

© Коллектив авторов, 2014

А. В. Иващенко^{1, 2, 3}, П. М. Яманушкин¹, О. Д. Митькин¹, В. М. Кисиль²,
О. М. Корзинов^{1, 4}, В. Ю. Веденский², И. А. Ленева⁵, Е. А. Буланова¹,
В. В. Бычко², И. М. Окунь², А. А. Иващенко^{1, 4}, Я. А. Иваненков¹

СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАМЕЩЕННЫХ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ 2,4-БИС-АМИНОМЕТИЛ-5-ГИДРОКСИ-1*H*-ИНДОЛ-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

¹ Исследовательский институт химического разнообразия, 114401, Химки, Московская обл., Россия, e-mail: ypm@iibr.ru

² ChemDiv, Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121 USA, Service: +1 877 ChemDiv, e-mail: av@chemdiv.com

³ ASAVI LLC, Hallandale Beach, FL 33009 USA, 1835 E. Hallandale Beach Blvd, #442, e-mail: av@asavillc.com

⁴ Московский физико-технический институт, 141700, Долгопрудный, Московской обл., Россия, e-mail: a.ivashchenko@mipt.ru

⁵ ФГБУ НИИВС им. Мечникова РАМН, Москва, Россия, E-mail: wnyfd385@yandex.ru

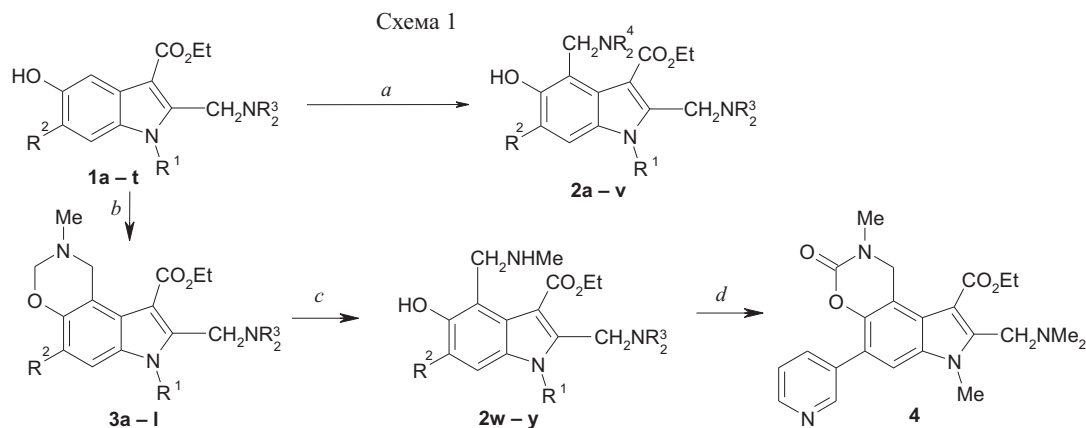
Синтезированы новые замещенные этиловые эфиры 2,4-бис-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-карбоновых кислот, 8-аминометил-2-метил-2,3-дигидро-1*H*,7*H*-[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновых кислот, а также представители неизвестных ранее 4,5-дигидро-1*H*-пирроло[4,3,2-*de*]изохинолина-3-онов, 1,4-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3,6-дионов. Изучена их цитотоксичность и противовирусная активность по отношению к вирусам бычьей вирусной диареи (BVDV), гепатита С (HCV) и А/Аичи/2/69 (H3N2) *in vitro*. Установлено, что синтезированные соединения не обладают активностью по отношению к указанным вирусам. Исключение составили лишь гидрохлориды этиловых эфиров 5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-пиридин-3-ил- и 5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-фтор-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты, которые не только в микромолярных концентрациях эффективно подавляли репликацию вируса гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) в культуре клеток, но и проявили высокую эффективность *in vivo* на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) в дозе 25 мг/кг/день.

Ключевые слова: 2-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-карбоновые кислоты; 8-аминометил-2-метил-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновые кислоты; 4,5-дигидро-1*H*-пирроло[4,3,2-*de*]изохинолина-3-оны; 1,4-дигидро-пирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3,6-дионы; гепатотоксичность; противовирусная активность; противогриппозная активность; вирус гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2); BVDV; HCV.

Продолжая исследования противовирусной активности этиловых эфиров 2- и 4-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-карбоновых кислот и их производных [1], мы осуществили синтез и изучили цитотоксичность и противовирусную активность новых замещенных 2,4-бис-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-карбоновых кислот (**2a – y**) и 8-аминометил-2-метил-2,3-дигидро-1*H*,7*H*-[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновых кислот (**3a – i, 4**), которые к настоящему времени исследованы крайне слабо [2, 3], а также получили первых представителей неизвестных ранее 4,5-дигидро-1*H*-пирроло[4,3,2-*de*]изохинолина-3-онов (**5a, b**) и 1,4-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3,6-дионов (**6**).

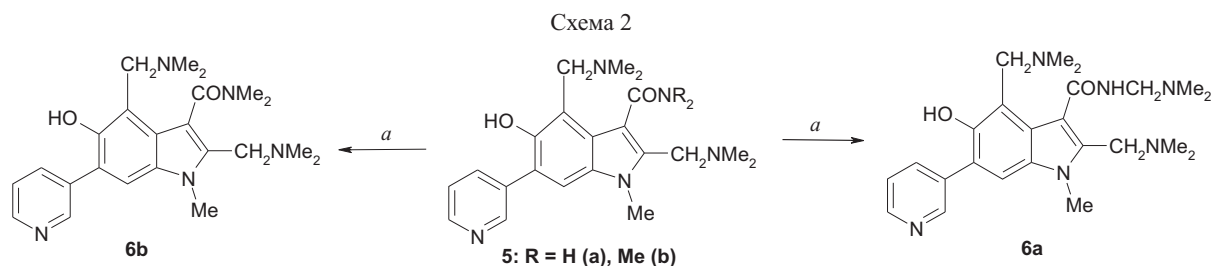
Этиловые эфиры индол-3-карбоновых кислот **2a – v** получены (схема 1) аминотилированием вторичными аминами и формальдегидом соответствующих 2-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индолов (**1a – t**). Последние использованы нами также для получения этиловых эфиров кислот **3a – l**, синтез которых осуществлен также аминотилированием соответствующих индолов **1** метиламином и формальдегидом. Действием гидросиламина некоторые из оксазиноиндолов **3** были превращены в 4-(метиламино)метилинды **2w – y**, а действием N-метилморфолина (CDI) на 4-(метиламино)метилиндол **2w** получен 3-оксо[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол **4**.

Аминотилированием диметиламином и формальдегидом 2-диметиламинометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-илкарбоксамидов **5a, b** получены 2,4-бис-диметиламинометил-5-гидрокси-1*H*-индол-3-илкарбоксамиды **6a, b**. Следует отметить, что при использовании в качестве исходного соединения 5-гидрокси-1*H*-индол-3-илкарбоксамиды **5a**, аминотилируется не только гетероцикл, но и амидная группа, при этом образуется иминометиламид **6a** (схема 2).

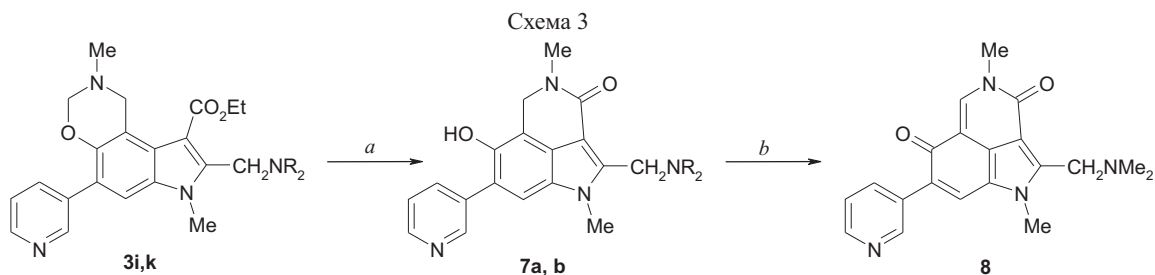


Соединение	R ¹	R ²	NR ³ ₂	NR ⁴ ₂	Соединение	R ¹	R ²	NR ³ ₂	NR ⁴ ₂	Соединение	R ¹	R ²	NR ³ ₂
2a	Me	F	NMe ₂	NMe ₂	2m	Me	3-Py	Mor	Im	3a	Me	F	NMe ₂
2b	Me	F	NMe ₂	Im	2n	Me	3-Py	Pz	NMe ₂	3b	Me	Br	NHMe
2c	Me	Br	NMe ₂	NMe ₂	2o	Me	3-Py	NMe ₂	Im	3c	Me	Br	NHPh
2d	Me	CN	NMe ₂	NMe ₂	2p	Me	4-Py	NMe ₂	NMe ₂	3d	Me	Br	NMe ₂
2e	Me	3-Py	NMe ₂	NMe ₂	2q	Me	4-Py	Pyr	NMe ₂	3e	Cy	Br	Pyr
2e^a	Me	3-Py	NMe ₂	¹⁵ NMe ₂	2r	Me	4-Py	Pyr	Pyr	3f	Ph	Br	NMe ₂
2f	<i>i</i> -Pr	3-Py	NMe ₂	NMe ₂	2s	Me	4-Py	Pyr	Im	3g	PhCH ₂	Br	Pyp ^b
2g	<i>c</i> -Pr	3-Py	NMe ₂	NMe ₂	2t	Me	4-Py	NMe ₂	Pyr	3h	Me	CN	NMe ₂
2h	Cy	3-Py	NMe ₂	NMe ₂	2u	Me	4-Py	NMe ₂	Im	3i	Me	3-Py	NMe ₂
2i	Ph	3-Py	NMe ₂	NMe ₂	2v	Me	4-Py	NMe ₂	NMe ₂	3j	Me	3-Py	Pyr
2j	Me	3-Py	Pyr	NMe ₂	2w	Me	3-Py	NMe ₂	NHMe	3k	Me	3-Py	Mor
2k	Me	3-Py	NMe ₂	Pyr	2x	Me	3-Py	Pyr	NHMe	3l	Me	4-Py	Pyr
2l	Me	3-Py	Pyr	Im	2y	Me	3-Py	Mor	NHMe				

^{a, 4} - ¹³CH₂¹⁵NMe₂ производное; ^b 1-метилпиперидин.



