2,3-*b*]хіноксалін-6-іл-етил)-амін (2).

Розчинили 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) в 50 cm^3 бензолу, додали 0.64 cm^3 (0.46 г, 0.00625 моль) діетиламіну. Реакційну суміш кип'ятили при перемішуванні протягом 6 год. Потім охолодили, відфільтрували, осад на фільтрі промили бензолом ($3 \times 3 cm^3$). Фільтрат випарили, кубовий залишок розчинили в 25 cm^3 бензолу, екстрагували 10%-ою оцтовою кислотою ($3 \times 30 cm^3$). У водний екстракт додали насичений розчин Na_2CO_3 до pH=9. Осад, що випав, відфільтрували, промили на фільтрі водою ($3 \times 5 cm^3$). Вихід: 0.66 г (83%). $C_{20}H_{22}N_4$. M.W. 318.43. Т пл.=107-107.5 °C. Мас-спектр - m/z (I, %): 319 (100) - MH^+ ; 246 (10); 232 (8); 100 (6); 86 (12); 69 (6); 53 (8). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: т. 1.029 м.д., 5.4 Гц (6H, $(CH_3CH_2)_2N$); кв. 2.863 м.д., 3.9 Гц (4H, $(CH_3CH_2)_2N$); т. 2.980 м.д., 6-9 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); т. 4.592 м.д., 7.5 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); ароматичні CH: т. 7.380 м.д., 7.5 Гц (1H); д. 7.541 м.д., 7.8 Гц (1H); м. 7.680-7.760 м.д. (3H); д. 8.151 м.д., 8.1 Гц (1H); д. 8.316 м.д., 8.1 Гц (1H); д. 8.491 м.д., 7.2 Гц (1H). R_f 0.62 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.04 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 5.

(2-Індоло[2,3-*b*]хіноксалін-6-іл-етил)-дипропіламін (3).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.85 cm^3 (0.63 г, 0.00625 моль) дипропіламіну. Вихід: 0.70 г (82%). $C_{22}H_{26}N_4$. M.W. 346.48. Т пл.=75-76 °C. Мас-спектр - m/z (I, %): 347 (100) - MH^+ ; 246 (20); 232 (6); 220 (9); 128 (17); 114 (83); 72 (5). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: т. 0.802 м.д., 7.2 Гц (6H, $(CH_3CH_2CH_2)_2N$); м. 1.339-1.463 м.д. (4H, $(CH_3CH_2CH_2)_2N$); т. 2.504 м.д., 7.5 Гц (4H, $(CH_3CH_2CH_2)_2N$); т. 2.945 м.д., 7.5 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); т. 4.569 м.д., 7.5 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); ароматичні CH: т. 7.364 м.д., 6.9 Гц (1H); д. 7.518 м.д., 8.4 Гц (1H); м. 7.639-7.775 м.д. (3H); д.д. 8.136 м.д., 8.4 Гц, 1.2 Гц (1H); д.д. 8.306 м.д., 8.1 Гц, 1.2 Гц (1H); д. 8.476 м.д., 7.8 Гц (1H). R_f 0.71 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.09 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 6.

Бутил-(2-індоло[2,3-*b*]хіноксалін-6-іл-етил)-метиламін (4).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.75 cm^3 (0.54 г, 0.00625 моль) метилбутиламіну. Вихід: 0.66 г (80%). $C_{21}H_{24}N_4$. M.W. 332.45. Т пл. гідрохлориду=214-215 °C. Мас-спектр - m/z (I, %): 333 (100) - MH^+ ; 246 (8); 232 (6); 100 (12); 53 (5). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: т. 0.926 м.д., 7.5 Гц (3H, $CH_3(CH_2)_3N_{(аліф)}CH_3$); с. 1.281 м.д. (3H, $CH_3(CH_2)_3N_{(аліф)}CH_3$); м. 1.302-1.491 м.д. (2H, $CH_3CH_2CH_2CH_2N_{(аліф)}CH_3$); м. 1.694-1.977 м.д. (2H, $CH_3CH_2CH_2CH_2N_{(аліф)}CH_3$); т. 2.921 м.д., 6.6 Гц (2H, $CH_3(CH_2)_2CH_2N_{(аліф)}CH_3$); т. 3.619 м.д., 8.1 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); т. 5.220 м.д., 7.8 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); ароматичні CH: т. 7.446 м.д., 8.2 Гц (1H); м. 7.718-7.830 м.д. (3H); д. 8.126 м.д., 7.8 Гц (1H); д.д. 8.193 м.д., 7.8 Гц, 1.2 Гц (1H); д.д. 8.374 м.д., 8.1 Гц, 1.2 Гц (1H); д. 8.512 м.д., 8.1 Гц (1H). R_f 0.53 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.01 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 7.

