



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11)**2 734 495** (13) **C1**

(51) МПК

A61K 31/404 (2006.01)*A61K 31/4178* (2006.01)*A61K 31/422* (2006.01)*A61K 31/4427* (2006.01)*A61K 31/454* (2006.01)*A61K 31/497* (2006.01)*A61K 31/4439* (2006.01)*A61K 31/5355* (2006.01)*A61K 31/5377* (2006.01)*A61K 31/541* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

A61K 31/404 (2020.02); *A61K 31/4178* (2020.02); *A61K 31/422* (2020.02); *A61K 31/4427* (2020.02); *A61K 31/454* (2020.02); *A61K 31/497* (2020.02); *A61K 31/4439* (2020.02); *A61K 31/5355* (2020.02); *A61K 31/5377* (2020.02); *A61K 31/541* (2020.02); *A61P 3/10* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019128937, 13.09.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.09.2019Дата регистрации:
19.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.09.2019

(45) Опубликовано: 19.10.2020 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

119234, Москва, ул. Ломоносовский проспект,
27, стр. 1, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Фонд
"Национальное интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Лозинская Наталья Александровна (RU),
Зарянова Екатерина Витальевна (RU),
Бабков Денис Александрович (RU),
Клочков Владлен Геннадьевич (RU),
Спасов Александр Алексеевич (RU),
Ефремов Александр Михайлович (RU),
Безсонова Елена Николаевна (RU),
Цымляков Михаил Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)

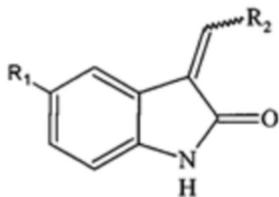
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2015/0038543 A1, 05.02.2015.

ЛУЦЕНКО Л.А. Роль гликированного
гемоглобина в диагностике и мониторинге
сахарного диабета. Почки 2014 N4 (10): 7-11.
WO 96/40116 A1, 19.12.1996. EP 2886541 A1,
24.06.2015. US 2015/0045395 A1, 12.02.2015. US
2003/0176487 A1, 18.09.2003. KHAN M et al.
Discovery of novel oxindole derivatives as potent
alpha- (см. прод.)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины.
Предложен способ лечения сахарного диабета
второго типа, обеспечивающий снижения уровня
глюкозы в организме, включающий введение
субъекту терапевтически эффективного
количества арилиден-2-оксиндола общей
формулы (I)



(I)

где R1 выбран из H, нитро, галоген, C1-C4-алкокси, NH(CO)C1-C4-алкил, NH(CO)OC1-C4-алкил, NH(CO)C5-C6-арил, R2 означает C5-C6-

арил или C5-C6-гетероарил, содержащий одну или несколько используемых в сочетании друг с другом групп, выбранных из H, OH, нитро, галоген, C1-C4-алкокси, где C5-C6-гетероарил означает 5-6-членный арил с 1 или 2 гетероатомами, выбранными из группы O, N, S. Изобретение обеспечивает более эффективное снижение концентрации глюкозы в крови за счет воздействия одновременно на GSK3 β и на α -глюкозидазу, т.е. за счет одновременного воздействия на два механизма снижения концентрации глюкозы. 6 з.п. ф-лы, 2 табл., 25 пр., 2 ил.

(56) (продолжение):

glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2014 Jul 1; 22(13): 3441-8 ;[on line] [Найдено 24.01.2020] (Найдено из интернет:;www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825482).

R U
2 7 3 4 4 9 5
C 1
5 6 4 4 9 5

R U
2 7 3 4 4 9 5
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 734 495** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006.01)*A61K 31/4178* (2006.01)*A61K 31/422* (2006.01)*A61K 31/4427* (2006.01)*A61K 31/454* (2006.01)*A61K 31/497* (2006.01)*A61K 31/4439* (2006.01)*A61K 31/5355* (2006.01)*A61K 31/5377* (2006.01)*A61K 31/541* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/404 (2020.02); *A61K 31/4178* (2020.02); *A61K 31/422* (2020.02); *A61K 31/4427* (2020.02); *A61K 31/454* (2020.02); *A61K 31/497* (2020.02); *A61K 31/4439* (2020.02); *A61K 31/5355* (2020.02); *A61K 31/5377* (2020.02); *A61K 31/541* (2020.02); *A61P 3/10* (2020.02)

(21)(22) Application: 2019128937, 13.09.2019

(24) Effective date for property rights:
13.09.2019Registration date:
19.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: 13.09.2019

(45) Date of publication: 19.10.2020 Bull. № 29

Mail address:

119234, Moskva, ul. Lomonosovskij prospekt, 27,
str. 1, Moskovskij gosudarstvennyj universitet
imeni M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe
intellektualnoe razvitie"

(72) Inventor(s):

Lozinskaya Natalya Aleksandrovna (RU),
Zaryanova Ekaterina Vitalevna (RU),
Babkov Denis Aleksandrovich (RU),
Klochkov Vladlen Gennadevich (RU),
Spasov Aleksandr Alekseevich (RU),
Efremov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Bezsonova Elena Nikolaevna (RU),
Tsymlyakov Mikhail Dmitrievich (RU)

(73) Proprietor(s):

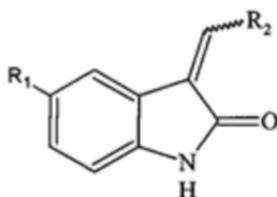
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)

(54) METHOD OF TREATING DIABETES MELLITUS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine.
Disclosed is a method of treating type 2 diabetes
mellitus, providing a glucose level reduction in a body,
comprising administering to a subject a therapeutically
effective amount of arylidene-2-oxindole of general
formula (I)



(I)

where R1 is selected from H, nitro, halogen, C1-C4-alkoxy, NH(CO)C1-C4-alkyl, NH(CO)OC1-C4-alkyl, NH(CO)C5-C6-aryl, R2 is C5- C6-aryl or C5-C6-heteroaryl containing one or more groups used in combination with each other, selected from H, OH, nitro, halogen, C1-C4-alkoxy, where C5-C6-heteroaryl means 5-6-member aryl with 1 or 2 heteroatoms selected from group O, N, S.

EFFECT: invention provides more effective reduction of blood glucose concentration by simultaneously exposing GSK3 β and α -glucosidase, that is due to simultaneous action on two glucose concentration reduction mechanisms.

7 cl, 2 tbl, 25 ex, 2 dwg

Область техники

Изобретение относится к областям органической химии, а именно химии гетероциклических соединений, медицинской химии и фармакологии. Предлагаемые соединения обладают способностью снижать уровень глюкозы в организме и могут
5 найти применение при лечении диабета второго типа.

Уровень техники

Несмотря на значительные успехи в области создания гипогликемизирующих средств, в частности препаратов длительного действия на основе инсулина, актуальной остается
10 проблема дисфункций различных органов, связанных с повышенным содержанием сахаров в клетках организма. Множественные осложнения, такие как гипогликемия, повышение массы тела, желудочно-кишечные расстройства, отеки и пр., не только снижают качество жизни пациентов, но и ведут к прогрессированию диабет-ассоциированных заболеваний, например, таких как диабетическая ретинопатия и катаракта, нефропатия. Поэтому актуальность поиска как новых антидиабетических
15 препаратов, так и препаратов, снижающих риск сопутствующих диабету заболеваний, не вызывает сомнений. В изучении антидиабетической активности производных 2-оксиндола можно выделить две основные стратегии:

- 1) ингибирование ферментов, участвующих в расщеплении сложных углеводов до легко усваиваемых моносахаридов (ингибиторы α -глюкозидазы);
- 20 2) снижение риска сопутствующих диабету заболеваний, вызванных повышенным содержанием сахаров в организме (ингибиторы альдоредуктазы, киназы-3 β гликоген синтазы (GSK3 β), а также ингибиторы гликирования белков).

Известно, что 2-арилиденоксиндолы способны ингибировать гликирование белков. (Choudhary M.I., Rasheed S., Ahmed N., Khan K.M., Khan M., Rahman A., Wahab A., Anti-
25 glycation properties of oxindole derivatives, US 2015/0038543 A1, 2015).

Известны также немногочисленные лиганды киназы-3 гликоген синтазы - это фермент класса серин/треонин протеинкиназ, участвующий в сигнальном пути инсулина, в частности его функцией является фосфорилирование гликоген синтазы и ее инактивация. Ингибирование GSK3 приводит к блокированию доступа гликоген синтазы к активному
30 сайту киназы, что в свою очередь приводит к снижению уровня сахара в крови (Frame S., Zheleva D., Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2006, 10, 3, 429-444). Оба подтипа фермента (GSK3 α и GSK3 β) экспрессируются в инсулин-чувствительных периферических тканях, их излишняя активация может также приводить к резистентности к инсулину. Гипереактивность GSK3 β также связывают с появлением симптомов ожирения у больных
35 сахарным диабетом (Ring D.B., Jorgenson K.W., Henriksen E.J., Nuss J.M., Goff D., Kinnick T.R., Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo, Diabetes, 2003, 52, 588-595). В ряде работ было показано, что использование низкомолекулярных ингибиторов GSK3 β приводит к
40 значительному улучшению состояния модельных животных с диабетом 2 типа, а также к улучшению метаболизма гликогена в присутствии нативного фермента и гликоген синтазы (Coghlan M.P., Culbert A.A., Cross D.A., Corcoran S.L., Yates J.W., Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription, Chemistry & Biology, 2000, 7, 10, 793-803).

