

УДК 547.862+615.9

Г. І. Дума¹, К. Д. Сазонов², Л. С. Ляхов¹, С. В. Топоров², С. А. Ляхов¹¹Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, відділ медичної хімії; 86, Люстдорфська дорога, Одеса, 65080, e-mail: sergey_a_lyakhov@ukr.net²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна, 65082; e-mail:toporov.sergey03@gmail.com

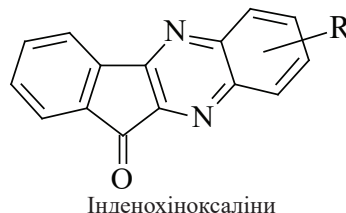
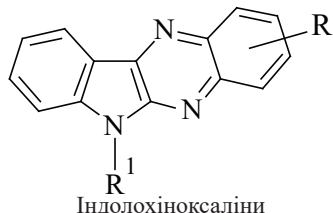
6- ТА 7-АМІНОМЕТИЛ-11Н-ІНДЕНО[1,2-В]ХІНОКСАЛІН-11-ОНИ – СИНТЕЗ, АФІНІТЕТ ДО ДНК ТА ТОКСИЧНІСТЬ

Синтезовані нові похідні інденохіноксаліну – 6-амінометил-11Н-індено[1,2-в]хіноксалін-11-они та 7-амінометил-11Н-індено[1,2-в]хіноксалін-11-они, показано, що вони є інтеркаляторами ДНК з афінитетом на рівні противірусного агенту та індуктору інтерферону аміксину та в цілому менш токсичні за нього, що зумовлює доцільність їх подальшого дослідження як потенційних противірусних агентів.

Ключові слова: амінометил-11Н-індено[1,2-в]хіноксалін-11-они, синтез, інтеркаляція, афінитет, токсичність.

Показано, що планарні поліциклічні сполуки здатні інтеркалювати в ДНК, розміщуючи планарну частину між двома сусідніми комплементарними парами основ [1], та завдяки цьому стабілізувати подвійну спіраль [2, 3]. Така стабілізація має призводити та призводить до уповільнення або повного інгібування процесів транскрипції та реплікації нуклеїнових кислот [4], що в свою чергу має супроводжуватися уповільненням або термінацією репродукції інфекційних агентів та розвитку злоякісних новоутворень [5]. Оскільки інтеркаляція в двоспиральні полінуклеотиди принципово не залежить від послідовності пар нуклеотидів (лише дещо змінюється афінитет), то, зважаючи на гетерогенність геному як мішені інтеркалятору, ефективність взаємодії інтеркаляторів із геномом збудника і, кінець кінцем, ефективність інтеркалятору як протиінфекційного агенту має бути мало чутливою до мутацій, які часто-густо супроводжують репродукцію вірусів та бактерій [6].

Продуктивність цього підходу – використання здатності сполуки до інтеркаляції в ДНК як предиктору наявності в неї противірусної активності – продемонстровано в десятках робіт. Зазначимо окремо наявність противірусної активності у таких інтеркаляторів ДНК як акридини [7, 8], флуоренони [9], нафталіміди [10], індолохіноксаліни [11, 12] тощо. Структурно близькими до останніх є інденохіноксаліни, для яких здатність до інтеркаляції у ДНК показана лише опосередковано – за інгібуванням топоізомерази [13], хоча кількісно афінитет не досліджувався.



Таким чином, метою роботи став синтез амінометильних похідних інденохіноксаліну, дослідження їх афінитету до ДНК та прескринінгова оцінка їх токсичних властивостей.