Щелочным гидролизом оксазиноиндолов **3i, k** нами получены 4,5-дигидро-1*H*-пирроло[4,3,2-*de*]изохинолина-3-оны (**7a, b**), один из которых при окислении хлористым железом(III) превратился в 1,4-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3,6-дион (**8**) (схема 3).



7a: R=Me. **7b:** NR₂=морфолин-1-ил. Реагенты и условия: а) LiOH, H₂O; б) FeCl₃.

Экспериментальная химическая часть

¹H ЯМР спектры синтезированных соединений записаны в растворах ДМСО-*d*₆ на спектрометре Bruker DPX-400 (400 МГц, 27 °С). ЖХ МС спектры получены с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu 10Avp ЖХВД с колонкой Waters XBridge C18 3,5 мкм (4,6 × 150 мм) и API 150 EX масс-спектрометром (λ, 220 и

254 нм). По данным ВЭЖХ МС/UV₂₅₄ чистота всех синтезированных соединений составляла не менее 98,0 %. Данные ВЭЖХ МС и ¹H и ¹³C ЯМР спектров соответствуют их структуре.

Все реакции проводились в растворителях, очищенных по стандартным методикам.

Исходные 2-аминометил-5-гидрокси-1*H*-индолы **1a – t** получены от ООО “Исследовательский институт химического разнообразия” (Химки, Московской обл.).

Арбидол получен по известной методике [4]. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,38 (с, 1H), 8,97 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,35 (м, 5H), 4,84 (с, 2H), 4,74 (с, 2H), 4,19 (к, J 7,2 Гц, 2H), 3,70 (с, 3H), 2,74 (с, 5H), 1,25 (т, J 7,2 Гц, 3H).

ВЭЖХ МС (ESI): Содержание основного вещества 99,62 %, [M + H]⁺ 477, 479. C₂₂H₂₅BrN₂O₃S · HCl.

Тамифлю (осельтамивира фосфат) порошок для приготовления суспензии для приема внутрь получен от Hangzhou HETA Pharm (Ханчжоу, Китай). ВЭЖХ МС (ESI): Содержание основного вещества 99,56 %, [M + H]⁺ 313. C₁₆H₂₈N₂O₄ · H₃PO₄.

Этиловые эфиры 2,4-бис(аминометил)-5-гидрокси-1*H*-индол-3-карбоновых кислот (2a – v), общий способ получения. Нагревают при 70 – 80 °С и при перемешивании 0,357 ммоль 5-гидроксииндола **1**, 0,43 ммоль вторичного амина и 0,43 ммоль формальдегида в виде формалина в 3 мл диоксана в течение 12 – 48 ч. Контроль реакции осуществляют с помощью ВЭЖХ МС. После завершения процесса реакцию массу разбавляют водой, осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из подходящего растворителя или очищают с помощью хроматографии. Получают эфиры **2a – v**, которые переводят в гидрохлориды, для чего основания **2a – v** растворяют в тетрагидрофуране (ТГФ) и прибавляют к полученному раствору при 0 °С 4 М HCl в диоксане. Осадок отделяют и промывают последовательно эфиром, ТГФ, ацетонитрилом, 2-пропанолом, эфиром и сушат в вакууме. Получают соединения **2a – v** в виде гидрохлоридов.

Этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-5-гидрокси-1-метил-6-фтор-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты, дигидрохлорид (2a). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 352. C₁₈H₂₆FN₃O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,64 (уш. с, 1H), 10,14 (уш. с, 1H), 9,23 (уш. с, 1H), 7,80 (д, J 10,6 Гц, 1H), 4,85 (с, 2H), 4,81 (с, 2H), 4,35 (к, J 7,0 Гц, 2H), 3,92 (с, 3H), 2,76 (с, 6H), 2,71 (с, 6H), 1,36 (т, J 7,0 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2-(диметиламинометил)-5-гидрокси-4-(имидазол-1-ил)-1-метил-6-фтор-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты дигидрохлорид (2b). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 375. C₁₉H₂₃FN₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 14,64 (уш. с, 1H), 10,09 (уш. с, 1H), 8,95 (с, 1H), 7,83 (д, J 10,8 Гц, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,61 (с, 1H), 7,57 (с, 1H), 5,92 (с, 2H), 4,81 (с, 2H), 4,29 (к, J 7,2 Гц, 2H), 3,95 (с, 3H), 2,81 (с, 6H), 1,24 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-6-бром-5-гидрокси-1-метил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты дигидрохлорид (2c). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 412, 414. C₁₈H₂₆BrN₃O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,48 (уш. с, 1H), 9,56 (с, 1H), 9,23 (уш. с, 1H), 8,17 (с, 1H), 4,99 (с, 2H), 4,85 (с, 2H), 4,41 (к, J 7,2 Гц, 2H), 3,97 (с, 3H), 2,82 (с, 6H), 2,75 (с, 6H), 1,42 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-5-гидрокси-1-метил-6-циано-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты, дигидрохлорид (2d). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 359. C₁₉H₂₆N₄O₃.

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты (2e) тригидрохлорид. ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 411. C₂₃H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,71 (уш. с, 1H), 9,65 (уш. с, 1H), 9,47 (уш. с, 1H), 9,15 (д, J 2,0 Гц, 1H), 8,87 (д. д, J₁ 5,6 Гц, J₂ 1,0 Гц, 1H), 8,75 (м, 1H), 8,05 (с, 1H), 5,08 (д, J 4,1 Гц, 2H), 4,92 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,1 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,85 (с, 6H), 2,79 (д, J 3,1 Гц, 6H), 1,44 (т, J 7,1 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (75 МГц, D₂O), δ, м.д.: 165,8, 149,2, 147,6, 141,6, 140,0, 138,1, 137,7, 134,1, 127,4, 126,6, 123,1, 115,9, 112,3, 108,2, 62,8, 53,5, 51,9, 43,1, 42,4, 31,2, 13,9.

Этиловый эфир 4-(α-¹³C,β-¹⁵N)-5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2e). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 413, C₂₃H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (D₂O), δ, м.д.: 8,92 (с, 1H), 8,69 (м, 2H), 8,05 (м, 1H), 7,71 (с, 1H), 4,84 (д, J_{C-H} 147 Гц, 2H), 4,76 (с, 2H), 4,38 (к, J 7,0 Гц, 2H), 3,82 (с, 3H), 2,87 (с, 6H), 2,80 (д, J_{C-H} 2,9 Гц, 6H), 1,34 (т, J 7,0 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (75 МГц, D₂O), δ, м.д.: 53,5.