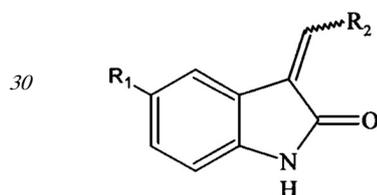
На данный момент известно ограниченное число синтетических лигандов GSK3 β на
45 основе оксиндола, в основном это производные индирубина. Так, 6-бром-замещенные производные индирубина оказывают значительно более селективное действие по отношению к GSK3 β и лучшую ингибирующую способность по сравнению с незамещенным индирубином. (Vougiannopoulou K., Ferandin Y., Bettayeb K.,

Myrianthopoulos V., Lozach O., Fan Y., Johnson C.H., Magiatis P., Skaltsounis A.-L., Mikros E., Meijer L., Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity towards glycogen synthase kinase-3 alter circadian period, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51, 20, 6421-6431; Meijer L., Skaltsounis A.-L., Magiatis P., GSK-3-Selective inhibitors derived from Tyrian Purple indirubins, *Chemistry & Biology*, 2003, 10, 1255-1266).

3-Арилиден-замещенные производные 2-оксиндола также способны проявлять ингибирующую активность по отношению к α -глюкозидазе - популярной мишени при терапии диабета второго типа. Исследования показали, что введение гидроксигрупп в 3',4'-положения бензилиденового фрагмента значительно усиливает аффинность к α -глюкозидазе по сравнению с акцепторными (NO_2 , Cl, CHO), алкокси- и алкильными группами, что говорит об их роли в качестве доноров водородной связи. Увеличение самого ароматического фрагмента (замена бензилиденового заместителя на хинолин и антрацен), а также введение разветвленных алкильных заместителей в 4'-положение бензольного кольца положительно влияют на аффинность (Khan M., Yousaf M., Wadood A., Junaid M., Ashraf M., Alam U., Ali M., Arshad M., Hussain Z., Khan K.M., Discovery of novel oxindole derivatives as potent α -glucosidase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22, 13, 3441-3448). Данное исследование является наиболее близким к заявленному изобретению. Однако значения констант полуингибирования известных соединений по отношению к α -глюкозидазе достаточно высоки и находятся в микромолярном интервале. Кроме того, тестирование известных соединений *in vivo* не осуществлялось, и не было показано их действие на уровень глюкозы в организме. Действие на GSK3 β не было показано.

Раскрытие изобретения

Для преодоления указанных недостатков известных исследований уровня техники предложен способ лечения сахарного диабета у субъекта, обеспечивающий снижение уровня глюкозы в организме, включающий введение композиции, содержащей соединение общей формулы (I)



(I)

где R^1 выбран из H, нитро, галоген, C_1 - C_4 -алкокси, $\text{NH}(\text{CO})\text{C}_1$ - C_4 -алкил, $\text{NH}(\text{CO})\text{OC}_1$ - C_4 -алкил, $\text{NH}(\text{CO})\text{C}_5$ - C_6 -арил, $\text{NH}(\text{CO})\text{C}_5$ - C_6 -гетероарил, где C_5 - C_6 -гетероарил означает 5-6-членный арил с 1 или 2 гетероатомами, выбранными из группы O, N, S, R^2 означает C_5 - C_6 -арил или C_5 - C_6 -гетероарил, содержащий одну или несколько используемых в сочетании друг с другом групп, выбранных из H, OH, нитро, галоген, C_1 - C_4 -алкокси, где C_5 - C_6 -гетероарил означает 5-6-членный арил с 1 или 2 гетероатомами, выбранными из группы O, N, S,

в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

Введение соединения (I) является разовым или осуществляется курсом, частоту введения в котором и его длительность выбирают в зависимости от характера и степени выраженности заболевания или от состояния субъекта. Предпочтительно, когда

терапевтически эффективное количество соединения (I) составляет 5-50 мг/кг массы тела субъекта. Введение соединения (I) предпочтительно осуществляют перорально или парентерально, предпочтительно в виде композиции с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемый носитель выбран из группы, содержащей

5 воду, буферные растворы, диметилсульфоксид или их смеси

В частном случае осуществления изобретения соединение формулы (I) представляет собой 3-(пиридин-2-илметил)-2-оксиндол или 3-(4-нитробензилиден)-5-метоксикарбониламино-2-оксинол.

Изобретение обеспечивает достижение технического результата, заключающегося

10 в более эффективном снижении уровня сахара в организме за счет воздействия и на GSK3 β и на α -глюкозидазу в разной степени, т.е. задействованы два механизма снижения концентрации сахара. Структура соединения (I) оптимизирована на основании анализа сайтов связывания указанных мишеней, подбора оптимальных заместителей и данных тестирования ингибирующей активности *in vitro* на мишенях.

15 Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется следующими чертежами.

На фиг. 1 представлены графики, демонстрирующие эффект производных оксиндола (5) (А (глюкоза 3 г/кг), Б (глюкоза 2 г/кг)) и (21) (В, глюкоза 2,5 г/кг) на уровень глюкозы в крови в глюкозо-толерантном тесте на модельных животных, n=6, *P=0,95, **P=0,99,

20 величина ошибки представляет собой стандартную ошибку (SEM). Введение тестируемого соединения - момент времени - 30 мин, введение глюкозы - 0 мин.

На фиг. 2 представлены результаты проверки цитотоксичности производных оксиндола по отношению к РВМСs методом МТТ-теста. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

25 Осуществление изобретения

Способ лечения в рамках заявленного изобретения подразумевает лечение симптомов, проявляющихся при сахарном диабете, а именно гипергликемии (повышенное содержание глюкозы в организме).

Введение композиции может осуществляться перорально, парентерально или путем

30 инъекций. При этом композиция может быть представлена в виде таблеток, сиропа, капсул, инъекций и т.д. Терапевтически эффективная доза композиции подбирается таким образом, чтобы достигнуть терапевтически эффективной для лечения сахарного диабета концентрации соединения формулы (I). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения доза концентрации подбирается исходя из двух факторов:

35 максимально возможная доза ограничивается концентрацией активного компонента, которая оказывает токсический эффект, минимальная доза ограничивается концентрацией активного компонента, которая вызывает необходимый терапевтический эффект - снижение уровня сахара в организме до требуемого уровня.

Лекарственные средства могут вводиться перорально или парентерально (например,

40 внутривенно, подкожно, внутривентриально или местно).

Доза соединения в соответствии с настоящим изобретением у субъекта может корректироваться в зависимости от терапевтической эффективности и биодоступности активных ингредиентов в организме, скорости их обмена и выведения из организма.

Дозу определяет лечащий врач на основании специфических параметров пациента,

45 таких как возраст, масса тела, пол, тяжесть заболевания и т.п. В предпочтительном варианте осуществления изобретения активный агент - соединение формулы (I) вводится в концентрации 1-100 мг/кг, еще более предпочтительный вариант - 5-50 мг/кг массы тела субъекта.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксическому материалу, который не взаимодействует с действием активного компонента фармацевтической композиции. "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к биосовместимому раствору, который в достаточной степени имеет такие характеристики, как стерильность, р[Ета], изотоничность, стабильность и подобные, и может включать любые растворители, разбавители, включая стерильный физиологический раствор, раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор декстрозы для инъекций, раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций, содержащий лактат раствор Рингера для инъекций и другие водные буферные растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и подобные. Фармацевтически приемлемый носитель также может содержать стабилизаторы, консерванты, антиоксиданты или другие добавки, которые хорошо известны специалистам в данной области, или другой наполнитель, известный из уровня техники.

Для приготовления композиции с соединением формулы (I) могут быть использованы фармацевтически приемлемые и фармакологически совместимые наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, набухающие средства, средства доставки, такие как консерванты, стабилизаторы, наполнители, разрыхлители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбит и эфиры сорбита, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как, парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие, как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Примерами набухающих агентов, улучшителей смачивания и разбавителей являются крахмалы, связывающих средств - альгиновая кислота и ее соли, силикаты. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоль с высоким молекулярным весом. Фармацевтическая композиция для перорального, сублингвального, трансдермального, внутримышечного, внутривенного введения активного начала, одного или в комбинации с другим активным началом, может быть введена животным и людям в стандартной форме введения, в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями.