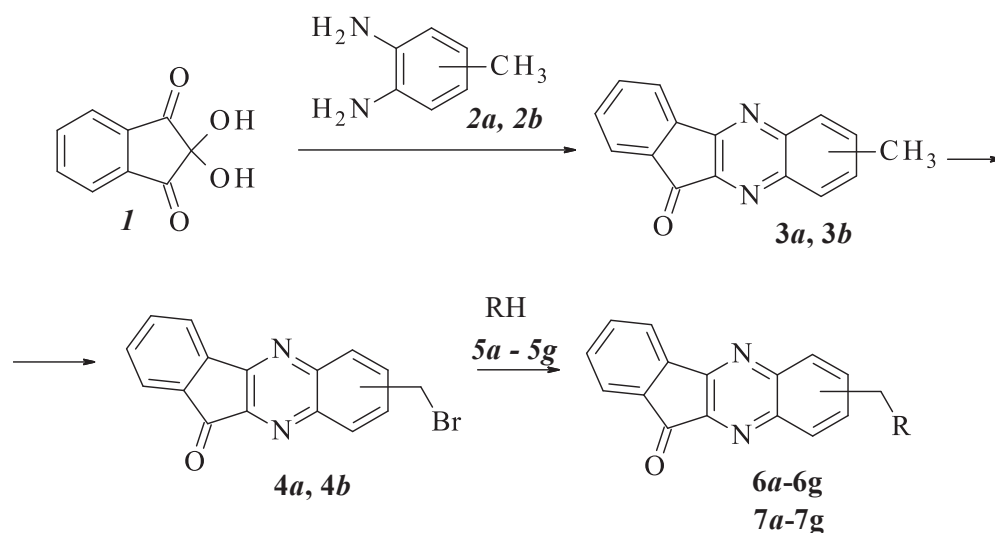
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Синтез цільових амінометилінденохіноксалінів здійснювали за описаною в літературі [13] послідовністю стадій, відображених на схемі. Конденсацією нінгідрину (**1**) з комерційно доступними 2,3- (**2a**) або 3,4-діамінотолуеном (**2b**) в киплячому етанолі отримували 6-метил- (**3a**) та 7-метил-інденохіноксаліни (**3b**), відповідно. Будова виділених ізомерів **3a** та **3b** приписана на підставі даних літератури [14]. Відповідні бромпохідні **4a** та **4b** отримували дією N-бромосукциніміду на **3a** та **3b** в киплячому тетрахлорометані у присутності перекису бензоїлу за [13]. Амінодебромовання проводили дією двократного надлишку вторинних амінів **5a – 5g** в органічному розчиннику при кімнатній температурі [13]. Структура амінометилінденохіноксалін-11-онів **6a – 6g** та **7a – 7g** підтверджена даними мас-спектрометрії та ІЧ-спектроскопії.

В мас-спектрах БША всіх синтезованих сполук наявні піки протонованих молекулярних іонів, а значення m/z осколкових відповідають загальноприйнятому шляху фрагментації з найбільш типовим піком з $m/z = 246$, що відповідає відщепленню аліфатичного аміну від протонованого молекулярного іону.

Схема синтезу 6- та 7-амінометил-11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів (сполуки **6a – 6g** та **7a – 7g**, відповідно)

Scheme of the 6- and 7-aminomethyl-11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-ones (compounds **6a – 6g** та **7a – 7g** correspondently)



Будова аміногрупи

R						
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>

В ІЧ-спектрах спостерігаються смуги поглинання, характерні для карбонільної групи ($1721 - 1739 \text{ см}^{-1}$), симетричних деформаційних коливань СН-зв'язків в $\text{CH}_2\text{-N}$ (1430 см^{-1}), С=C-зв'язків ароматичних кілець ($1442 - 1456 \text{ см}^{-1}$), валентних коливань аліфатичних та ароматичних С-Н-зв'язків ($2787 - 2802$ і $2921 - 2972$ та $3014 - 3049$ і $3057 - 3064 \text{ см}^{-1}$, відповідно).

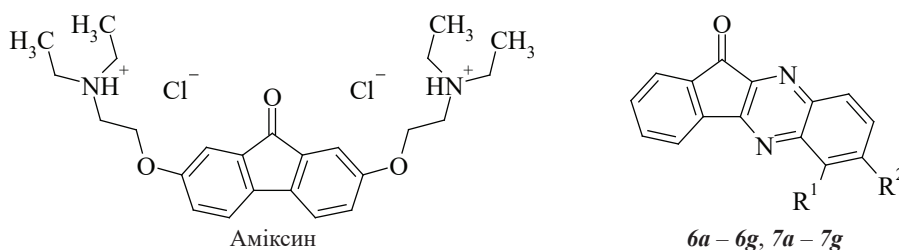
Здатність сполук **6a – 6g** та **7a – 7g** до інтеркаляції в ДНК впливає з їх здатності конкурувати з етидієм бромідом за місця зв'язування з ДНК, що супроводжується зниженням інтенсивності флуоресценції інтеркальованого у ДНК етидію броміду. Афінитет синтезованих сполук до ДНК тимусу теляти досліджували описаним методом конкуренції з етидієм бромідом в його планшетному варіанті [15], результати як величини логарифмів констант асоціації сполук із ДНК наведені в таблиці.