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-1-изопропил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2f). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 439. C₂₅H₃₄N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,32 (уш. с, 1H), 9,58 (уш. с, 1H), 9,37 (уш. с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,87 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,69 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,06 (м, 2H), 5,23 (м, 1H), 5,02 (д, J 4,4 Гц, 2H), 4,93 (с, 2H), 4,45 (к, J 7,2 Гц, 2H), 2,84 (с, 6H), 2,79 (д, J 4,4 Гц, 6H), 1,66 (д, J 6,8 Гц, 6H), 1,44 (д, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-5-гидрокси-1-циклопропил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2g). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 437. C₂₅H₃₄N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,49 (уш. с, 1H), 9,55 (уш. с, 1H), 9,36 (уш. с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,86 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,65 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,04 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,95 (с, 1H), 5,05 (д, J 4,0 Гц, 2H), 4,94 (д, J 4,0 Гц, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 3,79 (м, 1H), 2,87 (д, J 4,0 Гц, 6H), 2,78 (д, J 4,0 Гц, 6H), 2,07 (м, 2H), 1,43 (м, 5H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-6-(пиридин-3-ил)-1-циклогексил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2h). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 479. C₂₈H₃₈N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,22 (уш. с, 1H), 9,55 (уш. с, 1H), 9,33 (уш. с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,88 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,66 (уш. м, 1H), 8,07 (м, 2H), 5,00 (с, 2H), 4,95 (д, J 3,6 Гц, 2H), 4,46 (к, J 7,2 Гц, 2H), 2,85 (с, 6H), 2,78 (д, J 3,6 Гц, 6H), 2,43 (м, 2H), 1,83 (м, 4H), 1,67 (м, 2H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-6-(пиридин-3-ил)-1-фенил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2i). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 473. C₂₈H₃₂N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,94 (уш. с, 1H), 9,57 (с, 1H), 9,40 (уш. с, 1H), 8,91 (с, 1H), 8,74 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,35 (д, J 8,0 Гц, 1H), 7,84 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,70 (м, 3H), 7,63 (м, 2H), 7,12 (с, 1H), 5,16 (д, J 4,0 Гц, 2H), 4,59 (с, 2H), 4,48 (к, J 7,2 Гц, 2H), 2,83 (д, J 4,0 Гц, 6H), 2,63 (с, 6H), 1,45 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-4-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-2-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2j). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 437. C₂₅H₃₂N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,99 (уш. с, 1H), 9,55 (уш. с, 1H), 9,35 (уш. с, 1H), 9,12 (д, J 1,0 Гц, 1H), 8,85 (д. д, J₁ 5,6 Гц, J₂ 1,0 Гц, 1H), 8,66 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,03 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,01 (с, 1H), 5,05 (д, J 3,6 Гц, 2H), 4,98 (д, J 4,0 Гц, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,50 (м, 2H), 3,28 (м, 2H), 2,79 (д, J 3,6 Гц, 6H), 2,06 (м, 2H), 1,97 (м, 2H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-4-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2k). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 437. C₂₅H₃₂N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,56 (уш. с, 1H), 9,74 (уш. с, 1H), 9,55 (с, 1H), 9,13 (с, 1H), 8,85 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,67 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,04 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,01 (с, 1H), 5,14 (д, J 4,4 Гц, 2H), 4,91 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,05 (с, 3H), 3,43 (м, 2H), 3,25 (м, 2H), 2,85 (с, 6H), 2,04 (м, 2H), 1,92 (м, 2H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 4-(1*H*-имидазол-1-илметил)-5-гидрокси-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-2-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2l). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 460. C₂₆H₂₉N₅O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 14,67 (уш. с, 1H), 10,97 (с, 1H), 9,53 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,97 (с, 1H), 8,84 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,65 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,03 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,01 (с, 1H), 7,62 (с, 2H), 6,02 (с, 2H), 4,93 (с, 2H), 4,31 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,49 (уш. м, 2H), 3,27 (уш. м, 2H), 2,05 (уш. м, 2H), 1,97 (уш. м, 2H), 1,26 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 4-(1*H*-имидазол-1-илметил)-5-гидрокси-1-метил-2-морфолинометил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2m). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 476. C₂₆H₂₉N₅O₄. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 14,64 (уш. с, 1H), 11,32 (уш. с, 1H), 9,53 (уш. с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,97 (с, 1H), 8,85 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,66 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,04 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,64 (м, 1H), 7,62 (м, 1H), 6,02 (с, 2H), 4,85 (уш. с, 2H), 4,32 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 3,94 (уш. м, 4H), 3,33 (уш. м, 4H), 1,26 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2-(1*H*-пиразол-1-илметил)-5-гидрокси-4-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты дигидрохлорид (2n). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 434. C₂₄H₂₇N₅O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,44 (уш. с, 1H), 9,12 (с, 1H), 9,10 (уш. с, 1H), 8,85 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,68 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,05 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,80 (д, J 2,4 Гц, 1H), 7,45 (д, J 1,2 Гц, 1H), 6,28 (т, J 2,0 Гц, 1H), 5,91 (с, 2H), 4,98 (д, J 4,2 Гц, 2H), 4,40 (к, J 7,2 Гц, 2H), 3,96 (с, 3H), 2,81 (д, J 4,2 Гц, 6H), 1,36 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 4-(1*H*-имидазол-1-илметил)-5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2o). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 434. C₂₄H₂₇N₅O₃.

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2p). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 411. C₂₃H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,55 (уш. с, 1H), 9,60 (уш. с, 1H), 9,39 (уш. с, 1H), 8,89 (д, J 6,0 Гц, 2H), 8,14 (д, J 6,0 Гц, 2H), 8,02 (с, 1H), 5,07 (с, 2H), 4,91 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,85 (с, 12H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-4-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-2-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2q). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 437. C₂₅H₃₂N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,83 (уш. с, 1H), 9,71 (уш. с, 1H), 9,31 (уш. с, 1H), 8,96 (д, J 6,0 Гц, 2H), 8,29 (д, J 6,0 Гц, 2H), 8,07 (с, 1H), 5,06 (с, 2H), 4,99 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,09 (с, 3H), 3,51 (уш. м, 2H), 3,29 (уш. м, 2H), 2,80 (с, 6H), 2,06 (уш. м, 2H), 1,97 (уш. м, 2H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-2,4-бис(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2r). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 463. C₂₇H₃₄N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,83 (уш. с, 1H), 9,70 (уш. с, 2H), 8,96 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,30 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,06 (с, 1H), 5,14 (с, 2H), 4,99 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 3,50 (уш. м, 4H), 3,27 (уш. м, 4H), 2,05 (уш. м, 4H), 1,95 (уш. м, 4H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 4-(1*H*-имидазол-1-илметил)-5-гидрокси-1-метил-2-(пирролидин-1-илметил)-6-(пиридин-4-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2s). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 460. C₂₆H₂₉N₅O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 14,66 (уш. с, 1H), 11,00 (уш. с, 1H), 9,73 (с, 1H), 8,98 (с, 1H), 8,93 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,27 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,07 (с, 1H), 7,62 (с, 2H), 6,03 (с, 2H), 4,93 (с, 2H), 4,31 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,09 (с, 3H), 3,48 (уш. м, 2H), 3,27 (уш. м, 2H), 2,05 (уш. м, 2H), 1,98 (уш. м, 2H), 1,25 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-4-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2t). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 437. C₂₅H₃₂N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,54 (уш. с, 1H), 9,75 (уш. с, 2H), 8,96 (д, J 6,4 Гц, 2H), 8,30 (д, J 6,4 Гц, 2H), 8,06 (с, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,92 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,43 (уш. м, 2H), 3,26 (уш. м, 2H), 2,86 (с, 6H), 2,04 (уш. м, 2H), 1,92 (уш. м, 2H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 4-(1*H*-имидазол-1-илметил)-5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2u). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 434. C₂₄H₂₇N₅O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 14,66 (уш. с, 1H), 10,49 (уш. с, 1H), 9,74 (с, 1H), 8,97 (с, 1H), 8,94 (д, J 6,8 Гц, 2H), 8,26 (д, J 6,8 Гц, 2H), 8,08 (с, 1H), 7,62 (м, 2H), 6,05 (с, 2H), 4,87 (с, 2H), 4,31 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 2,84 (с, 6H), 1,27 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-4-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2v). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 411. C₂₃H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,55 (уш. с, 1H), 9,92 (уш. с, 1H), 9,39 (уш. с, 1H), 8,89 (д, J 6,4 Гц, 2H), 8,14 (д, J 6,4 Гц, 2H), 8,02 (с, 1H), 6,07 (с, 2H), 4,91 (с, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,85 (с, 12H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2-аминометил-5-гидрокси-1-метил-4-метиламинометил-6-пиридин-3-ил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2w – у), общий способ получения. К раствору гидрохлорида оксадиазиноиндола 3 (1 ммоль) в воде добавляют NH₂OH · HCl (600 мг) и перемешивают полученную смесь 1,5 – 2 ч (ВЭЖХ МС контроль), затем прибавляют концентрированный аммиак и экстрагируют реакционную массу хлороформом. Органический слой промывают водой и сушат безводным Na₂SO₄. Растворитель отгоняют в вакууме, остаток растворяют в ТГФ и прибавляют 8М раствор HCl в диоксане и эфире. Остаток отделяют, промывают эфиром, ацетонитрилом и снова эфиром. Получают продукт 2w – у с выходом 85 – 90 %.

Этиловый эфир 5-гидрокси-2-диметиламинометил-1-метил-4-метиламинометил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2w). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 397. C₂₂H₂₈N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 10,63 (уш. с, 1H), 9,51 (с, 1H), 9,10 (д, J 1,6 Гц, 1H), 8,91 (уш. м, 2H), 8,86 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,68 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,05 (д, д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,03 (с, 1H), 4,90 (с, 2H), 4,74 (т, J 5,2 Гц, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,85 (с, 6H), 2,64 (т, J 5,2 Гц, 3H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-1-метил-4-метиламинометил-6-(пиридин-3-ил)-2-(пирролидин-1-илметил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2x). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 423. C₂₄H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 11,03 (уш. с, 1H), 9,50 (с, 1H), 9,10 (д, J 1,2 Гц, 1H), 8,90 (уш. м, 2H), 8,86 (д, д, J₁ 5,6 Гц, J₂ 1,2 Гц, 1H), 8,68 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,06 (д, д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 4,97 (д, J 4,0 Гц, 2H), 4,73 (т, J 5,2 Гц, 2H), 4,44 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,50 (уш. м, 2H), 3,27 (уш. м, 2H), 2,64 (т, J 5,2 Гц, 3H), 2,06 (м, 2H), 1,98 (м, 2H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-гидрокси-1-метил-4-(метиламинометил)-2-(морфолинометил)-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (2y). ЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 439. C₂₄H₃₀N₄O₄. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 11,41 (уш. с, 1H), 9,49 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 8,90 (уш. м, 1H), 8,86 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,68 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,06 (д, д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 4,90 (уш. с, 2H), 4,72 (м, 2H), 4,45 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,94 (уш. м, 4H), 3,33 (уш. м, 4H), 2,64 (т, J 5,0 Гц, 3H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 6-бром-5-гидрокси-2-(диметиламинометил)-4-(метиламинометил)-1-фенилиндол-3-карбоновой кислоты дигидрохлорид (2z). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 460, 462. C₂₂H₂₆BrN₃O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 9,98 (уш. с, 1H), 9,71 (с, 1H), 8,90 (уш. м, 2H), 7,72 (м, 3H), 7,60 (м, 2H), 7,19 (с, 1H), 4,82 (с, 2H), 4,55 (с, 2H), 4,46 (к, J 7,2 Гц, 2H), 2,62 (с, 9H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 8-(диметиламинометил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновых кислот (3a – I), общий способ получения. Смесь 5-гидроксииндола 1 (20 ммоль), формальдегида (30 мл 37 % водного раствора) и метиламина (150 мл 2 М раствора в ТГФ) кипятят при перемешивании с обратным холодильником 12 ч. Реакционную массу охлаждают, разбавляют 800 мл воды со льдом и перемешивают 1 ч. Осадок отфильтровывают, промывают водой, затем суспендируют в охлажденном изопропанол, перемешивают 1 ч при 5 – 7 °С, отфильтровывают, промывают изопропанолом и сушат в вакууме. Получают оксазиноиндол 3a – I в виде основания с выходом 85 – 95 %. Основание 3a – I растворяют в ТГФ, прибавляют при 0 °С 8 М HCl в диоксане. Реакционную массу выдерживают в холодильнике в течение 12 ч, осадок отфильтровывают и последовательно промывают эфиром, ТГФ, ацетонитрилом, 2-пропанолом, эфиром и сушат. Получают оксазиноиндол 3a – I в виде гидрохлорида.