В качестве активного компонента может быть использовано любое соединение, подпадающее под структурную формулу (I), поскольку радикалы R^1 - R^3 были подобраны на основании данных рентгено-структурного анализа комплексов индирубина с GSK3 β и акарбозы с α -глюкозидазой. Данные радикалы обеспечивают оптимальное связывание с выбранными мишенями, что подтверждено данными тестирования *in vitro* на мишенях.

Композиция подразумевает наличие фармацевтически приемлемого носителя, например, воды, буферных растворов (цитратный, фосфатный, ТРИС и др.), диметилсульфоксид, этиленгликоль и других органических растворителей или их смеси (для жидкой композиции) или производные целлюлозы и проч. (для твердой композиции).

5 Растворитель подбирается с учетом профиля безопасности для введения живому субъекту.

В отдельных вариантах осуществления изобретения композиция представляет собой раствор для инъекций, раствор для приема внутрь (перорально), таблетку, порошок (саше), капсулу или сироп. При этом содержание соединения формулы (I) может
10 составлять 0-75 масс % от всей композиции.

В других вариантах осуществления изобретения композиция включает фармацевтически совместимые добавки, например, разбавители, растворители, стабилизаторы, пластификаторы, регуляторы pH и др.

15 Возможность реализации заявляемого изобретения показана, но не ограничена, в примерах конкретного выполнения.

Получение 3-арилиден-2-оксиндолов

Пример 1. 3-(4-Бромбензилиден)-5-бром-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,3 г (0,0014 моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,26 г (0,0014 моль) 4-бромбензальдегида, 5 мл
20 этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 1 часа, затем остудили до комнатной температуры, выпавший оранжевый осадок отфильтровали, промыли этиловым спиртом, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 74% (0,4 г). Т.пл. (эксп.)=260-262°C.

25 Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,76** (д, J=8,2, 1H); 6,83* (д, J=8,3, 1H); 7,36** (д, J=8,2, 1H); 7,40* (д, J=8,3, 1H); 7,48* (с, 1H); 7,60-7,65* (м, 3H); 7,67** (д, J=8,4, 2H); 7,73* (д, J=8,1, 2H); 7,89** (с, 1H); 7,94** (с, 1H); 8,31** (д, J=8,3, 2H); 10,78* (с, 1H); 10,80** (с, 1H). * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 5:3.
30

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 111,79; 112,59; 123,26; 125,04; 131,79; 132,34; 133,16; 134,43; 136,78; 137,73; 140,35; 142,66.

Спектр ИК (ZnSe, cm^{-1}): 1446; 1604; 1701; 2854; 3014; 3049; 3082; 3118; 3163.

35 Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 381 (52, M+), 380 (28, M+), 379 (100, M+), 378 (32, M+), 351 (14), 299 (9), 272 (8), 270 (9), 224 (32), 222 (33), 191 (44), 190 (65), 164 (39), 163 (49), 150 (19), 149 (16), 96 (15), 75 (20), 63 (24), 50 (24), 39 (14).

Элементный анализ: найдено (%): C 47,51; H 2,43; N 3,69; вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Br}_2\text{NO}$ (%): C 47,53; H 2,39; N 3,70.

40 Пример 2. 3-(4-Бромбензилиден)-5-метоксикарбониламино-2-оксиндол

В круглодонную колбу внесли 0,5 г (0,0024 моль) 5-метоксикарбониламин-2-оксиндола (23i), 0,54 г (0,0029 моль) 4-бромбензальдегида, 4 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем выпавший оранжевый осадок отфильтровали на вакуумном фильтре,
45 промыли этиловым спиртом, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 33% (0,3 г). Т.пл. (эксп.) = 251-253°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 3,63 (с, 3H); 6,80 (д, J=8,4, 1H); 7,38 (д, J=7,5, 1H); 7,53 (с, 1H); 7,65 (д, J=8,5, 2H); 7,69 (д, J=8,5, 2H); 7,72(с, 1H); 9,46 (с, 1H); 10,49 (с,

1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 51,98; 110,53; 114,13; 121,22, 123,33; 128,74; 131,84; 132,25; 133,52; 133,92; 134,89; 138,80; 154,55; 169,04.

5 ИК (КВг, см^{-1}): 1059; 1215; 1458; 1612; 1701; 1730; 3163; 3402.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 374 (82, M+), 372 (82, M+), 342 (27), 340 (28), 314 (21), 312 (18), 260 (18), 258 (14), 234 (24), 205 (43), 185 (53), 179 (42), 178 (60), 152 (36), 151 (33), 126 (24), 102 (10), 76 (18), 59 (100), 15 (58).

10 Элементный анализ: найдено (%): С 58,18; Н 3,71; N 4,22; вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$ (%): С 58,20; Н 3,66; N 4,24.

Пример 3. (E)-3-(Пиридин-2-илметилен)-5-бром-2-оксиндол

15 В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0012 моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,14 г (0,0013 моль) 2-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде оранжевого порошка с выходом 67% (0,24 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 175-180°C (т.пл. (лит.) = 250-252°C (E-изомер), 242-246, затем 250-252 (Z-изомер)).

20 Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,82 (д, J=8,3, 1H); 7,43-7,50 (м, 2H); 7,61 (с, 1H); 7,89-7,99 (м, 2H); 8,87 (д, J=3,8, 1H); 9,27 (д, J=1,3, 1H); 10,77 (уш.с, 1H).

Пример 4. (E)-3-(Пиридин-2-илметилен)-5-нитро-2-оксиндол

25 В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0014 моль) 5-нитро-2-оксиндола (22e), 0,17 г (0,0016 моль) 2-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде темно-серого порошка с выходом 77% (0,29 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 302°C (т.пл. (лит.) > 260°C (E-изомер)).

30 Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 7,05 (д, J=8,6, 1H); 7,55 (псевдо т, J=6,5, 1H); 7,74 (с, 1H); 7,97-8,03 (м, 2H); 8,24 (дд, J=2,4, J=8,6, 1H); 8,91 (д, J=4,5, 1H); 10,11 (д, J=2,2, 1H); 11,32 (уш.с, 1H).

Пример 5. (Z)-3-(Пиридин-2-илметилен)-2-оксиндол

35 В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0008 моль) 2-оксиндола (22h), 0,08 г (0,0008 моль) 2-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 0,5 часа, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт был получен в виде коричневого порошка с выходом 79% (0,13 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 175-180°C (т.пл. (лит.) = 202-203°C [129], 196-198°C (Z-изомер), 205-207°C (Z-изомер)).

45 Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,87 (д, J=7,7, 1H); 6,98 (т, J=7,6, 1H); 7,28 (т, J=7,6, 1H); 7,46 (м, 1H); 7,57 (с, 1H); 7,86 (д, J=7,8, 1H); 7,94 (м, 1H); 8,88 (уш.с, 1H); 9,00 (д, J=7,6, 1H); 10,64 (с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 110,10; 121,71; 121,95; 124,60; 128,39; 128,85; 131,30; 134,14; 137,71; 144,04; 150,13; 153,67; 161,60; 169,77.

Пример 6. 3-(Пиридин-3-илметилен)-5-бром-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0012 моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,14 г (0,0013 моль) 3-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде бордового порошка с выходом 90% (0,32 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 225°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,79* (д, J=8,3, 1H); 6,85** (д, J=8,3, 1H); 7,37-7,43 (м, 3H); 7,50* (дд, J=4,8, J=8,0, 1H); 7,57** (дд, J=4,8, J=7,8, 1H); 7,70** (с, 1H), 7,96-7,97* (м, 2H); 8,10* (д, J=7,9, 1H); 8,58* (д, J=4,4, 1H); 8,26** (д, J=8,7, 2H); 8,32* (д, J=8,6, 2H); 8,86** (д, J=1,1, 1H); 8,90* (д, J=8,1, 1H); 9,18* (с, 1H); 10,76 (уш.с, 2H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 1,3:1.

Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 300,0006 ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{BrN}_2\text{O}$, M^+), рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$: 299,9898.

Пример 7. 3-(Пиридин-3-илметил)-5-нитро-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0014 моль) 5-нитро-2-оксиндола (22e), 0,17 г (0,0016 моль) 3-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде серо-зеленого порошка с выходом 83% (0,31 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 150-155°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 7,03* (д, J=8,6, 1H); 7,07** (д, J=8,6, 1H); 7,53* (дд, J=4,6, J=7,8, 1H); 7,60** (дд, J=4,9, J=8,1, 1H); 7,85* (с, 1H); 8,17-8,22 (м, 3H); 8,26* (с, 1H); 8,62** (дд, J=1,4, J=4,8, 1H); 8,71-8,72 (м, 2H); 8,90-8,95 (м, 2H); 8,26* (с, 1H); 9,24* (д, J=1,9, 1H); 11,41* (уш.с, 1H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 1,6:1.

Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 266,0646 ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3$, M^+), рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$: 267,0644.