Таблиця

Афінитет досліджуваних сполук та аміксину до ДНК та їхня токсичність в 24-годинному тесті на наупліях *A. parthenogenetica*

Table

Affinity of the tested compounds and amixine to DNA and their toxicity in the 24-hour toxicity test against *A. parthenogenetica*



Сполука	R ¹	R ²	R	lgK ± SE	-lg(LC ₅₀ , M) ± SE
<i>Аміксин</i>	–	–	–	6.54 ± 0.03	4.05 ± 0.02
<i>6a</i>	CH ₂ R	H		6.77 ± 0.06	3
<i>6b</i>	CH ₂ R	H		6.44 ± 0.08	< 2.70

Продовження таблиці

Сполука	R ¹	R ²	R	lgK ± SE	-lg(LC ₅₀ , M) ± SE
6c	CH ₂ R	H		6.74 ± 0.06	2.93 ± 0.03
6d	CH ₂ R	H		6.76 ± 0.06	2.96 ± 0.03
6e	CH ₂ R	H		6.65 ± 0.08	2.53 ± 0.03
6f	CH ₂ R	H		6.26 ± 0.08	< 2.70
6g	CH ₂ R	H		5.65 ± 0.19	4.17 ± 0.03
7a	H	CH ₂ R		6.65 ± 0.04	2.89 ± 0.03
7b	H	CH ₂ R		6.27 ± 0.03	3.82 ± 0.1
7c	H	CH ₂ R		6.27 ± 0.07	< 2.70
7d	H	CH ₂ R		6.32 ± 0.08	4.08 ± 0.12
7e	H	CH ₂ R		6.1 ± 0.13	3.1 ± 0.04
7f	H	CH ₂ R		6.22 ± 0.04	3.16 ± 0.03
7g	H	CH ₂ R		6.05 ± 0.05	< 2.70

Примітки до таблиці: SE – стандартна похибка нелінійної апроксимації експериментальних даних кривою «Доза-ефект»

З наведених результатів видно, що синтезовані сполуки **6a** – **6g** та **7a** – **7g** за своїм афінитетом близьки до аміксіну. Двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) результатів, згрупованих у два фактори (будова аміногрупи – 7 рівней та положення замісника – два рівня) не дозволяє вважати жодний з них значущим на рівні $P < 0.05$ для афінитету ($F = 2.788$ та 2.564 при $F_{\text{крит}} = 4.284$ та 5.987 , відповідно, рівні довірчої ймовірності P складають 0.119 та 0.160 , відповідно).

Цитотоксичність сполук досліджена в тесті 24-годинної токсичності відносно *A. parthenogenetica* аналогічно описаному в [15]. Результати дослідження наведені в таблиці. Для сполук **6b**, **6f**, **7c** та **7g** значення $-lgLC_{50}$ визначити не вдалося, – в дослідженому діапазоні концентрацій ($2 \mu\text{M}$ – 2mM) токсичний вплив на науплії не спостерігався, а для сполуки **6a** це значення вдалося обрахувати тільки екстраполяцією (загибель науплій при максимальній концентрації досліджуваної речовини (2mM) була меншою за 50%).

Сполуки **6f**, **7b** та **7d** за токсичністю були близькими до препарату порівняння – аміксіну з LC_{50} на рівні $100 \mu\text{M}$, для решти сполук ця величина була приблизно на 1 порядок вищою.

Кореляція між афінитетом до ДНК та токсичністю синтезованих сполук виявилась незначущою на рівні $P < 0.05$.