Этиловый эфир 2,7-диметил-8-(диметиламинометил)-5-фтор-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты гидрохлорид (3a). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 350. C₁₈H₂₄FN₃O₃.

Этиловый эфир 5-бром-2,7-диметил-8-(метиламинометил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты гидрохлорид (3b). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 396, 398. C₁₇H₂₂BrN₃O₃.

Этиловый эфир 5-бром-2,7-диметил-8-(фениламинометил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты гидрохлорид (3c). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 458, 460. C₂₂H₂₄BrN₃O₃.

Этиловый эфир 5-бром-2,7-диметил-8-(диметиламинометил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты гидрохлорид (3d). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 410, 412. C₁₈H₂₄BrN₃O₃.

Этиловый эфир 5-бром-2-метил-8-(пирролидин-1-илметил)-7-циклогексил-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты (3e). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 504, 506. C₂₅H₃₄BrN₃O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 7,77 (с, 1H), 4,83 (с, 2H), 4,52 (м, 1H), 4,27 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,05 (с, 2H), 3,96 (с, 2H), 2,44 (уш. м, 4H), 2,43 (с, 3H), 2,17 (м, 2H), 1,87 (м, 2H), 1,75 (м, 2H), 1,65 (уш. м, 5H), 1,38 (уш. м, 3H), 1,31 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 5-бром-8-диметиламинометил-2-метил-7-фенил-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]-индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (3f). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 472, 474. C₂₃H₂₆BrN₃O₃.

Этиловый эфир 7-бензил-5-бром-8-(1-метилпиперазин-1-илметил)-2-метил-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты тригидрохлорид (3g). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 541, 543. C₂₇H₃₃BrN₄O₃.

Этиловый эфир 2,7-диметил-8-(диметиламинометил)-5-циано-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]-индол-9-карбоновой кислоты гидрохлорид (3h). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 357. C₁₉H₂₄N₄O₃.

Этиловый эфир 2,7-диметил-8-(диметиламинометил)-5-(пиридин-3-ил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (3i). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 409. C₂₃H₂₈N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 10,51 (уш. с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,85 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,64 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,01 (м, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,86 (с, 4H), 4,41 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,92 (с, 2H), 2,85 (с, 6H), 1,44 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,7-диметил-5-(пиридин-3-ил)-8-(пирролидин-1-илметил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (3j). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 435. C₂₅H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 10,96 (уш. с, 1H), 9,11 (с, 1H), 8,84 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,63 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,00 (м, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,92 (д, J 4,4 Гц, 2H), 4,84 (с, 2H), 4,41 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 3,49 (м, 2H), 3,30 (м, 2H), 2,91 (с, 3H), 2,07 (м, 2H), 1,96 (м, 2H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,7-диметил-8-(морфолинометил)-5-(пиридин-3-ил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (3k). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 451. C₂₅H₃₀N₄O₄. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 11,24 (уш. с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,84 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,62 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,00 (м, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,86 (уш. м, 2H), 4,83 (с, 2H), 4,42 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 3,93 (уш. м, 4H), 3,35 (уш. м, 4H), 2,91 (с, 3H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,7-диметил-5-(пиридин-4-ил)-8-(пирролидин-1-илметил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (3l). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 435. C₂₅H₃₀N₄O₃. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 10,92 (уш. с, 1H), 8,97 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,29 (д, J 6,6 Гц, 2H), 8,05 (с, 1H), 5,25 (с, 2H), 4,92 (с, 2H), 4,80 (с, 2H), 4,41 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,09 (с, 3H), 3,50 (уш. м, 2H), 3,31 (уш. м, 2H), 2,06 (уш. м, 2H), 1,96 (уш. м, 2H), 1,43 (т, J 7,2 Гц, 3H).

Этиловый эфир 2,7-диметил-8-(диметиламинометил)-3-оксо-5-(пиридин-3-ил)-1,2,3,7-тетрагидро[1,3]оксазино[5,6-*e*]индол-9-карбоновой кислоты дигидрохлорид (4). К суспензии 5-гидрокси-4-(метиламинометил)индола 2v в ТГФ прибавляют 2-кратное количество *N*-метилморфолина и 1,5-кратное количество карбодимидазола. Реакционную массу перемешивают при 50 °С в течение 30 мин, разбавляют водой, экстрагируют хлороформом, экстракт промывают водой, сушат сульфатом натрия, растворитель отгоняют в вакууме, остаток растворяют в ТГФ и добавляют 8М раствор HCl в диоксане и эфире. Выпавший осадок отделяют, промывают последовательно эфиром, ацетонитрилом и снова эфиром. Получают оксазиноиндол 4 в виде дигидрохлорида с выходом 76 %. ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 423. C₂₃H₂₆N₄O₄. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 11,34 (уш. с, 1H), 9,08 (д, J 1,6 Гц, 1H), 8,86 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,60 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,03 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,99 (с, 1H), 4,96 (с, 2H), 4,87 (с, 2H), 4,41 (к, J 7,2 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 3,94 (уш. м, 4H), 3,34 (уш. м, 4H), 3,05 (с, 3H), 1,42 (т, J 7,2 Гц, 3H).

5-Гидрокси-*N*,2,4-трис(диметиламинометил)-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоксамид тригидрохлорид (6a). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 439. C₂₄H₃₄N₆O₂. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 11,43 (уш. с, 1H), 11,01 (уш. с, 1H), 10,12 (т, J 6,0 Гц, 1H), 9,57 (уш. с, 1H), 9,37 (уш. с, 1H), 9,14 (с, 1H), 8,86 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,72 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,06 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 4,88 (с, 2H), 4,73 (с, 2H), 4,69 (т, J 6,0 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 2,84 (с, 12H), 2,81 (с, 6H).

5-Гидрокси-2,4-бис(диметиламинометил)-*N,N*,1-триметил-6-(пиридин-3-ил)-1*H*-индол-3-карбоксамид тригидрохлорид (6b). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 410. C₂₃H₃₁N₅O₂. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 11,35 (уш. с, 1H), 9,61 (уш. с, 1H), 9,48 (уш. с, 1H), 9,14 (с, 1H), 8,87 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,75 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,10 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,99 (с, 1H), 4,90 (д, J 13,2 Гц, 1H), 4,78 (д, J 14,4 Гц, 1H), 4,28 (д, J 14,4 Гц, 1H), 4,21 (д, J 13,2 Гц, 1H), 4,04 (с, 3H), 3,15 (с, 3H), 2,92 (с, 6H), 2,82 (уш. с, 3H), 2,75 (уш. с, 3H), 2,59 (уш. с, 3H).

Этиловый эфир 2-аминометил-6-гидрокси-1,4-диметил-7-(пиридин-3-ил)-4,5-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3(1*H*)-она дигидрохлорид (7a,b), общий способ получения. Смесь оксазиноиндола 3i, k (1 ммоль), LiOH моногидрата (100 мг), ТГФ (2 мл) и воды (0,5 мл) перемешивают 12 ч, после чего прибавляют уксусную кислоту до нейтрализации LiOH, а затем воду (2 мл). Реакционную массу экстрагируют хлороформом, органический слой промывают водой, сушат сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Остаток растворяют в ТГФ и добавляют 8М раствор HCl в диоксане и эфире. Выпавший осадок отделяют, промывают последовательно эфиром, ацетонитрилом и снова эфиром. Получают пирролоизохинолин-3-(1*H*)-он 7a, b в виде дигидрохлорида с выходом 75 – 80 %.

2-(Диметиламинометил)-6-гидрокси-1,4-диметил-7-(пиридин-3-ил)-4,5-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3(1*H*)-он, дигидрохлорид (7a). ВЭЖХ МС (ESI) [M + H]⁺ 351. C₂₀H₂₂N₄O₂. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 11,26 (уш. с, 1H), 9,38 (уш. с, 1H), 9,03 (с, 1H), 8,82 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,64 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,03 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,64 (с, 1H), 5,02 (с, 2H), 4,78 (с, 2H), 3,91 (с, 3H), 3,11 (с, 3H), 2,88 (с, 6H).