Бутил-етил-(2-індоло[2,3-*b*]хіноксалін-6-іл-етил)-амін (5).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6H-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.85 cm^3 (0.63 г, 0.00625 моль) етилбутиламіну. Вихід: 0.73 г (84%). $C_{22}H_{26}N_4$. M.W. 346.48. Т пл.=53-54 °C. Мас-спектр - m/z (I, %): 347 (100) - MH^+ ; 246 (8); 232 (6); 114 (10). Спектр ПМР ($CDCl_3$): аліфатичні CH: т. 0.917 м.д., 7.2 Гц (3H, $CH_3(CH_2)_3N_{(аліф)}CH_2CH_3$); м. 1.243-1.404 м.д. (5H, $CH_3CH_2CH_2CH_2N_{(аліф)}CH_2CH_3$); м. 1.758-1.915 м.д. (2H, $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2N_{(аліф)}CH_2CH_3$); м. 3.047-3.126 м.д. (2H, $CH_3(CH_2)_2CH_2N_{(аліф)}CH_2CH_3$); м. 3.184-3.315 м.д. (2H, $CH_3(CH_2)_3N_{(аліф)}CH_2CH_3$); т. 3.460 м.д., 7.8 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); т. 5.075 м.д., 7.5 Гц (2H, $N_{(аліф)}CH_2CH_2N_{(аром)}$); ароматичні CH: т. 7.414 м.д., 7.8 Гц (1H); м. 7.677-7.799 м.д. (3H); д. 7.943 м.д., 7.8 Гц (1H); д.д. 8.095 м.д., 7.8 Гц, 1.5 Гц (1H); д.д. 8.324 м.д., 8.1 Гц, 1.5 Гц (1H); д. 8.467 м.д., 8.1 Гц (1H). R_f 0.68 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.02 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 8.

6-(2-Піролідин-1-іл-етил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (6).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.52 см³ (0.44 г, 0.00625 моль) піролідину. Вихід: 0.63 г (79%). C₂₀H₂₀N₄. M.W. 316.41. Т пл.=93-95°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 317 (100) - МН⁺; 247 (18); 233 (8); 221 (10); 84 (45); 54 (5). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: м. 1.698-1.875 м.д. (4Н, (CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 2.616-2.831 м.д. (4Н, (CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 3.049 м.д., 7.8 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); т. 4.657 м.д., 7.8 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.346 м.д., 7.5 Гц (1Н); д. 7.553 м.д., 8.1 Гц (1Н); м. 7.619-7.751 м.д. (3Н); д.д. 8.120 м.д., 8.4 Гц, 1.8 Гц (1Н); д.д. 8.284 м.д., 8.1 Гц, 1.5 Гц (1Н); д. 8.451 м.д., 7.8 Гц (1Н). R_f 0.46 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.08 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 9.

6-(2-Піперидин-1-іл-етил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (7).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.62 см³ (0.53 г, 0.00625 моль) піперидину. Вихід: 0.72 г (87%). C₂₁H₂₂N₄. M.W. 330.44. Т пл.=130-131°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 331 (100) - МН⁺; 246 (17); 232 (7); 220 (9); 112 (20); 98 (60); 53(7). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: м. 1.432-1.480 м.д. (2Н, CH₂(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 1.580-1.615 м.д. (4Н, CH₂(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 2.451-2.603 м.д. (4Н, CH₂(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 2.865 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); т. 4.647 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.354 м.д., 7.2 Гц (1Н); д. 7.561 м.д., 8.1 Гц (1Н); м. 7.629-7.760 м.д. (3Н); д.д. 8.127 м.д., 8.4 Гц, 1.5 Гц (1Н); д.д. 8.298 м.д., 8.1 Гц, 1.2 Гц (1Н); д. 8.463 м.д., 7.8 Гц (1Н). R_f 0.59 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.09 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 10.