Таким чином, синтезовані в цій роботі сполуки є низькотоксичними інтеркаляторами ДНК перспективними для подальших досліджень як потенційні протівірусні агенти.

МАТЕРІАЛИ, ОБЛАДНАННЯ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для синтезу використовували комерційно доступні реагенти та розчинники кваліфікацією не нижче «ч». Реагенти для дослідження афінитету сполук до ДНК – реагенти кваліфікацією не нижче «ч.д.а.», етидій бромід (Sigma-Aldrich, E7637).

Для приготування середовища для вилуплення науплій та маніпуляцій з ними використовували NaCl «осч.» із вмістом йодиду не вище 0.001% .

При готуванні розчинів використаний мірний посуд різного номіналу II класу точності. Дозатор піпеточний Labsystems 4500 (20 – $200 \mu\text{L}$); колби мірні 25 , 50 , 500 , 1000мл .

Цифровий фотоапарат Olympus Camedia C760 UZ з параметрами: CCD (ПЗС-матриця), $3,2 \text{млн}$ пікселів, Об'єктив – $10 \times$ зум, $f / 2.8-3.7$ (42 – 420мм на 35-мм еквіваленті).

– рН-метр – Seven Compact S230 (Mettler Toledo)

– Ваги лабораторні ВЛР-20, II класу

Мас-спектри БША зареєстровані на спектрометрі VG 70-70 EQ. Іонізація здійснювалася пучком атомів аргону з енергією 10kV (речовини розчиняли у 3-нітробензиловому спирті).

ІЧ-спектри отримані на приладі Frontier FT-IR (PerkinElmer) в таблетках KBr. Оптична система дозволяє отримувати дані у діапазоні від 7800 до 220см^{-1} з найкращою роздільною здатністю в 0.4см^{-1} .

Методи синтезу

6-Метил-11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (3a). До розчину 8.9г (0.05моль) нінгідрину (**1**) в 60мл киплячого етанолу при перемішуванні додають однократно

розчин 6.1 г (0.05 моль) 2,3-діамінотолуену (**2a**) в 40 мл етанолу. Реакційну суміш витримують близько 30 хвилин при 70 – 80 °С при перемішуванні. Після охолодження суміші до кімнатної температури жовтий осад, що випав, відфільтровують, промивають на фільтрі холодним етанолом та висушують в вакуумі до постійної ваги. Вихід 5.6 г (45 %). Тпл. 226 – 227 °С (222 – 224 °С [13]). М.В. 246.27. $C_{16}H_{10}N_2O$.

Аналогічно отримують сполуку **3b**.

7-Метил-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (3b). Вихід 7.76 г (69 %). Тпл. 200 – 201 °С. М.В. 246.27. $C_{16}H_{10}N_2O$. Мас-спектр, m/z (I, %): 246 (100 %).

6-Бромометил-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (4a). Суміш 3.08 г (0.01 моль) 6-метилінденохіноксаліну (**3a**), 3.56 г N-бромосукциніміду (0.02 моль) та 0.31 г перекису бензоїлу (0.001 моль) в 100 мл CCl_4 кип'яють 2 години (контроль за ТШХ). Після охолодження додають 40 мл етанолу та перемішують 10 хв. Осад, що утворився, відфільтровують, промивають етанолом (20 мл) та перекристалізують із суміші етанолу з дихлорометаном (4:1). Висушують в вакуумі до постійної ваги. Вихід 3.5 г (86 %). Тпл. 258 – 259 °С (258 – 260 °С [13]). М.В. 325.17. $C_{16}H_9BrN_2O$.

Аналогічно отримують **4b**.

7-Бромометил-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (4b). Вихід 3.67 г (66 %). Тпл. 255 – 256 °С. М.В. 325.17. $C_{16}H_9BrN_2O$. Мас-спектр, m/z (I, %): 324, 326 (8, 8 %); 245 (100 %).