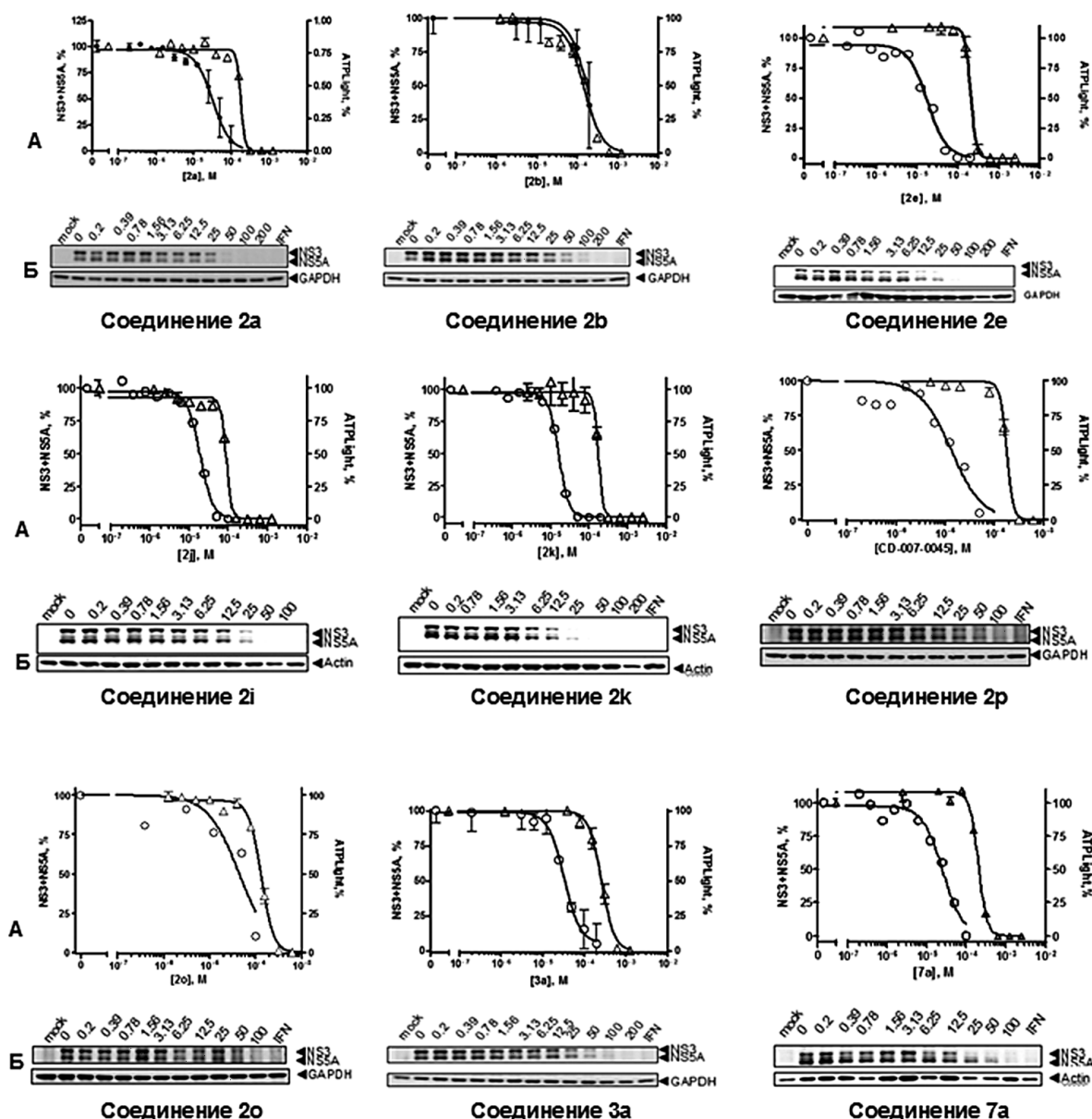


Рис. 1. Концентрационные зависимости (А) анти-НСV активности (○) и цитотоксичности (Δ) синтезированных соединений и белковые полосы (Б), полученные в результате Western Blot анализа.

6-Гидрокси-1,4-диметил-2-(морфолинометил)-7-(пиридин-3-ил)-4,5-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3-(1*H*)-он дигидрохлорид (7b). ВЭЖХ МС (ESI) $[M + H]^+$ 393. $C_{22}H_{24}N_4O_3$. 1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 12,03 (уш. с, 1H), 9,39 (уш. с, 1H), 9,05 (с, 1H), 8,83 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,67 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,05 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 7,66 (с, 1H), 5,02 (с, 2H), 4,82 (с, 2H), 3,96 (уш. м, 2H), 3,94 (с, 3H), 3,87 (уш. м, 2H), 3,47 (уш. м, 2H), 3,32 (уш. м, 2H), 3,12 (с, 3H).

Этиловый эфир 2-диметиламинометил-1,4-диметил-7-(пиридин-3-ил)-1,4-дигидропирроло[4,3,2-*de*]изохинолин-3,6-диона дигидрохлорид (8). Растворяют дигидрохлорид 7a (0,5 моль) в 3 мл воды и прибавляют порциями $FeCl_3$ до завершения реакции (обычно 1,8 – 2,0 г $FeCl_3$, контроль ВЭЖХ МС). К реакционной массе при интенсивном перемешивании прибавляют 4 мл хлороформа и избыток водного аммиака. Реакционную массу фильтруют через селит, остаток на фильтре промывают хлороформом. Органический слой фильтрата отделяют, а водный слой экстрагируют дважды хлороформом. Органические слои объединяют, промывают водой, сушат сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Остаток растворяют в ТГФ и добавляют 8М раствор HCl в диоксане и эфире. Выпавший осадок отделяют, промывают последовательно эфиром, ацетонитрилом и снова эфиром. Получают пирролоизохинолиндион 8 в виде дигидрохлорида с выходом 72 %. ВЭЖХ МС (ESI) $[M + H]^+$ 349. $C_{20}H_{20}N_4O_2$. 1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 11,39 (уш. с, 1H), 9,16 (с, 1H), 8,81 (с, 1H), 8,79 (д, J 5,6 Гц, 1H), 8,74 (д, J 8,0 Гц, 1H), 8,42 (с, 1H), 8,02 (д. д, J₁ 8,0 Гц, J₂ 5,6 Гц, 1H), 4,77 (с, 2H), 4,20 (с, 3H), 3,68 (с, 3H), 2,86 (с, 6H).

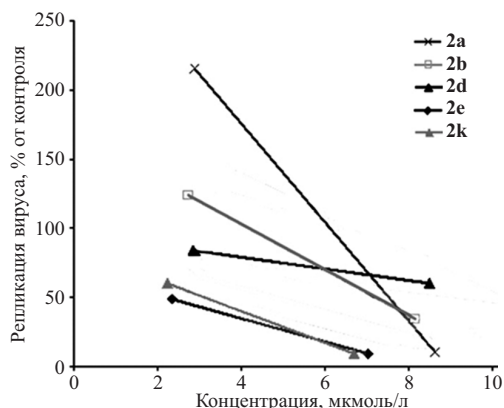


Рис. 2. Концентрационные зависимости эффективности репликации вируса HCV в присутствии тестируемых соединений в ИФА.

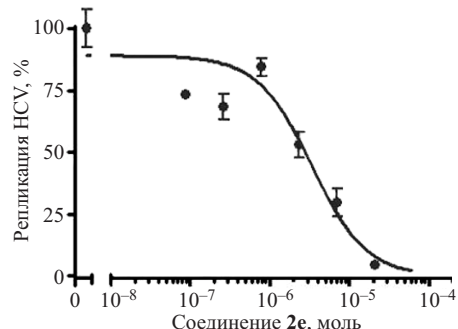


Рис. 3. Зависимость репликации вируса HCV от концентрации **2e** в условиях ИФА.

Экспериментальная биологическая часть

In vitro гепатотоксичность синтезированных соединений определяли по методике, описанной в работе [5], по способности вызывать гибель первичных человеческих гепатоцитов (Life Technologies, USA) в клеточной культуре. Гепатоциты разливали в лунки 96-луночной плашки (20000 клеток на лунку) и инкубировали 1 сут при 37 °С в инкубаторе при 100 % влажности в атмосфере 5 % O₂/95 % CO₂. После суточной инкубации в лунки добавляли соединения при разных концентрациях (от 100 до 0,1 мкМ с полулогарифмическим шагом) для определения их гепатотоксичности. Гепатоциты в среде с соединениями оставляли на 48 ч в тех же условиях инкубации. После инкубации количество живых клеток определяли с помощью флуоресцентного теста Аламар Голубой в соответствии с руководством производителя (Life Technologies, USA). В таблице представлены данные по клеточной гепатотоксичности арбидола и некоторых из синтезированных соединений.

Противовирусная активность синтезированных соединений в отношении вируса бычьей диареи (Bovine Viral Diarrhea Virus – BVDV) исследована в культуре клеток почки быка (Madin Darby Bovine Kidney – MDBK), инфицированных штаммом NADL (ATCC) BVDV, с использованием методики, описанной в работах [1, 6]. Всего готовилось 8 серийных трехкратных разведений с концентрацией от 0,05 мкмоль/л до 100 мкмоль/л. В качестве стандарта использовали нуклеозидный ингибитор 2'-С-метилцитозин [7]. В таблице представлены EC₅₀ и CC₅₀, полученные в результате испытаний стандарта, арбидола и некоторых новых соединений.

Противовирусная активность соединений по отношению к РНК репликону HCV. Активность синтезированных соединений по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7, содержащей субгеномный РНК-репликон HCV (генотипы 1a, clone Con1), определяли с использованием методики, описанной в работах [1, 7 – 10]. Цитотоксичность испытуемых веществ оценивали в параллельном режиме на культуре линии клеток гепатомы человека Huh7, как описано в работе [1]. Результаты испытаний представлены в таблице.