Пример 8. 3-(Пиридин-3-илметил)-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0019 моль) 2-оксиндола (22h), 0,23 г (0,0021 моль) 3-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде желтого порошка с выходом 54% (0,26 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 150-155°C (т.пл. (лит.) = 188-190°C).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,79-6,86** (м, 2H); 6,98** (д J=7,8, 1H); 7,19-7,24 (м, 2H); 7,33* (с, 1H); 7,46** (дд, J=5,1, J=8,2, 1H); 7,52* (дд, J=4,7, J=7,8, 1H); 7,59** (с, 1H); 7,69** (д, J=7,8, 1H); 7,80** (с, 1H); 8,08* (д, J=7,4, 1H); 8,54** (дд, J=1,6, J=4,7, 1H); 8,61* (дд, J=1,2, J=4,7, 1H); 8,84* (уш.с, 1H); 9,16** (д, J=2,0, 1H); 10,64** (уш.с, 1H); 10,65** (уш.с, 1H); * - основной продукт (Z-изомер), ** - минорный продукт (E-изомер). По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 1,6:1.

Пример 9. 3-(Пиридин-4-илметил)-5-бром-2-оксиндол (28b)

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0012 моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,14 г (0,0013 моль) 4-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде темно-оранжевого порошка с выходом 82% (0,29 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 260-265°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,78** (д, J=8,3, 1H); 6,84* (дд, J=8,3, 1H); 7,32* (д, J=1,6, 1H); 7,40-7,44 (м, 2H); 7,61-7,63 (м, 3H); 7,90** (с, 1H); 7,98** (д, J=1,7, 1H); 8,10** (д, J=5,8, 2H); 8,67** (д, J=5,9, 2H); 8,73* (д, J=5,8, 1H); 10,85 (уш.с, 2H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 1,3:1.

Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 300,0004 ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$, M^+), рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$: 299,9898.

Пример 10. 3-(Пиридин-4-илметил)-5-нитро-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0014 моль) 5-нитро-2-оксиндола (22e), 0,17 г (0,0016 моль) 4-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде зелено-коричневого порошка с выходом 72% (0,27 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 260-265°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 7,01** (д, J=8,7, 1H); 7,06* (д, J=8,7, 1H); 7,67-7,68 (м, 1H); 7,78** (с, 1H); 8,09** (д, J=2,3, 1H); 8,11-8,13* (м, 2H); 8,18-8,21 (м, 3H); 8,70-8,71 (м, 2H); 8,76-8,78* (м, 2H); 11,43 (уш.с, 1H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 1,2:1.

Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 266,0648 ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$, M^+), рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$: 267,0644.

Пример 11. 3-(Пиридин-4-илметил)-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0019 моль) 2-оксиндола (22h), 0,23 г (0,0021 моль) 4-пиридин-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде светло-желтого порошка с выходом 76% (0,31 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 240-245°C (т.пл. (лит.) = 227-230°C (E-изомер), 167-171°C (Z-изомер)).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,81-6,88 (м, 3H); 7,00** (т, J=7,5, 1H); 7,23-7,27 (м, 2H); 7,35* (д, J=7,4, 1H); 7,54* (с, 1H, Z-изомер); 7,62* (д, J=5,9, 2H); 7,72** (д, J=7,4, 1H); 7,77** (с, 1H, E-изомер); 8,10** (д, J=6,1, 2H); 8,66** (д, J=6,0, 2H); 8,71* (д, J=5,9, 2H); 10,70* (уш.с, 1H); 10,71** (уш.с, 1H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 2,7:1.

Пример 12. 3-(2-Фурилметил)-5-бром-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0012

моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,13 г (0,0012 моль) фурфурола, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде темно-зеленого порошка с выходом 80% (0,28 г).
 5 Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 223-225°C (т.пл. (лит.) = 260-261°C).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,74* (д, J=8,3, 1H); 6,77-6,79** (м, 2H); 6,82-6,84* (м, 2H); 7,31** (д, J=1,7, 1H); 7,32** (д, J=3,4, 1H); 7,36** (с, 1H); 7,39* (с, 1H); 7,42* (дд, J=1,9, J=8,3, 1H); 7,82 (с, 1H); 8,00 (д, J=1,4, 1H); 8,25* (с, 1H); 8,28** (д, J=3,6, 1H);
 10 8,42* (д, J=1,9, 1H); 10,48** (уш.с, 1H); 10,72* (уш.с, 1H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 3,3:1.

Пример 13. 3-(2-Фурилметилден)-5-нитро-2-оксиндол

15 В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0014 моль) 5-нитро-2-оксиндола (22e), 0,13 г (0,0014 моль) фурфурола, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде зелено-коричневого порошка с выходом 47% (0,17 г).
 20 Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 180-185°C (т.пл. (лит.) = 305,8-306,3°C, 315°C (с разл.)).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,87 (дд, J=1,7, J=3,4, 1H); 7,02 (д, J=8,7, 1H); 7,40 (д, J=3,6, 1H); 7,48 (с, 1H); 8,18 (дд, J=2,3, J=8,7, 1H); 8,28 (д, J=1,4, 1H); 9,14 (д, J=2,3, 1H); 11,28 (уш.с, 1H).

25 Пример 14. 3-(2-Фурилметилден)-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0019 моль) 2-оксиндола (22h), 0,18 г (0,0019 моль) фурфурола, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до
 30 комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде светло-зеленого порошка с выходом 42% (0,17 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 180-185°C (т.пл. (лит.) = 443-446 К (E-изомер моногидрат); 170-171°C (Z-изомер), 178°C).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,75** (дд, J=1,8, J=3,5, 1H); 6,79* (дд, J=1,8, J=3,4, 1H); 6,82** (д, J=7,9, 1H); 6,86* (д, J=7,7, 1H); 6,95** (т, J=7,3, 1H); 7,00* (т, J=0,9, J=7,6, 1H); 7,19** (т, J=1,0, J=7,6, 1H); 7,22-7,26* (м, 2H); 7,32* (с, 1H); 7,67** (с, 1H); 7,71** (д, J=7,6, 1H); 7,96** (д, J=1,6, 1H); 8,15* (д, J=1,7, 1H); 8,26** (д, J=3,6, 1H); 8,36* (д, J=7,6, 1H); 10,57* (уш.с, 1H); 10,61** (уш.с, 1H); * - основной продукт (E-изомер), ** -
 40 минорный продукт (Z-изомер). По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 9:1.

Пример 15. 3-(2-Тиенилметилден)-5-бром-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0012 моль) 5-бром-2-оксиндола (22b), 0,13 г (0,0012 моль) тиофен-2-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем
 45 остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде ярко-желтого порошка с выходом 43% (0,16 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 275-280°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,80* (д, J=8,3, 1H); 6,83** (д, J=8,3, 1H); 7,25* (дд, J=3,7, J=5,1, 1H); 7,34* (дд, J=2,0, J=8,3, 1H); 7,46** (т, J=1,9, J=8,4, 1H); 7,86-7,87** (м, 3H); 7,91-7,94* (м, 3H); 9,05** (д, J=5,2, 1H); 8,26* (с, 1H); 10,73* (уш.с, 1H); 10,78** (уш.с, 1H); * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 5:1.

Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 304,9516 ($\text{C}_{13}\text{H}_7\text{BrNOS}$, M^+), рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrNOS}$: 304,9510.

Пример 16. 3-(2-Тиенилметил)-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0019 моль) 2-оксиндола (22h), 0,22 г (0,0021 моль) тиофен-2-карбоксальдегида, 2 мл метанола и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 5 часов, затем остудили до комнатной температуры, избыток растворителя удаляли в вакууме роторного испарителя. Продукт получен в виде темно-желтого порошка с выходом 67% (0,28 г). Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Т.пл. (эксп.) = 212-216°C (т.пл. (лит.) = 463-466 К (Z-изомер); 160-162°C).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,84* (д, J=7,6, 1H); 6,90** (д, J=7,6, 1H); 6,98* (т, J=7,6, 1H); 7,04** (д, J=7,5, 1H); 7,19* (т, J=7,7, 1H); 7,22* (дд, J=3,7, J=5,0, 1H); 7,25-7,31** (м, 2H); 7,67* (д, J=7,5, 1H); 7,77** (с, 1H); 7,81** (д, J=3,5, 1H); 7,88* (д, J=5,1, 1H); 7,92* (д, J=3,4, 1H); 7,98** (д, J=5,3, 1H); 8,10* (с, 1H); 8,16** (д, J=7,8, 1H); 10,60* (уш.с, 1H); 10,62** (уш.с, 1H); * - основной продукт (Z-изомер), ** - минорный продукт (E-изомер). По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 9:1.

Пример 17. 3-(4-Гидроксibenзилиден)-5-ацетамидо-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0006 моль) 5-ацетамидо-2-оксиндола (24e), 0,07 г (0,0006 моль) 4-гидроксibenзальдегида, 3 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 0,5 часа, затем остудили до комнатной температуры. Растворитель удалили в вакууме. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 100% (0,17 г). Т.пл. (эксп.) = 190-195°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 1,99 (с, 3H); 6,78 (д, J=8,3, 1H); 6,87 (д, J=8,6, 2H); 7,39 (дд, J=1,9, J=8,3, 1H); 7,51 (с, 1H); 7,62 (д, J=8,7, 2H); 8,13 (д, J=1,9, 1H); 9,81 (м, 2H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 24,29; 109,98; 114,47; 116,46; 120,83; 121,84; 124,45; 124,58; 132,57; 133,56; 137,40; 138,44; 161,08; 168,27; 167,79.