6-[(4-Метилпіперазин-1-іл)метил]-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (6a). До розчину 1 г (0.31 ммоль) 6-(бромометил)-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону (**4a**) в 20 мл ТГФ при кімнатній температурі додають 620 мкл 1-метилпіперазину та перемішують до зникнення **4a** в реакційній суміші (контроль за ТШХ – силікагель, елюент $CH_2Cl_2/MeOH$ 10/1). Розчин фільтрують через складчастий паперовий фільтр, фільтрат упарюють, залишок розчиняють в 50 мл хлороформу та екстрагують 0.05 – 0.1 % хлоридною кислотою. До водного екстракту додають концентрований розчин карбонату калію чи натрію до рН = 9 – 10 та екстрагують хлороформом. Органічний шар відокремлюють, висушують сульфатом натрію. Розчин упарюють досуха та перекристалізують з гексану. Вихід кристалічного продукту реакції 0.47 г (44 %). Тпл. 200 – 201 °С. $C_{21}H_{20}N_4O$. М.В. 344.42. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 345 (54); 246 (12).

Аналогічно отримують сполуки **6b – 6g; 7a – 7g**

6-(Морфолін-4-ілметил)-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (6b). Вихід: 46 %. Тпл. 236 – 237 °С (237 – 238 °С [13]). $C_{20}H_{17}N_3O_2$. М.В. 331.38. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 332 (45); 246 (100).

6-[(4-Метилпіперідин-1-іл)метил]-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (6c). Вихід: 7 %. Тпл. 190 – 191 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (40); 246 (100).

6-(Піперідин-1-ілметил)-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (6d). Вихід: 32 %. Тпл. 190 – 191 °С (175 – 176 °С [13]). $C_{21}H_{19}N_3O$. М.В. 329.41. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 330 (8); 246 (100).

6-[(Діетиламіно)метил]-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он (6e). Вихід: 41 %. Тпл. 192 – 193 °С. $C_{20}H_{19}N_3O$. М.В. 317.39. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 318 (100); 246 (69).

6-(Азепам-1-илметил)-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (6f).

Вихід 0.01 г (1 %). Тпл. 170 – 171 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (32); 245 (33).

6-[(2-Метилпіперидин-1-ил)метил]-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (6g).

Вихід: 23 %. Тпл. 131 – 132 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (100); 245 (38).

7-[(4-Метилпіперазин-1-ил)метил]-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7a).

Вихід: 0.51 г (48 %). Тпл. 141 – 142 °С. $C_{21}H_{20}N_4O$. М.В. 344.42. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 345 (100); 245 (71).

7-(Морфолін-4-илметил)-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7b).

Вихід: 67 %. Тпл. 181 – 182 °С. $C_{20}H_{17}N_3O_2$. М.В. 331.38. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 332 (60).

7-[(4-Метилпіперидин-1-ил)метил]-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7c).

Вихід: 17 %. Тпл. 151 – 152 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (100); 245 (33).

7-(Піперидин-1-илметил)-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7d).

Вихід: 51 %. Тпл. 140 – 141 °С. $C_{21}H_{19}N_3O$. М.В. 329.41. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 330 (35); 246 (100).

7-[(Діетиламіно)метил]-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7e).

Вихід: 28 %. Тпл. 121 – 122 °С. $C_{20}H_{19}N_3O$. М.В. 317.39. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 318 (100); 245 (46).

7-(Азепам-1-илметил)-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7f).

Вихід: 5 %. Тпл. 193 – 194 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (33); 245 (10).

7-[(2-Метилпіперидин-1-ил)метил]-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-он (7g).

Вихід: 6 %. Тпл. 188 – 189 °С. $C_{22}H_{21}N_3O$. М.В. 343.43. Мас-спектр БША, m/z (I %): $[MH^+]$ 344 (13); 245 (15).

Приготування розчинів сполук для дослідження афінитету та токсичності.

Концентровані розчини сполук для тестування готують розчиненням наважки (близько 5 мг) у розрахунковій кількості 0.1 М НСІ із додаванням дистильованої води до повного розчинення зразка. Робочі розчини для експериментів готують розведенням концентрованих розчинів дистильованою водою та/або розчином NaCl до концентрації 4 мМ (при використанні розчину NaCl його концентрація в робочому розчині для тестування токсичності на *A. parthenogenetica* має становити 0.3 М).

Отримання науплій *A. parthenogenetica* для дослідження токсичності.