Цитотоксичность и противовирусная активность соединений по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3 методом Western Blot. Определение противовирусной активности синтезированных соединений проводили на клеточной линии гепатомы человека (Huh7.3), обладающей повышенной чувствительностью к заражению вирусом гепатита С [8]. Клетки культивировали в модифицированной среде Eagle-Dulbecco (DMEM), содержащей 9 % сыворотки теленка и 1 % заменимых аминокислот. В каждую лунку 6-луночной плашки добавляли клетки в количестве 200 000 клеток на лунку и оставляли на 1 сут, после чего к клеткам добавляли тестируемые соединения в различных концентрациях. Клетки выдерживали с тестируемыми соединениями в течение 24 ч, после чего добавляли вирус гепатита С штамма JFH-1 (генотип 2a), как описано в работе [9]. Инкубировали в течение 72 ч при 37 °С. После окончания инкубации клеточную среду удаляли, клетки лизировали буфером, содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 7,2), 150 мМ NaCl, 0,1 % додецилсульфат натрия, 0,1 % дезоксихолат натрия, 1 % раствора Triton X-100 и 17,4 г/мл раствора PMSF. Содержание белка количественно определяли с использованием методики BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, США). До нанесения образца на гель концентрацию каждого образца корректировали так, чтобы в каждую лунку геля вносилось 10 мкг белка. Образцы перемешивали с равным объемом восстанавливающего буфера, нагревали при 95 °С в течение 7 мин и затем подвергали электрофорезу в 4 – 20 % трис-глициновом буфере (Invitrogen, США). Разделенные белки переносили на 0,45 мкМ нитроцеллюлозную мембрану (Pierce, США), используя систему полусухого переноса. После переноса мембраны блокировали буфером Superblock (Pierce, США) и инкубировали с первичными мышиными антителами, специфичными к вирусным белкам NS5A (Bioscience International, США; разбавление 1:1000) и кор-антигену (Affinity Bioreagents, США; разбавление 1:1000), и дополнительно выдерживали при

комнатной температуре в течение 1 ч. Затем мембраны выдерживали со вторичными антителами к мышинным иммуноглобулинам (IgG), конъюгированным с пероксидазой хрена (Pierce, США; разбавление 1:10000). Белковые полосы проявляли, используя хемилюминесцентный реагент LumiGlo (Cell Signaling, США) и экспозицию мембран с рентгеновской пленкой. Количественный анализ белковых полос проводили, используя программный пакет ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij>].

Цитотоксичность синтезированных соединений определяли при помощи МТТ-теста в соответствии с методикой работы [11]. Клетки распределяли по 96-луночной плате и затем добавляли тестируемые соединения. Инкубировали платы в течение 72 ч при 37 °С. Добавляли в каждую лунку раствор МТТ (10 мкл/лун, 5 мг/мл раствор) и инкубировали платы дополнительно в течение 4 ч при 37 °С. После окончания инкубации добавляли 100 мкл/лун солибилизирующего буфера (0,01N HCl, 10 % додецилсульфата натрия). Появившееся окрашивание регистрировали при помощи спектрофотометра при длине волны 570 нм. Цитотоксичность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{Toxicity} = \frac{\text{OD}_{570}^0 - \text{OD}_{570}^{\text{cpd}}}{\text{OD}_{570}^0} \cdot 100,$$

где OD_{570} — оптическая плотность, измеренная при 570 нм; верхний индекс обозначает контрольные клетки (0) или клетки в присутствии тестируемого соединения (cpd).

Противовирусная активность и клеточная гепатотоксичность^a синтезированных соединений

Соединение	<i>In vitro</i> гепатотоксичность	BVDV			Репликон HCV		HCV в Huh7.3 (Western Blot)			А/Новая Ка-ледония/20/99 (H1N1)	А/Аичи/2/69 (H3N2)
		EC ₅₀	EC ₅₀ ^b	CC ₅₀ ^c	EC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	TI ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀
Контроль (2'-С-метилцитозин)	1,2	> 100	...	0,59**	> 100**
Арбидол	3,0	> 16,1	16,1	11,9	13,6	3,9	18,9	5	8,0	12,9	
2a	8,5	19,6	171,1*	9	...	3,5	
2b	32,0*	246,5*	8	
2c	> 100*	
2d	> 100*	100*	100,0*	1	
2e	> 100*	> 48	48	11,9	220,4*	18,5	2,0	13,3	
2j	53,9*	> 24	24	45	88*	12,3	84,9	7	2,3	...	
2k	85,6*	> 25	25	74*	> 100*	8,6	172,6*	20	3,4	...	
2o	...	> 56	56	52,8*	133,3*	3	
2p	15,1	176,8*	12	
2u	31,9*	99,1*	3	
2w	8,2	...	
2x	3,0	...	
2y	16,0	...	
3a	32,5*	177,9*	5	
3c	...	> 42,2	42,2	17,5	17,6	4,0	...	
3e	...	> 20	20	34,5	38,8	
3f	...	> 20,2	20,2	53,5	58,7	18,7	...	
3g	...	> 26,7	26,7	13,1	16,1	10,4	...	
3h	...	> 16	16	100*	
3i	...	> 16	16	46	100*	7,0	92,8	13	
3j	14,3	120,7*	8	6,33	...	
3k	> 10	
6b	28,9	
7a	41,5*	214,4*	5	
8	61,6*	81,3*	1*	

^a Клеточную гепатотоксичность определяли в суспензии первичных человеческих гепатоцитов. Измерения производились в 3 независимых экспериментах (каждый в триплетах).

* Статистически значимые различия активности соединений по отношению к арбидолу ($\Delta pEC_{50} > 1,68\sigma$).

^b Концентрация (мкМ) соединения, которая вызывает эффект, равный половине максимального возможного.

^c Концентрация (мкМ), при которой гибнут 50 % клеток.

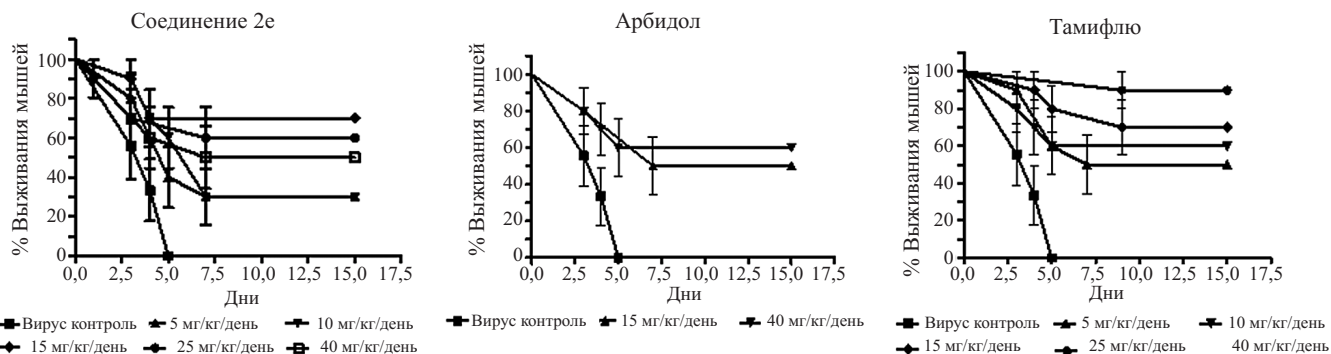


Рис. 4. Выживаемость мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2), при пероральном введении соединения **2e**, арбидола и тамифлю. Средняя продолжительность жизни мышей в группе вирусного контроля составила 4,4 дня, в случае соединения **2e** — 7,9 дней при дозе 5 мг/кг/день, 8,3 дня при дозе 10 мг/кг/день, 11,6 дней при дозе 15 мг/кг/день, 11,5 дня при дозе 25 мг/кг/день и 8,5 дней при дозе 40 мг/кг/день, в случае арбидола — 10,3 дня при дозе 15 мг/кг/день и 10,6 дня при дозе 40 мг/кг/день, в случае тамифлю — 10,4 дня при дозе 5 мг/кг/день, 10,6 дня при дозе 10 мг/кг/день, 12,5 дня при дозе 15 мг/кг/день и 14,5 дня при дозе 25 мг/кг/день.

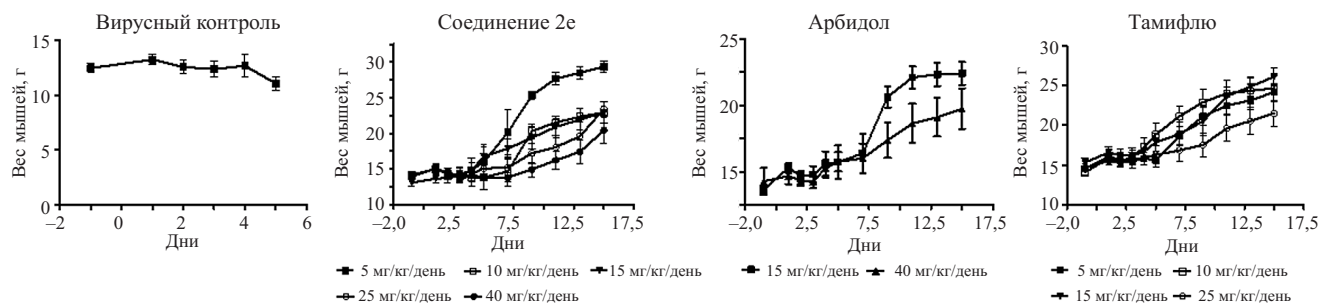


Рис. 5. Изменение веса мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2), при пероральном введении соединения **2e**, арбидола и тамифлю.