Спектр ИК (KBr, cm^{-1}): 1477; 1566; 1599; 1666; 1680; 2590-3622; 2854; 2927; 3269; 3419.

Элементный анализ: найдено (%): C 69,35; H 4,85; N 9,50; вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (%): C 69,38; H 4,79; N 9,52.

Пример 18. 3-(4-Гидроксibenзилиден)-5-метоксикарбониламино-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,3 г (0,0015 моль) 5-метоксикарбониламин-2-оксиндола (23i), 0,18 г (0,0015 моль) 4-гидроксibenзальдегида, 5 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 0,5 часа, затем остудили до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровали на вакуумном фильтре, промыли этиловым спиртом. Фильтрат концентрировали в вакууме роторного испарителя. Промывали концентрированной соляной кислотой, затем водой, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал

дополнительной очистки. Выход составил 44% (0,2 г). Т.пл. (эксп.) = 205-210°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 3,62 (с, 3H); 6,78 (д, J=8,3, 1H); 6,90 (с, 1H); 6,92 (с, 1H); 7,28 (д, J=8,0, 1H); 7,51 (с, 1H); 7,62 (с, 1H); 7,64 (с, 1H); 7,98 (с, 1H); 9,50 (с, 1H); 10,43 (с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 51,98; 110,19; 116,20; 120,40; 121,89; 125,04; 125,31; 132,45; 135,34; 137,19; 138,27; 154,63; 159,81; 160,66.

ИК (КВг, см^{-1}): 1165; 1215; 1367; 1446; 1639; 1697; 2500-3500.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 310 (100, M+), 278 (43), 250 (33), 221 (11), 196 (22), 185 (12), 151 (7), 115 (8), 77 (4), 59 (22), 15 (9).

Элементный анализ: найдено (%): C 71,88; H 4,95; N 5,23; вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (%): C 71,90; H 4,90; N 5,24.

Пример 19. 3-(4-Гидроксibenзилиден)-5-бензоиламино-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0004 моль) 5-бензоиламино-2-оксиндола (23j), 0,05 г (0,0004 моль) 4-гидроксibenзальдегида, 3 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 1 часа, затем остудили до комнатной температуры, растворитель удалили в вакууме. Сухой остаток промыли хлороформом, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 99% (0,15 г). Т.пл. (эксп.) = 179-180°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 5,60 (уш.с, 1H); 6,91 (д, J=8,6, 2H); 7,48-7,60 (м, 5H); 7,67 (д, J=8,4, 2H); 7,91 (д, J=7,1, 1H); 8,31 (с, 1H); 10,18 (с, 1H); 10,54 (уш.с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 110,02; 115,75; 115,97; 116,26; 122,61; 124,91; 125,26; 128,05; 128,79; 128,84; 131,82; 132,51; 133,26; 135,41; 137,28; 160,01; 165,76; 169,79.

Спектр ИК (КВг, см^{-1}): 1477; 1579; 1599; 1643; 1685; 1763-3685; 2812; 2949; 3157.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 356 (47, M+), 251 (8), 196 (12), 167 (4), 151 (3), 105 (100), 84 (7), 77 (53), 51 (8), 27 (6).

Элементный анализ: найдено (%): C 74,14; H 4,55; N 7,85; вычислено для $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (%): C 74,15; H 4,53; N 7,86.

Пример 20. 3-(4-Гидроксibenзилиден)-5-фууроиламино-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0004 моль) 5-фууроиламино-2-оксиндола (23k), 0,04 г (0,0004 моль) 4-гидроксibenзальдегида, 3 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 1 часа, затем остудили до комнатной температуры, растворитель удалили в вакууме. Сухой остаток промыли хлороформом, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 87% (0,12 г). Т.пл. (эксп.) = 187-190°C.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 6,67 (с, 1H); 6,91 (д, J=8,1, 1H); 7,27-7,34 (дд, J=3,1, J=12,4, 2H); 7,50-7,56 (м, 2H); 7,66 (д, J=8,3, 2H); 7,88-7,98 (м, 2H); 8,31 (с, 1H); 10,12 (с, 1H); 10,55 (уш.с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 110,04; 112,53; 113,28; 114,83; 115,78; 116,00; 116,27; 122,66; 125,23; 132,55; 135,42; 137,36; 139,22; 145,92; 156,48; 160,04; 168,04; 169,76.

Спектр ИК (КВг, см^{-1}): 175; 1587; 1655; 1685; 2526-3627; 2949; 3215; 3394.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 346 (100, M+), 318 (3), 289 (3), 251

(20), 242 (10), 223 (9), 196 (19), 167 (6), 147 (3), 95 (48), 56 (2), 39 (9).

Элементный анализ: найдено (%): С 69,35; Н 4,12; N 8,07; вычислено для $C_{20}H_{14}N_2O_4$ (%): С 69,36; Н 4,07; N 8,09.

Пример 21. 3-(4-Нитробензилиден)-5-метоксикарбониламино-2-оксинол

5 В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,2 г (0,001 моль) 5-метоксикарбониламин-2-оксиндола (23i), 0,15 г (0,001 моль) 4-нитроксibenзальдегида, 3 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 0,5 часа, затем остудили до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровали, промыли этиловым спиртом, сушили на воздухе. Полученный
10 продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 49% (0,16 г). Т.пл. (эксп.) = 265-267°C.

Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 3,59* (с, 3H); 3,66** (с, 3H); 6,76** (д, J=8,4, 1H); 6,80* (д, J=8,4, 1H); 7,20** (д, J=8,1, 1H); 7,42* (д, J=7,1, 1H); 7,56* (с, 1H); 7,63* (с, 1H); 7,76** (с, 1H); 7,84** (с, 1H); 7,93* (д, J=8,6, 2H); 8,26** (д, J=8,7, 2H); 8,32* (д, J=8,6, 2H); 8,50** (д, J=8,7, 2H); 9,47* (уш.с, 1H); 9,52** (уш.с, 1H); 10,59*** (уш.с, 2H). * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 3:1.

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 51,98; 110,73; 120,85; 121,62; 123,49; 124,37; 130,80;
20 130,92; 133,02; 133,41; 139,15; 147,79; 154,48; 168,66.

Спектр ИК (KBr, cm^{-1}): 1315; 1352; 1460; 1506; 1709; 1730; 2841; 3035; 3076; 3116; 3168; 3384.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 339 (100, M+), 307 (80), 280 (20),
25 261 (16), 234 (17), 205 (17), 178 (15), 151 (8), 126 (5), 76 (10), 59 (58), 15 (60).

Элементный анализ: найдено (%): С 60,16; Н 3,91; N 12,37; вычислено для $C_{17}H_{13}N_3O_5$ (%): С 60,18; Н 3,86; N 12,38.

Пример 22. 3-(3,4,5-Триметоксибензилиден)-5-ацетамидо-2-оксоиндол

30 В круглодонную колбу внесли 0,47 г (0,003 моль) 5-ацетамид-2-оксиндола (24e), 0,59 г (0,003 моль) 3,4,5-триметоксибензальдегида, 2 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, затем выпавший желтый осадок отфильтровали на вакуумном фильтре, промыли водой, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 43% (0,40 г). Т.пл. (эксп.) = 245-246°C.

35 Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 1,98 (с, 3H); 3,37 (с, 1H); 3,75 (с, 3H); 3,83 (с, 6H); 6,81 (д, J=3,4, 1H); 7,05 (с, 2H); 7,35 (д, J=3,8, 1H); 7,56 (с, 1H); 8,26 (с, 1H); 9,80 (с, 1H); 10,47 (с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 24,25; 56,25; 60,61; 107,45; 110,33; 114,85; 121,44;
40 121,50; 127,17; 129,97; 133,82; 136,81; 139,03; 153,37; 168,32; 169,45.

ИК (вазелиновое масло, cm^{-1}): 1150; 1720; 3185; 3260.

Элементный анализ: найдено (%): С 65,29; Н 5,61; N 7,64; вычислено для $C_{20}H_{20}N_2O_5$ (%): С 65,21; Н 5,47; N 7,60.

45 Пример 23. 3-(3,4,5-Триметоксибензилиден)-5-фууроиламино-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,1 г (0,0003 моль) 5-фууроиламино-2-оксиндола (23k), 0,08 г (0,0004 моль) 3,4,5-триметоксибензальдегида, 3 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль).

Смесь кипятили в течение 2 часов, затем остудили до комнатной температуры. К реакционной смеси добавили 10 мл холодной воды, оранжевый осадок отфильтровали, промыли холодной водой, сушили на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход составил 52% (0,09 г). Т.пл. (эксп.) = 258-262°C.