Цисти артемії (Куюльницький лиман, Одеська область, Україна; зібрані, очищені, ідентифіковані та люб'язно надані для дослідження старшим науковим співробітником відділу якості водного середовища Інституту морської біології НАН України Кошелевим О.М.) витримують в прозорому пласкому контейнері без аерації при постійному освітленні в 0.3 М розчині NaCl доведеному розчином Na_2CO_3 до рН 7.5 впродовж 36 – 48 годин при навантаженні 100 мг цист в 50 мл розчину. Науплій, що вилупились, концентрують в одному з кутків контейнеру, використовуючи їх позитивний фототаксис, та збирають піпеткою разом з маточним розчином. Підраховують під бінокулярним мікроскопом ($\times 12.5$) кількість науплій в 50

мкл суспензії та видаляють або додають розчин солі за необхідністю так, щоб в суспензії заселеність науплій складала 17 – 20 особин в 50 мкл.

Дослідження токсичності сполук в 24-годинному тесті.

В лунках культурального 96-лункового планшету з плоским дном лунок серією послідовних розведень готують серію розчинів досліджуваної сполуки в 0.3 М розчині NaCl в діапазоні концентрацій 1.95 – 4000 μM , по 50 μl розчину в трьох паралелях кожної концентрації кожної сполуки. В кожну лунку додають по 50 μl отриманої суспензії науплій. Планшет закривають кришкою та залишають на 24 години при 25 °C при освітлені 16/24. Підраховують кількість загиблих науплій, в лунки планшету додають по 100 μl метанолу та через 15 хвилин підраховують загальну їх кількість. Розраховують відсоток загиблих науплій для кожної концентрації досліджуваної сполуки та логарифм концентрації, ці пари значень апроксимують кривою «Доза-ефект», визначаючи значення $\lg LC_{50}$.

Дослідження афінитету синтезованих сполук до ДНК.

В лунках чорного непрозорого культурального 96-лункового планшету з плоским дном лунок готують для кожної сполуки в трьох паралелях серію з 10 розчинів, що містять $1.0606 \cdot 10^{-5}$ М ДНК тимусу теляти; $1.26805 \cdot 10^{-5}$ М етидію броміду; $1.8655 \cdot 10^{-2}$ М NaCl; $3.998 \cdot 10^{-3}$ М CH_3COONa (доведений до pH = 5.5 додаванням оцтової кислоти); $2.4637 \cdot 10^{-4}$ М ЕДТА та досліджувану сполуку в діапазоні концентрацій 2 – 2000 μM (по 100 мкл розчинів в лунці). В лунку 11 кожної лінії поміщають 100 мкл 100 % контролю (такого ж розчину, але без досліджуваної сполуки – 100К), а в лунку 12 – 100 мкл 0 % контролю (те ж саме, що й 11, але ще й без етидію броміду – 0К).

Планшет залишають на 10 – 15 хвилин, розміщують на світофільтрі транслюмінатору (365 нм) та фотографують цифровою фотокамерою в режимі кольорової нічної зйомки, зберігаючи фотографії в форматі *.tiff без стиснення.

Отриману фотографію розділяють на кольорові канали засобами програми ImageJ 1.48, образ червоного каналу оцифровують засобами програми Arga Analysis пакету TotalLab. Отримані значення світимості (для $\lambda > 600$ нм) переносять в Excel для розрахунку значень за трьома паралелями для кожної сполуки в кожній концентрації та відповідних їм 100К та 0К (I_x , I_{100K} , I_{0K} , відповідно). З отриманих значень розраховують ступінь інгібування (S_x) флуоресценції етидію кожною сполукою (ступінь його витиснення з комплексу з ДНК) за рівнянням 1. Результати як пари значень « $\lg C_x - S_x$ » переносять в програму Origin та, проводячи її засобами нелінійну апроксимацію функцією «Доза-ефект», отримують значення $\lg C_{50}$, з яких відповідно до [16] розраховують значення логарифму константи асоціації сполуки з ДНК за рівнянням 2.