На основании результатов исследования анти-HCV активности синтезированных соединений методом Western Blot и цитотоксичности в опытах *in vitro* получены белковые полосы и кривые концентрационной зависимости анти-HCV активности соединений (рис. 1), из которых найдено значение EC_{50} и рассчитаны терапевтические индексы, представленные в таблице.

Противовирусная активность синтезированных соединений на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV. Определение активности соединений в отношении HCV проводили на культуре клеток Huh7 с использованием иммунного *in vitro* метода иммуноферментного анализа (ИФА) на кор-антиген вируса HCV. Измеряли эффективность ингибирования тестируемыми соединениями продукции антигена (репликации вируса) в клетках, инфицированных вирусом JFH-1. Используемая в данном эксперименте культура клеток Huh7 способна, будучи инфицированной HCV, поддерживать полный цикл вирусной репликации. Рекомбинантный вирус JFH-1 HCV, использованный в эксперименте, был получен трансфекцией клеток Huh7 РНК JFH-1, полученной транскрипцией *in vitro*. Используемая матричная ДНК для транскрипции синтезирована химически исходя из ДНК JFH-1 (NCBI, каталожный номер AB047639 [12]).

Клетки Huh7 были высеяны в 96-луночные платы ($3,0 \cdot 10^3$ клеток на 1 лунку) в среде Huh-7 (50 мкл на каждую лунку). Для каждого тестируемого соединения приготовили 9 растворов в среде Huh-7 в диапазоне концентраций 0,09 – 200 мкМ. Спустя 4 ч после высевания клеток исходный раствор был удален при помощи аспирации, после чего к каждой лунке добавили 50 мкл раствора тестируемого соединения, а также 50 мкл препарата JFH-1 HCV. Таким образом, финальные концентрации тестируемых соединений находились в диапазоне 0,045 – 100 мкмоль/л. В случае необходимости этап инфицирования проводили спустя 24 ч после добавления тестируемых соединений. После инкубации в течение 16 ч вирусная среда была удалена при помощи аспирации, и к культурам были добавлены тестируемые соединения в исходных концентрациях до конечного объема 200 мкл. Клетки и тестируемые соединения инкубировали дополнительно в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере воздуха, содержащей 5 % углекислого газа CO_2 . После удаления питательной среды клетки зафиксировали выдерживанием в 250 мкл смеси ацетон — метанол (1:1) в течение 1 мин. Затем клетки промывали фосфатным буфером (буфер PBS) и трижды — промывочным раствором 1X (KPL “Kirkguard Perry Laboratories”). Далее клетки блокировали 10 % раствором FBS-TNE (150 мкл/лун) в течение 1 ч при комнатной температуре. Промы-

вали каждую лунку троекратно промывочным раствором 1X KPL, затем инкубировали с моноклональными мышиными антителами к кор-антигену HCV (Affinity BioReagents, каталожный номер MA1 – 080), растворенными в буфере FBS-TNE (100 мкл/лун раствора, приготовленного из исходного концентрата, разведенного в соотношении 1:500 в 10 % FBS-TNE), в течение 2 ч при 37 °С. Промывали каждую лунку троекратно промывочным раствором 1X KPL, затем инкубировали с антителами, специфичными к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP, 100 мкл/лун раствора, приготовленного из исходного концентрата, разведенного в соотношении 1:2500 в 10 % FBS-TNE) в течение 1 ч при 37 °С. Промывали каждую лунку троекратно промывочным раствором 1X KPL, затем обрабатывали 100 мкл/лун раствора OPD (приготовлен раствором 1 таблетки OPD в 12 мл цитрат-фосфатного буфера с добавлением 5 мкл 30 % H₂O₂) в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением к каждой лунке 100 мкл 2N H₂SO₄, после чего измеряли поглощение при длине волны 490 нм. Величину EC₅₀ — концентрацию тестируемого соединения, при которой репликация вируса понижается вдвое, определяли для каждого тестируемого соединения при помощи программы Xlfit по методу, описанному в работе [12]. Результаты испытаний соединений в условиях ИФА представлены на рис. 2, а на рис. 3 показана зависимость эффективности репликации вируса HCV от концентрации наиболее активного в вышеописанном иммунном тесте соединения **2e**.

Противовирусную активность синтезированных соединений в отношении вирусов гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2) определяли методом ИФА в культуре клеток MDCK по методике, описанной в работах [1, 13]. Для одной точки каждого опыта использовали 3 повторности. Всего готовили 8 – 10 серийных трехкратных разведений с концентрацией от 0,05 до 100 мкмоль/л. Для одной точки этого опыта использовали 4 повторности. Отклонения от среднего значения не составляли больше 10 – 15 %. На основании полученных результатов строили кривую доза — ответ, из которой определяли EC₅₀. В таблице представлены данные EC₅₀ наиболее активных новых соединений.

Эффективность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей. Изучение эффективности соединения **2e** в сравнении с препаратами арбидол и тамифлю проводили на модели гриппозной пневмонии мышей (самки нелинейные, средняя масса 12 – 15 г), интраназально инфицированных под легким эфирным наркозом вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) (10ЛД₅₀ в 50 мкл) по методике, описанной в [14]. Соединения в дозах 5, 10, 15, 25 и 40 мг/кг/день вводили мышам перорально за 24 ч до инфицирования, за 1 ч до инфицирования, через 24 ч и далее 1 раз в день в течение 5 дней. Для перорального введения использовали одноразовый инсулиновый шприц со специальной иглой (лаваж). В группах контроля вируса и в группах, леченных соединением **2e**, арбидолом и тамифлю, было по 10 мышей. За животными велось ежедневное наблюдение, в первые 5 дней после инфицирования мышей взвешивали каждый день, далее — через день. Химиотерапевтическую активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по 3 критериям: показатель защиты от смертельной вирусной инфекции, изменение массы и средней продолжительности жизни животных. Среднюю продолжительность жизни мышей рассчитывали по формуле: $MSD = \sum f(d - 1)/n$, где f — количество мышей, умерших на день d , выжившие мыши также включены в f и d в этом случае равно 16, n — количество мышей в группе. Уменьшение или увеличение веса рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах. При этом за 100 % принимался вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение процента потери или увеличения веса. Полученные данные представлены на рис. 4 и 5.

Результаты и их обсуждение

Исследование противовирусной активности новых 2,4-бис-диаминометил-1H-индолов **2** и их производных **3** показало (таблица), что они, как и изученные нами ранее 2- и 4-аминометил-1H-индолы [1], не активны в отношении BVDV.

Синтезированные соединения также не ингибируют HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7, несущей субгеномный HCV РНК репликон (генотип 1b, клон Con1). Вместе с тем они проявили заметную активность по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3 с повышенной чувствительностью к заражению HCV в условиях метода Western Blot в микромолярных концентрациях (таблица, рис. 1).

В исследованном ряду соединений наиболее активными (EC₅₀ ≤ 15 мкмоль) по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3 оказались 2,4-бис-диаминометил-1H-индолы **2e**, **j**, **k**, **p** и оксазиноиндолы **3i**, **j**, а среди них наиболее перспективными являются 2,4-бис-диаминометил-1H-индолы **2e** и **2k**, так как они имеют низкую цитотоксичность и наиболее широкий терапевтический интервал. Так 2,4-бис-диаминометил-1H-индолы **2e** имеет значение CC₅₀ = 220,4 мкмоль и TI₅₀ = 18,5, а 2-пирролидин-1-илметил-4-диметиламинметил-1H-индол **2k** — CC₅₀ = 172,6 мкмоль и TI₅₀ = 20. Следует отметить, что эти соединения **2e**, **k** имеют также низкую гепатотоксичность (таблица), причем гепатотоксичность соединения **2e** (EC₅₀ > 100 мкмоль) несколько ниже гепатотоксичности соединения **2k** (EC₅₀ = 85,6 мкмоль).

В сопоставимых условиях была изучена активность арбидола (таблица) по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3, который оказался активнее (EC₅₀ = 3,9 мкмоль), чем соединения **2e**, **k**. Однако

его токсичность на порядок выше ($CC_{50} = 18,9$ мкмоль), чем у этих соединений с очень высокой гепатотоксичностью ($EC_{50} = 3$ мкмоль), сопоставимой с его активностью по отношению к HCV.

На рис. 2 и 3 показаны зависимости эффективности репликации вируса HCV от концентрации соединений в вышеописанном тесте ИФА. Как видно из рис. 2, соединение **2e** является наиболее активным в отношении HCV. Близкую активность демонстрирует соединение **2k**, что согласуется с активностью этих соединений, определенной с использованием метода Western Blot (таблица).

Данные концентрационной зависимости по результатам теста ИФА (рис. 3) позволили определить величину 50 % ингибирования вируса HCV соединения **2e**, которая составила $EC_{50} = 2,2$ мкмоль. Учитывая представленную выше цитотоксичность соединения **2e** $CC_{50} = 220$ мкмоль/л (таблица), терапевтический индекс, рассчитанный по формуле $TI = CC_{50}/EC_{50}$, имеет значение 100.