6-[2-(2-Метил-піперидин-1-іл)-етил]-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (8).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.74 см³ (0.62 г, 0.00625 моль) 2-метилпіперидину. Вихід: 0.75 г (85%). C₂₂H₂₄N₄. M.W. 344.46. Т пл.=113-115°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 345 (100) - МН⁺; 247 (17); 233 (5); 221 (7); 126 (15); 113 (63); 54 (8). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: д. 1.120 м.д., 6.3 Гц (2Н, CH(CH₃)N_(аліф)); м. 1.307-1.434 м.д. (2Н, CH₂(CH₂)₂CH₂CH); м. 1.634-1.813 м.д. (4Н, CH₂(CH₂)₂CH₂CH); м. 2.486-2.548 м.д. (4Н, CH₂(CH₂)₂CH₂CH(CH₃)N_(аліф)); м. 2.834-2.925 м.д. (1Н, CH₂CH(CH₃)N_(аліф)); м. 3.098-3.270 м.д. (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); м. 4.607-4.688 м.д. (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.350 м.д., 7.5 Гц (1Н); д. 7.577 м.д., 7.8 Гц (1Н); м. 7.647-7.756 м.д. (3Н); д.д. 8.114 м.д., 8.4 Гц, 1.5 Гц (1Н); д.д. 8.291 м.д., 8.4 Гц, 1.8 Гц (1Н); д. 8.454 м.д., 7.8 Гц (1Н). R_f 0.19 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.02 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 11.

6-[2-(4-Метил-піперидин-1-іл)-етил]-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (9).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.74 см³ (0.62 г, 0.00625 моль) 4-метилпіперидину. Вихід: 0.70 г (80%). C₂₂H₂₄N₄. M.W. 344.46. Т пл.=141-142°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 345 (100) - МН⁺; 246 (15); 232 (8); 126 (17); 112 (75); 69 (5); 53(8). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: д. 0.916 м.д., 5.7 Гц (3Н, CH₃CH); м. 1.234-1.346 м.д. (3Н, CH₃CH(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 1.619-1.662 м.д. (2Н, CH₃CH(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 2.156-2.227 м.д. (2Н, CH₃CH(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 2.910 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); м. 3.094-3.131 м.д. (2Н, CH₃CH(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 4.651 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.353 м.д., 6.9 Гц (1Н); д. 7.585 м.д., 8.1 Гц (1Н); м. 7.624-7.757 м.д. (3Н); д.д. 8.116 м.д., 8.4 Гц, 1.2 Гц (1Н); д.д. 8.289 м.д., 8.4 Гц, 1.2 Гц (1Н); д. 8.454 м.д., 7.5 Гц (1Н). R_f 0.62 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.08 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 12.

6-(2-Азепан-1-іл)-етил]-6Н-індоло [2,3-*b*]хіноксалін (10).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.70 см³ (0.62 г, 0.00625 моль) азепану. Вихід: 0.73 г (84%). C₂₂H₂₄N₄. M.W. 344.46. Т пл.=75-76°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 345 (100) - МН⁺; 246 (16); 232 (7); 219 (8); 126 (17); 112 (52); 69 (17); 53 (35). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: м. 0.822-0.888 м.д. (4Н, (CH₂CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 1.563-1.592 м.д. (4Н, (CH₂CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 2.940-3.055 м.д. (4Н, (CH₂CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 3.160 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); т. 4.710 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.381 м.д., 7.2 Гц (1Н); д. 7.624 м.д., 8.1 Гц (1Н); м. 7.649-7.781 м.д. (3Н); д.д. 8.136 м.д., 8.1 Гц, 1.8 Гц (1Н); д.д. 8.311 м.д., 8.1 Гц, 1.2 Гц (1Н); д. 8.477 м.д., 7.8 Гц (1Н). R_f 0.56 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.01 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 13.