$$S_x = \frac{I_{100K} - I_x}{I_{100K} - I_{0K}} \times 100\%; \quad (1)$$

$$\lg K_x = 7 - \lg C_{50} + \lg C_E. \quad (2)$$

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Lerman L.S.* Structural considerations in the interaction of DNA and acridines // *J. Mol. Biol.* – 1961. – Vol. 3, N 1. – P. 18 – 30. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80004-1)
2. *Douthart R.J., Burnett J.P., Beasley F.W., Frank B.H.* Binding of ethidium bromide to double-stranded ribonucleic acid // *Biochemistry.* – 1973. – Vol. 12, N 2. – P. 214 – 220. <https://doi.org/10.1021/bi00726a006>
3. *Berman H.M., Young P.R.* The Interaction of Intercalating Drugs with Nucleic Acids // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1981. – Vol. 10, N 1. – P. 87 – 114. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.10.060181.000511>
4. *Piestrzeniewicz M., Studzian K., Wilmanska D., Plucienniczak G., Gniazdowski M.* Effect of DNA-interacting drugs on phage T7 RNA polymerase // *Acta Biochim.Pol.* – 1998. – Vol. 45, N 1. – P. 127 – 132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701505>
5. *Acheson R.M., Taylor G.N., Waring M.J., Haylock S., Abel G.* The intercalative DNA binding and antitumor activity of some bis-acridines related to nitracrine // *Chem. Biol. Interact.* – 1985. – Vol. 53, – P. 371 – 375. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(85\)80111-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(85)80111-3)
6. *Drake J.W.* The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 870. – P. 100 – 107. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08870.x>
7. *Mucsi I., Molnar J., Tanaka M., Santelli-Rouvier C., Patelis A.M., Galy J.P., Barbe J.* Effect of acridine derivatives on the multiplication of herpes simplex virus // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, N 4C. – P. 3011 – 3015.
8. *Loddo R., Francesconi Vol., Laurini E., Boccardo S., Aulic S., Fermeglia M., Priel S., Tonelli M.* 9-Aminoacridine-based agents impair the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) replication targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26, N 4. – P. 855 – 868. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.001>
9. *Andrews E.R., Fleming R.W., Grisar J.M., Kihm J.C., Wenstrup D.L., Mayer G.D.* Bis-basic-substituted polycyclic aromatic compounds. A new class of antiviral agents. 2. Tilorone and related bis-basic ethers of fluorenone, fluorenone, and fluorene // *J. Med. Chem.* – 1974. – Vol. 17, N 8. – P. 882 – 886. <https://doi.org/10.1021/jm00254a020>
10. *Garcia-Gancedo A., Gil C., Roldan C.M., Perez S., Vilas P.* Antiviral action of benzo[de]isoquinoline-1,3-diones: 5-nitro-2-(2-dimethyl-aminoethyl) and 5-nitro-2-[2-(1-pyrrolidine)-ethyl] derivatives // *Chemotherapy.* – 1979. – Vol. 25, N 2. – P. 83 – 90.
11. *Harmenberg J., Wahren B., Bergman J., Akerfeldt S., Lundblad L.* Antiherpesvirus activity and mechanism of action of indolo[1,2-b]quinoxaline and analogs // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1988. – Vol. 32, N 11. – P. 1720 – 1724. <https://doi.org/10.1128/aac.32.11.1720>
12. *Shibinskaya M.O., Lyakhov S.A., Mazepa A.Vol., Andronati S.A., Turov A.Vol., Zholobak N.M., Spivak N.Y.* Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[1,2-b]quinoxalines // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 45, N 3. – P. 1237 – 1243. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.014>
13. *Tseng C.H., Chen Y.R., Tzeng C.C., Liu W., Chou C.K., Chiu C.C., Chen Y.L.* Discovery of indeno[1,2-b]quinoxaline derivatives as potential anticancer agents // *Eur.J.Med.Chem.* – 2016. – Vol. 108, N . – P. 258 – 273. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.031>
14. *Deady L.W., Desneves J., Ross A.C.* Synthesis of some 11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-ones // *Tetrahedron.* – 1993. – Vol. 49, N 43. – P. 9823 – 9828. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80184-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80184-8)
15. *Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M., Gupta M.P., Phillipson J.D.* A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp) // *Planta Med.* – 1993. – Vol. 59, N 3. – P. 250 – 252. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959661>
16. *Antonini I., Polucci P., Kelland L.R., Menta E., Pescalli N., Martelli S.* 2,3-Dihydro-1H,7H-pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-trione Derivatives, a Class of Cytotoxic Agents Active on Multidrug-Resistant Cell Lines: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42, N 14. – P. 2535 – 2541. <https://doi.org/10.1021/jm9805586>