5 Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J, Гц): 3,75 (с, 3H); 3,82 (с, 6H); 6,66 (с, 1H); 6,86 (д, J=8,2, 1H); 7,08 (с, 1H); 7,25 (д, J=2,2, 1H); 7,50-7,60 (м, 2H); 7,89 (с, 1H); 8,40 (с, 1H); 10,11 (с, 1H); 10,55 (с, 1H).

10 Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 56,26; 60,63; 107,58; 110,34; 110,73; 112,53; 114,83; 116,22; 123,05; 127,04; 129,93; 132,83; 136,98; 137,91; 139,66; 145,99; 148,01; 153,39; 156,48; 169,48.

Спектр ИК (ZnSe, cm^{-1}): 1456; 1475; 1491; 1574; 1587; 1608; 1645; 1676; 2833; 2935; 3251.

15 Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 420 (92, M+), 405 (9), 373 (6), 319 (3), 295 (10), 249 (6), 224 (10), 196 (5), 141 (6), 95 (100), 67 (4), 39 (8).

Элементный анализ: найдено (%): C 65,69; H 4,83; N 6,65; вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ (%): C 65,71; H 4,79; N 6,66.

20 Пример 24. 3-(3,4,5-Триметоксибензилиден)-5-(N-метил-N'-тиокарбониламино)-2-оксиндол

20 В круглодонную колбу, снабженной обратным холодильником, внесли 0,15 г (0,0007 моль) N-Метил-N'-(2-оксиндол-3-ил)тиомочевины (23p), 0,13 г (0,0007 моль) 3,4,5-триметоксибензальдегида, 2 мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 1 часа, затем остудили до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровали с помощью бумажного фильтра. Фильтрат концентрировали в вакууме роторного испарителя. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент EtOAc). Выход составил 26% (0,07 г). Т.пл. (эксп.) = 220-225°C.

30 Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J Гц): 2,83* (д, J=4,4, 3H); 2,89** (д, J=4,3, 3H); 3,74* (с, 3H); 3,74** (с, 3H); 3,80* (с, 6H); 3,84** (с, 6H); 6,82** (д, J=8,1, 1H); 6,86* (д, J=8,2, 1H); 7,01** (д, J=8,1, 1H); 7,05* (с, 2H); 7,10* (дд, J=1,6, J=8,3, 1H); 7,38** (уш.с, 1H); 7,41* (уш.с, 1H); 7,56** (с, 1H); 7,59* (с, 1H); 7,67* (д, J=1,6, 1H); 7,79** (с, 1H); 8,06** (с, 2H); 9,31* (уш.с, 1H); 9,39** (уш.с, 1H); 10,63*** (с, 2H). * - основной продукт, ** - минорный продукт. По данным спектра ЯМР, соотношение основного и минорного стереоизомеров 3:2.

35 Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , м.д.): 56,32; 56,47; 60,67; 107,58; 110,74; 116,85; 117,58; 127,03; 128,05; 130,00; 137,13; 140,33; 141,08; 147,21; 152,72; 153,38; 169,39; 182,12.

ИК (KBr, cm^{-1}): 1126; 1244; 1309; 1427; 1464; 1479; 1697; 1712; 2343; 2360; 2835; 2935; 3070; 3192.

40 Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 368 (100, M+), 353 (20), 326 (22), 267 (12), 209 (7), 181 (5), 153 (4), 119 (3), 73 (2), 30 (4).

45 Масс-спектр (HRMS-ESI): найдено: 400,1326 ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, M+H), 422,1145 ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, M+Na), 438,0884 ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, M+K), рассчитано для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 399,1253.

Пример 25. 3-(3-Гидроксибензилиден)-5-ацетамидо-2-оксиндол

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 0,25 г (0,0013 моль) 5-ацетамидо-2-оксиндола (24e), 0,16 г (0,0013 моль) 3-гидроксибензальдегида, 4

мл этилового спирта и 75 мкл пиперидина (0,0008 моль). Смесь кипятили в течение 0,5 часа, затем остудили до комнатной температуры, осадок отфильтровали на бумажном фильтре, фильтрат концентрировали в вакууме роторного испарителя. Продукт очищали с помощью флэш-хроматографии: первая фракция - элюент EtOAc, содержит
 5 непрореагировавший альдегид; вторая фракция - элюент EtOAc:MeOH (1:1), содержит продукт. Растворитель удаляли в вакууме. Выход составил 52% (0,2 г). Т.пл. (эксп.) = 285-287°C.

Спектр ЯМР ^1H (DMCO- d_6 , м.д., J, Гц): 1,97 (с, 3H); 6,80 (д, J=8,3, 1H); 6,87 (д, J=8,1,
 10 1H); 7,06 (с, 1H); 7,14 (д, J=7,6, 1H); 7,31 (т, J=7,7, 1H); 7,47 (д, J=8,5, 1H); 7,51 (с, 1H); 7,95 (с, 1H); 9,75 (уш.с, 1H); 9,84 (с, 1H); 10,52 (с, 1H).

Спектр ЯМР ^{13}C (DMCO- d_6 , м.д.): 24,22; 110,22; 115,33; 116,35; 117,46; 120,51; 121,28; 122,02; 127,93; 130,36; 133,64; 135,84; 136,59; 139,04; 158,07; 168,26; 169,33.

ИК (KBr, cm^{-1}): 1257; 1377; 1446; 1568; 1664; 1695; 3165; 3228; 3298; 2900-3400.

Масс-спектр (электронный удар, 70 eV), m/z (I, %): 294 (100, M+), 252 (81), 224 (32), 196 (13), 159 (9), 115 (4), 77 (2), 43 (28).

Элементный анализ: найдено (%): C 69,36; H 4,85; N 9,50; вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (%): C 69,38; H 4,79; N 9,52.

Измерение ингибирующей активности по отношению к GSK3 β и α -глюкозидазе in vitro

Активность GSK3 β (человеческая активная рекомбинантная) и α -глюкозидазы (мышьяная) определяли биолюминесцентным методом с помощью набора ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega, США). Анализ проводили при 27°C в 96-луночном белом планшете с плоским дном (Greiner Lumitrac 655074, США) в конечном инкубируемом объеме 25
 25 мкл.

Для киназы-3 β гликоген синтазы инкубационная смесь содержала 2 нг/мл киназы, 0,2 мг/мл субстрата GSK3 β YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS)EDEEE, полученного из человеческой мышечной гликогенсинтазы типа 1 (аминокислоты 636-661) и 25 мкМ АТФ в буферном растворе, содержащем 40 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 20 мМ MgCl $_2$, 0,1
 30 мг/мл БСА, 50 мкМ ДТТ ((-) контроль). Затем вносили 1,25% раствор тестируемых соединений в DMCO в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ (не менее 3-х параллельных измерений) и инкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 60 мин [231, 232]. Измерение люминесценции проводили с помощью микропланшетного
 35 ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия), время интегрирования 1000 мс.

Для α -глюкозидазы (ЕС 3.2.1.20, экспрессированная *S. cerevisiae*, Sigma #G5003) раствор белка с концентрацией 0,12 ед/мл инкубировали с тестируемым соединением в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,8) при 37°C в течение 5 минут. Затем к инкубационной смеси добавляли 25 мкл 4 мМ раствора субстрата - п-нитрофенил- α -D-глюкопиранозиды (Sigma #N1377) и регистрировали спектр поглощения при 400 нм в течение 15 минут с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) [233].

В качестве (+) контролей использовали экспериментальный АТФ-конкурентный ингибитор GSK3 β SB-216763 (Sigma, США) [234] и стандартный ингибитор α -глюкозидазы - акарбозу [13]. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование
 45 активности ферментов было определено на основе концентрационных зависимостей активности тестируемого фермента с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0 (таблица 2).

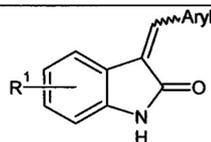
Для ряда бензилиден-замещенных далее осуществлялась оценка ингибирующей

способности по отношению к киназе-3 β гликоген синтазы *in vitro*. В качестве положительного контроля выступал экспериментальный АТФ-конкурентный ингибитор GSK3 β - 3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-1H-пиррол-2,5-дион (SB-216763, табл. 1).

5

Таблица 1. Ингибирование GSK3 β под действием производных оксиндола ($1 \cdot 10^{-5}$ M) и SB-216763, $n=2$, $P=0,95$, величина ошибки представляет собой стандартную ошибку (SEM).