Заметим, что отсутствие активности исследуемых соединений **2, 3** по отношению к репликону HCV и наличие у них активности по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3 в условиях Western Blot анализа и в тесте ИФА дает основание предположить, что эти соединения относятся к новому классу ингибиторов HCV, блокирующих раннюю стадию вирусной инфекции (интернализацию), следующую непосредственно за стадией первичной адсорбции на клеточной мембране.

Также установлено, что некоторые из синтезированных соединений обладают противовирусной активностью ($EC_{50} < 20$ мкмоль, табл. 1) в отношении вируса гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1). Наиболее активным из испытанных соединений является 2,4-бис-диметиламинометил-6-пиридин-3-ил-1H-индол **2e** ($EC_{50} = 2$ мкмоль), которое в исследованных условиях в 4 раза активнее арбидола ($EC_{50} = 8$ мкмоль). В отношении вируса гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) активность этих соединений близка и соответствуют $EC_{50} = 13,3$ мкмоль для соединения **2e** и $EC_{50} = 12,9$ мкмоль для арбидола. Отметим, что наиболее активным в отношении вируса гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) оказался 2,4-бис-диметиламинометил-6-фтор-1H-индол **2a** ($EC_{50} = 3,5$ мкмоль). Однако это соединение проявило и наиболее высокую гепатотоксичность ($EC_{50} = 8,5$ мкмоль).

Для изучения эффективности на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2), было выбрано соединение **2e** и препараты сравнения арбидол и тамифлю (рис. 4).

Установлено, что в группе вирусного контроля все инфицированные мыши погибли в течение 5 дней. В то же время выживаемость инфицированных мышей на 5 день при пероральном введении соединения **2e** в дозе 5 мг/кг/день составила 40 %, в дозе 10 мг/кг/день — 60 %, в дозе 15 мг/кг/день — 70 %, в дозе 25 мг/кг/день — 67 % и в дозе 40 мг/кг/день — 55 %. Арбидол на 5 день в дозе 15 мг/кг/день обеспечил 65 % выживаемость мышей, а в дозе 40 мг/кг/день — 50 %. Наиболее эффективным оказался тамифлю, который в дозе 5 мг/кг/день и 10 мг/кг/день защитил от гибели 60 % мышей, в дозе 15 мг/кг/день — 80 %, а в дозе 25 мг/кг/день — 95 % (рис. 5).

Соединение **2e** на 15 день обеспечило максимальную эффективность 70 % в дозе 15 мг/кг/день. В этой дозе тамифлю также имел эффективность 70 %, в то время как арбидол только 50 %. Увеличение дозы соединения **2e** до 25 мг/кг/день и 40 мг/кг/день на 15 день сопровождается снижением эффективности соответственно до 60 и 50 %, в то время как повышение дозы тамифлю до 25 мг/кг/день сопровождается заметным повышением эффективности до 90 %, а повышение дозы арбидола до 40 мг/кг/день обеспечивает повышение его эффективности до 60 %.

Средняя продолжительность жизни мышей, леченных соединением **2e** в дозах 5, 10 и 40 мг/кг/день (соответственно 7,9, 8,3 и 8,5 дней) почти в 2 раза превысила продолжительность жизни мышей (4,4 дня) в группе вирусного контроля. Максимальная продолжительность жизни мышей была достигнута в группах, получавших дозы 15 и 25 мг/кг/день (соответственно 11,6 и 11,5 дней). Отметим, что соединение **2e** более эффективно, чем арбидол, который обеспечил среднюю продолжительность жизни мышам 10,3 дня при дозе 15 мг/кг/день и 10,6 дня при дозе 40 мг/кг/день, и уступает по активности тамифлю, который обеспечил продолжительность жизни мышам 12,5 дней при дозе 15 мг/кг/день и 14,5 дня при дозе 25 мг/кг/день.

Следует также отметить, что, если в группе вирусного контроля максимальная потеря веса 13 % наблюдалась на 5 день, то в группах, принимавших соединение **2e**, арбидол и тамифлю, потеря веса практически не наблюдалась (рис. 5).

Установлено, что ряд синтезированных соединений в микромолярных концентрациях проявляет активность в отношении HCV и вирусов гриппа. Особенно интересным является соединение, проявившее не только максимальную активность и низкую токсичность в отношении HCV, но и высокую эффективность при профилактике и лечении мышей, предварительно инфицированных вирусом гриппа А/Аичи/2/69.

В следующих работах мы более подробно рассмотрим фармакологию и токсикологию перспективного противовирусного соединения **2e**, полученную в результате его доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Иващенко, П. М. Яманушкин, О. Д. Митькин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(12), 13 – 28 (2013); *Pharm. Chem. J.*, **47**(12), 636 – 650 (2014).
2. А. Н. Гринев, В. И. Шведов, Е. К. Панишева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **4**(1), 26 – 32 (1970); *Pharm. Chem. J.*, **4**(1), 25 – 29 (1970).

3. А. Н. Гринев, Е. К. Панишева, А. А. Черкасова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **21**(1), 52 – 55 (1987); *Pharm. Chem. J.*, **21**(1), 48 – 51 (1987).
4. Ф. А. Трофимов, Н. Г. Цишкова, С. А. Зотова, А. Н. Гринев, *Хим.-фарм. журн.*, **27**(1), 70 – 71 (1993); *Pharm. Chem. J.*, **27**(1), 75 – 76 (1993).
5. M. R. Slaughter, P. J. Bugelski, P. J. O'Brien, *Toxicol. in Vitro*, **13**(4 – 5), 567 – 569 (1999).
6. M. R. Romero, M. A. Serrano, M. Vallejo, et al., *Planta Med.*, **72**(13), 1169 – 1174 (2006).
7. D. R. Hwang, Y. S. Wu, C. W. Chang, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(1), 83 – 91 (2006).
8. R. Bartenschlager, T. Pietschmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(28), 9739 – 9740 (2005).
9. J. Zhong, P. Gastaminza, G. Cheng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9294 – 9299 (2005).
10. T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, et al., *Gastroenterology*, **125**, 1808 – 1817 (2003).
11. A. P. Wilson, *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3rd ed., Masters J. R. W. (ed.), Oxford University Press, Oxford, 1, 175 – 219 (2000).
12. T. Wakita, *Nature Medicine*, **11**, 791 – 796 (2005).
13. С. А. Зотова, Т. М. Корнеева, В. И. Шведов и др. *Хим.-фарм. журн.*, **29**(1), 51 – 53 (1995); *Pharm. Chem. J.*, **29**(1), 57 – 59 (1995).
14. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, Миронов А. Н., Буна-тян Н. Д. и др. (ред.), Министерство здравоохранения и соцразвития, ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Москва (2012).

Поступила 23.09.13

SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF SUBSTITUTED 2,4-BIS-AMINOMETHYL-5-HYDROXY-1H-INDOLE-3-CARBOXYLIC ACID ETHYL ESTERS AND THEIR DERIVATIVES

A. V. Ivashchenko^{1,2,3*}, P. M. Yamanushkin¹, O. D. Mit'kin¹, V. M. Kisil², O. M. Korzinov^{1,4}, V. Yu. Vvedenskiy², I. A. Leneva⁵, E. A. Bulanova¹, V. V. Bychko², I. M. Okun², A. A. Ivashchenko¹, and Ya. A. Ivanenkov¹

¹ Department of Organic Chemistry, Chemical Diversity Research Institute, Khimki, Moscow Region, 114401 Russia

² ChemDiv Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, United States

³ ASAVI Co., Hallandale Beach, FL 33009, United States

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700, Russia

⁵ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Science, Moscow, 105064 Russia

* e-mail: ChemDiv@chemdiv.com.

We have synthesized a series of substituted ethyl esters of 2,4-bis-aminomethyl-5-hydroxy-1H-indole-3-carboxylic acids and 8-aminomethyl-2-methyl-2,3-dihydro-1H,7H-[1,3]oxazino[5,6-*e*]indole-9-carboxylic acids and previously unreported 4,5-dihydro-1H-pyrrolo[4,3,2-*de*]isoquinolin-3-ones and 1,4-dihydropyrrolo[4,3,2-*de*]isoquinolin-3,6-diones. The cytotoxicity and antiviral activity of these compounds against bovine viral diarrhoea (BVDV), hepatitis C virus (HCV), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), and A/Aichi/2/69 (H3N2) viruses have been studied *in vitro*. Among all compounds studied, only two compounds – ethyl 5-hydroxy-2-(dimethylaminomethyl)-1-methyl-6-pyridine-3-yl-1H-indole-3-carboxylate and 5-hydroxy-2-(dimethylaminomethyl)-1-methyl-6-fluoro-1H-indole-3-carboxylate were significantly active against influenza A/Aichi/2/69 (H3N2) virus. In particular, 2,4-bis-dimethylaminomethyl-6-pyridin-3-yl-1H-indole (2e) not only had micromolar activity against HCV and influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) and A/Aichi/2/69 (H3N2) *in vitro*, but was also highly active in mice infected with A/Aichi/2/69 (H3N2) influenza virus. This compound was found to be more active than arbidol, when administered at a dose of 15 – 25 mg/kg/day.

Keywords: 2-aminomethyl-5-hydroxy-1H-indole-3-carboxylic acids; 8-aminomethyl-2-methyl-1,2,3,7-tetrahydro[1,3]oxazino[5,6-*e*]indole-carboxylic acids; 4,5-dihydro-1H-pyrrolo[4,3,2-*de*]isoquinolin-3-ones; 1,2-dihydro-pyrrolo[4,3,2-*de*]isoquinolin-3,6-diones-ones; hepatotoxicity; anti-influenza activity; A/Aichi/2/69 (H3N2) virus; BVDV; HCV