6-[2-(4-Метил-піперазин-1-іл)-етил]-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (11).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.70 см³ (0.63 г, 0.00625 моль) 1-метилпіперазину. Вихід: 0.76 г (88%). C₂₁H₂₃N₅. M.W. 345.45. Т пл.=143-144°C. Мас-спектр - *m/z* (I, %): 346 (100) - МН⁺; 247 (13); 233 (8); 221 (10); 114 (26); 70 (22). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні СН: с. 2.270 м.д. (3Н, CH₃N); м. 2.347-2.443 м.д. (4Н, CH₃N(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); м. 2.598-2.696 м.д. (4Н, CH₃N(CH₂CH₂)₂N_(аліф)); т. 2.874 м.д., 7.2 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); т. 4.583 м.д., 6.9 Гц (2Н, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні СН: т. 7.350 м.д., 7.8 Гц (1Н); д. 7.473 м.д., 8.1 Гц (1Н); м. 7.621-7.753 м.д. (3Н); д.д. 8.094 м.д., 8.4 Гц, 1.5 Гц (1Н); д.д. 8.288 м.д., 8.4 Гц, 1.5 Гц (1Н); д. 8.460 м.д., 7.8 Гц (1Н). R_f 0.19 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.02 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 14.

6-(2-Морфолін-1-іл)-етил]-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (12).

Синтез проводили як описано у прикладі 4, виходячи із 0.81 г (0.0025 моль) 6-(2-бромоетил)-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну (15) та 0.54 см³ (0.54 г, 0.00625 моль) 2-морфоліну. Вихід: 0.78 г (93%). C₂₀H₂₀N₄O. M.W. 332.41. Т пл.=125-126°C. Мас-спектр - m/z (I, %): 333 (100) - MH⁺; 247 (22); 233 (10); 220 (14); 100 (43); 77 (6). Спектр ПМР (CDCl₃): аліфатичні CH: т. 2.600 м.д., 4.5 Гц (4H, O(CH₂CH₂)₂N_(алі)); т. 2.864 м.д., 6.9 Гц (2H, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); 3.613 м.д., 4.8 Гц (4H, O(CH₂CH₂)₂N_(алі)); т. 4.613 м.д., 6.9 Гц (2H, N_(аліф)CH₂CH₂N_(аром)); ароматичні CH: т. 7.377 м.д., 7.2 Гц (1H); д. 7.502 м.д., 8.1 Гц (1H); м. 7.643-7.774 м.д. (3H); д.д. 8.113 м.д., 7.8 Гц, 1.2 Гц (1H); д.д. 8.292 м.д., 7.8 Гц, 1.5 Гц (1H); д. 8.487 м.д., 7.8 Гц (1H). R_f 0.53 (бензол-триетиламін 10:1); R_f 0.29 (хлороформ-ацетон 10:1).

Приклад 15.

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

Культури клітин перевивної лінії фібробластів мишей (L929) та текстикул поросяти (ПТП) вирощували у 96-лункових мікроплатах (в атмосфері, що містить 5% CO₂). Через 24 год з лунок, де сформувалася суцільний моношар клітин видаляли середовище росту і вносили підтримуюче середовище із розчиненими препаратами в діапазоні концентрацій від 0.1-100 μM (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 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: 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 незворотних змін у морфології та життєздатності клітин у порівнянні з контролем (фактично вона відповідає ТЦД₀).

Розрахунок ТЦД₅₀ проводили за методом Ріда і Менча за формулами:

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

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 [Лакін Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1990, с. 298-303] при $P < 0.05$.

Дані про цитотоксичність сполук 1-12 наведені у таблиці 1.

Приклад 16.

Вивчення антивірусної активності на культурах клітин L929 та ПТП.

Вплив сполук на противірусну резистентність культур клітин L929 та ПТП вивчали за допомогою мікрометоду скринінгу антивірусних сполук [Первичное изучение антивірусных свойств синтетических и природных соединений: Метод, рекомендации / Вотяков 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 - суспензію вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). Для визначення ефективності захисту клітин проводили досліди із застосуванням ВВС в різних дозах: 10, 100, 1000 ЦТД₅₀.

Мікропанелі інкубували в термостаті з постійним рівнем CO₂ 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 цитопатичним ефектом в формі некрозу (визначення проценту клітин, що загинули за допомогою прямого підрахунку під мікроскопом).

Визначали: ID₁₀₀ - дозу препарату (мкг/мл), що повністю інгібує розвиток вірусспецифічного ЦПЕ; ID₅₀ - дозу (мкг/мл), що затримує ЦПЕ вірусу на 50%.