10



15

пример	R ¹	Aryl	Ингибирование (10 μ M), %	IC50, μ M
1	5-Br	4-Br-Ph	44 \pm 8	н/и
2	5-NHC(O)OMe	4-Br-Ph	-	н/и
3	5-Br	2-пиридинил	48 \pm 4	н/и
4	5-NO ₂	2-пиридинил	88 \pm 2	н/и

20

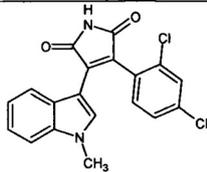
25

30

35

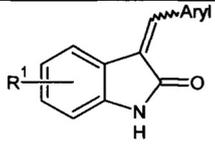
40

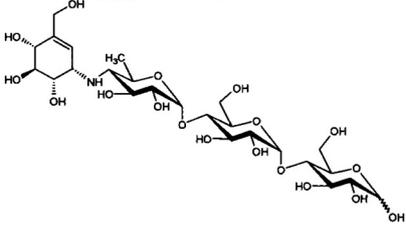
45

5	H	2-пиридинил	96 ± 4	0,004
6	5-Br	3-пиридинил	53 ± 5	н/и
7	5-NO ₂	3-пиридинил	34 ± 4	н/и
8	H	3-пиридинил	19 ± 3	н/и
9	5-Br	4-пиридинил	54 ± 3	н/и
10	5-NO ₂	4-пиридинил	42 ± 2	н/и
11	H	4-пиридинил	38 ± 4	н/и
12	5-Br	2-фурил	30 ± 5	н/и
13	5-NO ₂	2-фурил	80 ± 1	н/и
14	H	2-фурил	-	н/и
15	5-Br	2-тиенил	35 ± 1	н/и
16	H	2-тиенил	28 ± 2	н/и
17	5-NHAc	3-OH-Ph	40 ± 5	н/и
18	5-NHC(O)OMe	4-OH-Ph	92 ± 3	0,155
19	5-NHBz	4-OH-Ph	59 ± 8	4,343
20	5-NHC(O)-2-фурил	4-OH-Ph	37 ± 15	н/и
21	5-NHC(O)OMe	4-NO ₂ -Ph	69 ± 11	0,348
22	5-NHAc	3,4,5-(OMe) ₃ -Ph	84 ± 13	0,233
23	5-NHC(O)-2-фурил	3,4,5-(OMe) ₃ -Ph	27 ± 13	н/и
24	5-NHC(S)NHMe	3,4,5-(OMe) ₃ -Ph	26 ± 2	н/и
25	5-NHAc	3-OH-Ph	39 ± 12	н/и
SB-216763			93 ± 15	0,008

н/и – не изучалось

Таблица 2. Ингибирующее действие производных оксиндола по отношению к α-глюкозидазе.

				
№	R ¹	Aryl	Ингибирование (100 μM), %	IC ₅₀ , μM

1	5-Br	4-Br-Ph	81 ± 5	39
2	5-NHC(O)OMe	4-Br-Ph	82 ± 5	36
5	H	2-пиридинил	-	н/и
18	5-NHC(O)OMe	4-OH-Ph	40 ± 4	н/и
19	5-NHBz	4-OH-Ph	92 ± 2	34
20	5-NHC(O)-2-фурил	4-OH-Ph	32 ± 9	н/и
21	5-NHC(O)OMe	4-NO ₂ -Ph	74 ± 5	5
22	5-NHAc	3,4,5-(OMe) ₃ -Ph	-	н/и
23	5-NHC(O)-2-фурил	3,4,5-(OMe) ₃ -Ph	32 ± 1	н/и
25	5-NHAc	3-OH-Ph	15 ± 1	н/и
Акарбоза			45 ± 3	437

н/и – не было измерено

Исследование антидиабетической активности in vivo

Измерение проводилось на самцах крыс Wistar в возрасте 9-12 недель. Животные содержались по 4 крысы на клетку, со свободным доступом к воде и еде, цикл дня/ночи 12/12 ч/ч при температуре 25°C. Все исследования на животных были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Волгоградского Государственного Медицинского Университета (ВолгГМУ).

Индукция диабета

Перед началом испытаний животные находились на сбалансированной диете с высоким содержанием жира (58% жир, 25% белок, 17% углеводы, % от общего объема получаемых калорий) в течение 2 недель. Затем животные были разделены на 2 группы: экспериментальной группе животных осуществляли внутрибрюшинное введение раствора стрептозотоцина в цитратном буфере pH 4,4 (35 мг/кг), контрольной группе - цитратного буфера (1 мл/кг). Через неделю после введения животные были взвешены, был определен уровень глюкозы в крови для подтверждения индукции диабета. Животные с уровнем глюкозы более 15 mM были использованы для дальнейших испытаний.

Глюкозо-толерантный тест

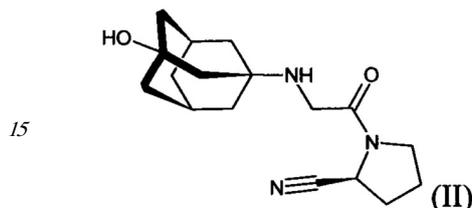
Животные были разделены на три группы (n=6 для животных с индуцированным диабетом; n=5 без индукции диабета): экспериментальные животные, получавшие лечение тестируемым препаратом или веществом сравнения, и контрольная группа.

В качестве (+) контроля использовали вилдаглиптин в 0,5% растворе карбоксиметилцеллюлозы натрия; в качестве (-) контроля - эквивалентный объем носителя (0,5% раствор карбоксиметилцеллюлозы натрия).

Для проведения глюкозо-толерантного теста животных не кормили в течение ночи, затем в момент времени - 30 минут произвели внутрибрюшинное введение тестируемого соединения (5 или 50 мг/кг) в 0,5% растворе карбоксиметилцеллюлозы натрия (группа 1), 10 мг/кг препарата сравнения ((+)-контроль, группа 2) и раствор носителя (группа 3). Через 30 минут всем группам произвели внутривенное введение раствора

глюкозы (2, 2,5 или 3 г/кг) в изотоническом растворе хлорида натрия (0,9%). Для контроля за уровнем глюкозы производили отбор венозной крови из хвоста каждого животного (20 мкл) каждые 30 минут с начала введения тестируемых веществ в течение 2,5 часов. Образцы крови были гемолизированы с 1 мл гемолитического раствора глюкоза/лактат. Уровень глюкозы определяли с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия).

Было осуществлено испытание *in vivo* соединений (5) и (21) в глюкозо-толерантном тесте на модельных животных - мышах с индуцированным диабетом (фиг. 1). В качестве соединения сравнения использовался высокоселективный ингибитор дипептидилпептидазы-4 - вилдаглиптин (II), применяющийся в терапии сахарного диабета 2 типа.



В качестве отрицательного контроля выступала группа животных, которым вводили носитель.

По результатам эксперимента *in vivo* видно, что производные оксиндола вызывают снижение уровня глюкозы в крови после введения глюкозы (2 и 2,5 г/кг) до нормального уровня, что свидетельствует об эффективности данных соединений в терапии диабета. Было обнаружено улучшенное действие соединения 21) в сравнении с вилдаглиптином - эффективное снижение уровня сахара в крови достигалось при использовании дозы тестируемого вещества вдвое меньшей, чем доза соединения сравнения.

Несмотря на то, что в конкретных примерах рассмотрены две конкретные концентрации соединения (I), но для специалиста в области техники ясно, что при использовании других заместителей R¹-R³ данные концентрации будут иными в зависимости от активности конкретного соединения. Для специалиста в данной области техники также ясно, что для каждого конкретного соединения может быть подобрана своя доза на основании данных об активности на мишенях и данных о токсичности.

Измерение цитотоксичности *in vitro*

Культуры клеток человека A549 выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина и 1% гентамицина в качестве антибиотика при 37°C и 5% CO₂ во влажной атмосфере.

Цитотоксичность синтезированных соединений была определена по МТТ-тесту.

Клетки были посеяны в концентрации 1·10⁴ клеток/200 мкл в 96-луночный планшет и культивировались при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. После 24 часов инкубации к культурам клеток были добавлены различные концентрации (не менее 3-х параллельных измерений) тестируемых соединений (от 100 до 1,56 мкМ/л) и далее клетки культивировались в тех же условиях 72 часа. Все вещества были растворены в ДМСО, конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1% и не была токсична для клеток. В качестве (-) контроля использовали растворитель с конечной концентрацией ДМСО 0,1%. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолия бромид, 5 мг/мл) и планшеты инкубировались еще 2 часа. Далее из планшетов была удалена среда и в каждую лунку добавлено 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана.

С помощью планшетного анализатора (Victor3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм, за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC50), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Выделение РВМС

Для выделения РВМС был проведен забор венозной крови (по 20 мл) у различных здоровых не курящих молодых доноров в стерильные гепаринсодержащие пробирки. Кровь разбавляли тем же объемом фосфатного буфера, осторожно смешивали путем переворачивания и наслаивали на 5 мл фиколла (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB) в пластиковых пробирках объемом 15 мл (4 пробирки). Содержимое пробирок центрифугировали при 2000 об/мин и комнатной температуре в течение 30 минут. Надосудочную жидкость удаляли, а слой моноклеарных клеток собирали, переносили в другие пробирки объемом 15 мл и трижды промывали фосфатным буфером центрифугированием при 1000 об/мин и комнатной температуре в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл в DMEM (среда Дубелько или двойная модификация среды Игла, Gibco by life technologies™, Великобритания). Для подсчета клеток и оценки их жизнеспособности использовали гемоцитометр. Жизнеспособность клеток, определенная по 0,4%-трипанового синего (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA), в эксперименте составила >95%. Концентрацию клеток доводили до значения $1,0 \times 10^6$ клеток/мл с помощью окрашивающего раствора Turk, основываясь на морфологических критериях, в конечной среде DMEM (Gibco), дополненной 2 мМ L-глутамин (Gibco), 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (BioClot, Германия), пенициллином (100 МЕ/мл) и стрептомицином (100 мг/мл) (Gibco), и затем высевали в 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея) по 0,2 мл/лунку. Культуру клеток оставляли на 1 ч при температуре 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После чего лунки были промыты для удаления неадгезивных клеток, затем наполнены 0,2 мл конечной среды. После 24 ч инкубации клетки использовали для измерения цитотоксичности тестируемых соединений.

Измерение цитотоксичности на клетках РВМС

Измерение цитотоксичности проводили методом МТТ-теста, основанном на митохондриально-зависимом восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) до фомазана. Для этого использовались клетки РВМС (2,0×10⁵ на лунку) выращенные в 96-луночных планшетах, выделенные как описано выше. Для тестируемых соединений и образцов сравнения использовались данные по 4м лункам. Тестируемые соединения растворяли в ДМСО (до концентрации 0,1 М), фильтровали через одноразовые фильтры (диаметр пор 0,20 μм, Corning, NY, Германия), и доводили до концентраций 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} М с помощью фосфатного буфера (конечная концентрация ДМСО 0,5%). В качестве (-)-контроля использовалась среда DMEM и среда DMEM, содержащая 0,5% ДМСО. В качестве внутреннего контроля активации моноклеарных клеток использовалась среда, содержащая 10 μг/мл липополисахаридов (LPS) из E. coli O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), а в качестве (+)-контроля - среда, содержащая 10% Тритона X-100.

После добавления тестируемого соединения клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. МТТ (Sigma, St. Louis, MO, США) растворяли в фосфатном буфере (5 мг/мл), затем осуществляли стерилизующее

5 фильтрование. По окончании времени инкубации, в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора МТТ, затем инкубировали полученные растворы при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, еще 4 ч. По истечению 4 ч, инкубационную среду удаляли, в каждую лунку добавляли 150 мкл ДМСО для растворения кристаллов
 10 фомазана. Микропланшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего фиксировали оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм с помощью считывателя микропланшетов Sunrise TS (Tecan GmbH, Австрия). Цитотоксичность рассчитывалась как процентное значение средней оптической плотности при каждой концентрации тестируемого соединения (n=4) по отношению к
 15 клеткам, не подвергавшимся какому-либо воздействию.

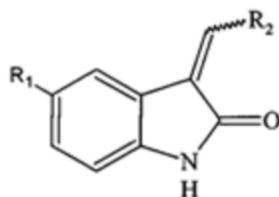
Была протестирована цитотоксичность ряда синтезированных производных по отношению к клеткам крови РВМС (фиг. 2).

15 Все исследованные соединения показывают удовлетворительную токсичность на клетках РВМС. В частности, нами показано, что соединение-лидер по отношению к GSK3 β , выявленное в ходе данной работы, обладает умеренной цитотоксичностью в клеточном анализе с достаточным терапевтическим окном.

Таким образом, продемонстрировано применение арилиден-2-оксиндола общей формулы (I) для лечения сахарного диабета.

20 (57) Формула изобретения

1. Способ лечения сахарного диабета второго типа, обеспечивающий снижения уровня глюкозы в организме, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества арилиден-2-оксиндола общей формулы (I)



30 (I)

где R1 выбран из H, нитро, галоген, C1-C4-алкокси, NH(CO)C1-C4-алкил, NH(CO)OC1-C4-алкил, NH(CO)C5-C6-арил,

35 R2 означает C5-C6-арил или C5-C6-гетероарил, содержащий одну или несколько используемых в сочетании друг с другом групп, выбранных из H, OH, нитро, галоген, C1-C4-алкокси, где C5-C6-гетероарил означает 5-6-членный арил с 1 или 2 гетероатомами, выбранными из группы O, N, S.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что введение является разовым или осуществляется курсом, частоту введения и его длительность выбирают в зависимости
 40 от характера и степени выраженности заболевания или от состояния субъекта.

3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что терапевтически эффективное количество соединения (I) составляет 5-50 мг/кг массы тела субъекта.

4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что соединение формулы (I) представляет собой 3-(пиридин-2-илметил)-2-оксиндол.

45 5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что соединение формулы (I) представляет собой 3-(4-нитробензилиден)-5-метоксикарбониламино-2-оксинол.

6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что введение осуществляют перорально или парентерально.

7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что соединение формулы (I) вводят в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем.

5

10

15

20

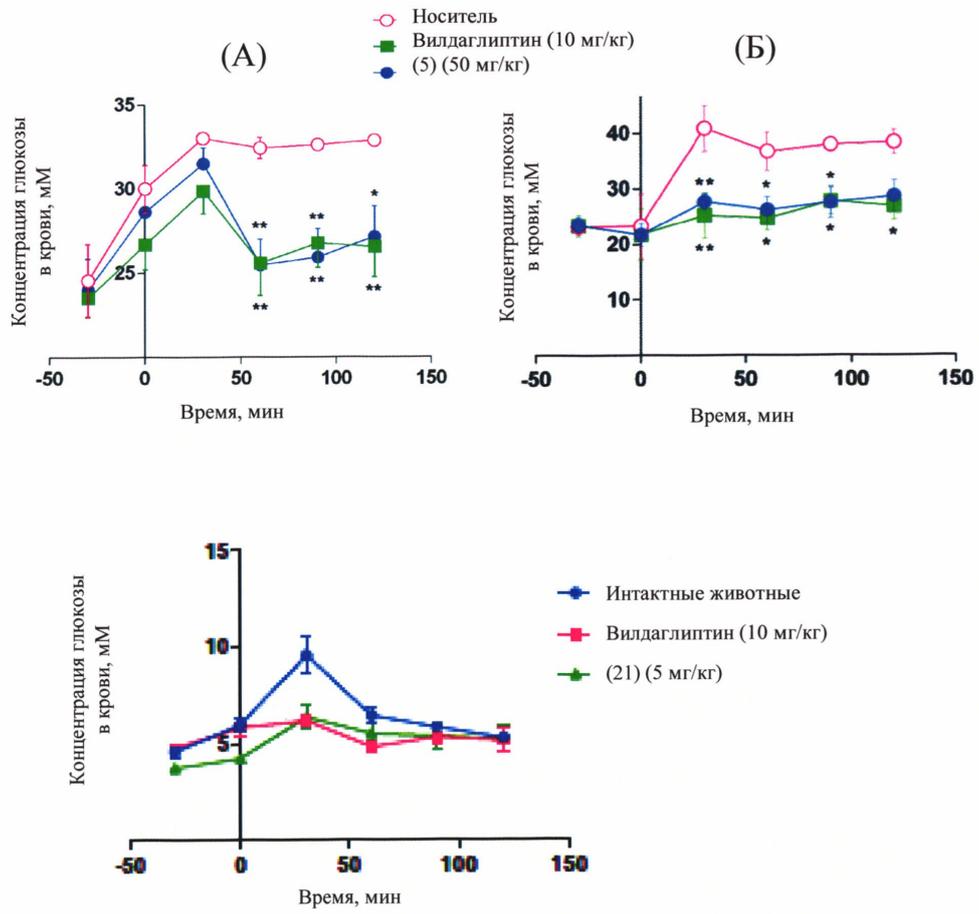
25

30

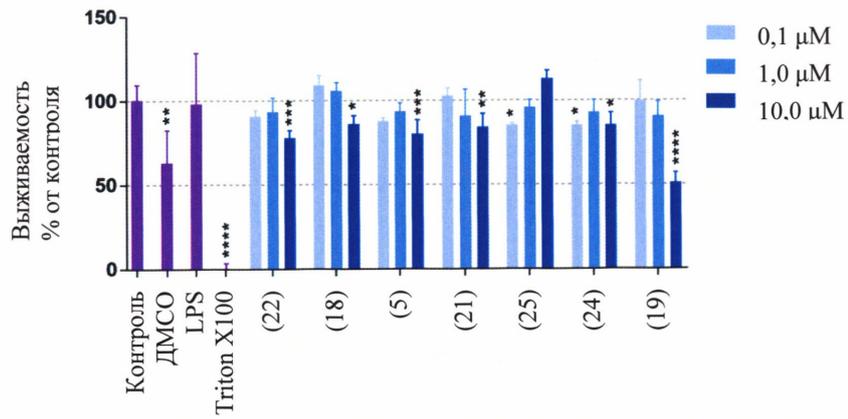
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2