Дані про антивірусну активність сполук 1-12 наведені у таблиці 2.

Приклад 17.

Вивчення інтерфероніндукуючих властивостей на культурах клітин L929 та ПТП.

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 культурах клітин L929 та ПТП. 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 ЦТД₅₀ 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.

Дані про інтерфероніндукуючу активність сполук 1-12 наведені у таблиці 3.

Як видно з наведених даних, сполуки, що заявляються, є ефективними індукторами інтерферонів та протівірусними агентами.

Таблиця 1

Цитотоксичність сполук, що заявляються

Сполука	Культура клітин L ₉₂₉		Культура клітин ПТП	
	T ^a	±ε ^b	T ^a	±ε ^b
1	4.04	0.05	4.09	0.02
2	3.19	0.03	3.34	0.02
3	3.66	0.05	3.83	0.02
4	3.25	0.06	3.69	0.07
5	3.76	0.04	4.08	0.09
6	4.12	0.06	3.79	0.06
7	3.75	0.03	3.03	0.02
8	3.63	0.04	3.4	0.03
9	3.24	0.05	2.55 ^c	0.09
10	3.84	0.09	3.88	0.05
11	4.01	0.02	4.09	0.03
12	<3.00	-	<3.00	-

a - T - токсичність, обчислювали як негативний логарифм концентрації (M) досліджуваної сполуки, що викликала загибель 50% клітин у моношарі (-lg(LC₅₀, M));

b - значення довірчого інтервалу (±ε) обчислені для P<0.05.

Таблиця 2

Антивірусна ефективність сполук, що заявляються

Сполука	Культура клітин L ₉₂₉				Культура клітин ПТП			
	Модель 1 ^a		Модель 2 ^b		Модель 1 ^a		Модель 2 ^b	
	-lg IC ₅₀ ^c	±ε ^d	-lg IC ₅₀	±ε	-lg IC ₅₀	±ε	-lg IC ₅₀	±ε
1	4.95	0.08	5.84	0.12	5.02	0.06	5.84	0.12
2	5.66	0.05	5.89	0.05	5.21	0.04	5.47	0.04
3	5.45	0.12	5.89	0.06	5.18	0.10	5.57	0.06
4	5.63	0.07	5.84	0.09	5.32	0.13	5.52	0.11
5	5.47	0.05	5.50	0.10	4.88	0.04	4.88	0.10
6	5.65	0.04	5.88	0.05	5.39	0.02	5.57	0.06
7	5.59	0.06	5.87	0.03	5.25	0.09	5.54	0.03
8	5.72	0.03	5.90	0.07	5.39	0.05	5.58	0.07
9	4.64	0.11	5.79	0.09	4.70	0.11	5.80	0.10
10	5.42	0.09	5.89	0.06	5.10	0.12	5.57	0.05
11	5.32	0.09	5.86	0.10	5.33	0.04	5.84	0.10
12	5.35	0.10	5.79	0.13	-	-	5.79	0.13

a - Модель 1 - досліджувані сполуки додавали до моношару клітин одразу після інфікування 100 ЦТД₅₀ ВВС (одночасне введення);

b - Модель 2- досліджувані сполуки додавали до моношару клітин через 24 год. після інфікування 100 ЦТД₅₀ ВВС (профілактичне введення);

c -lg IC₅₀ - негативний логарифм концентрації (M) досліджуваної сполуки, що приводила до 50%-го інгібування цитопатичної дії ВВС;

d - значення довірчого інтервалу (±ε) обчислені для P<0.05.

Таблиця 3

Інтерфероніндукуюча активність сполук, що заявляються

Сполука	Культура клітин L ₉₂₉	Культура клітин ПТП
	Т ІФН при C=1.1×10 ⁻⁶ М	Т ІФН при C=1.5×10 ⁻⁶ М
1	16	32
2	64	64
3	8	32
4	16	32
5	8	8
6	32	64
7	64	32
8	32	32
9	8	32
10	64	32
11	4	32
12	8	16

Т ІФН - титр індукованого інтерферону - максимальне розведення інтерферон-вміщуючого культурального середовища, при якому зберігається його здатність інгібувати цитопатичну дію вірусу.