Стаття надійшла до редакції 03.01.2020

А. И. Дума¹, К. Д. Сазонов², Л. С. Ляхов¹, С. В. Топоров², С. А. Ляхов¹

¹Физико-химический институт имени А. В. Богатского НАН Украины, отдел медицинской химии; 86, Люстдорфская дорога, Одесса, Украина, 65080, e-mail: sergey_a_lyakhov@ukr.net

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина, 65082; e-mail:toporov.sergey03@gmail.com

6- И 7-АМИНОМЕТИЛ-11Н-ИНДЕНО[1,2-β]ХИНОКСАЛИН-11-ОНЫ – СИНТЕЗ, АФФИНИТЕТ К ДНК И ТОКСИЧНОСТЬ

С целью получения новых интеркаляторов ДНК с потенциальной противовирусной активностью, обусловленной их способностью интеркалировать в ДНК, синтезированы 6- и 7-аминометил-11Н-индено[1,2-β]хиноксалин-11-оны. Синтез проводили конденсацией нингидрина с 2,3- и 3,4-диаминотолуолами с последующим бромированием N-бромсукцинимидом и аминодебромированием соответствующих бромметильных производных действием избытка вторичных аминов. Структуры синтезированных соединений подтверждены масс-спектрометрией и ИК-спектроскопией. Пики молекулярных ионов присутствуют в масс-спектрах всех соединений, полосы поглощения в ИК-спектрах соответствуют имеющимся функциональным группам. Сродство синтезированных соединений к ДНК исследовали путем конкуренции с бромидом этидия, и было показано, что сродство этих соединений близко к сродству амиксина ($\lg K_a = 5.7 - 6.8$). Структура аминогрупп и положение заместителя существенно не влияет на аффинитет на уровне $P < 0.05$. Токсичность синтезированных соединений оценивали в 24-часовом тесте на токсичность в отношении *A. parthenogenetica*, в котором эти соединения в большинстве случаев были менее токсичными, чем амиксин, со значениями $-\lg LC_{50}$ не превышающими 4.

Ключевые слова: аминометил-11Н-индено[1,2-β]хиноксалин-11-оны, синтез, интеркаляция, аффинитет, токсичность.

H. I. Duma¹, K. D. Sazonov², L. S. Liakhov¹, S. V. Toporov², S. A. Liakhov¹

¹O. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Department of Medicinal Chemistry; 86, Lustdorfska Road, Odesa, Ukraine, 65080;

e-mail: sergey_a_lyakhov@ukr.net

²I. I. Mechnykov Odesa National University, Odesa, Ukraine, 65082;

e-mail: toporov.sergey03@gmail.com

6- AND 7-AMINOMETHYL-11H-INDENO[1,2-β]QUINOXALINE-11-ONES – SYNTHESIS, DNA AFFINITY AND TOXICITY

The actuality of the antivirals design and synthesis capable to the reproduction inhibition of emerging and mutated viruses is now especially evident against the background of the SARS-CoV-2 outbreak in the world. New 6- and 7-aminomethyl-11H-indeno[2,3-b]quinoxalin-11-ones (AMIQ) were synthesized to obtain new DNA intercalators with the expected antiviral activity caused of their ability to intercalate DNA. The synthesis was performed by condensation of ninhydrin with 2,3- and 3,4-diaminotoluenes, followed by N-bromosuccinimide bromination and amino-debromination by the action of an excess of secondary amines on the corresponding bromomethyl derivatives. The structures of the synthesized compounds were confirmed by mass spectrometry and IR-spectroscopy. The molecular ion peaks present at the mass spectra of all compounds, m/z values of fragmentation ions correspond to the trivial fragmentation rate; absorption bands in the IR spectra correspond to the presented functional groups. All synthesized AMIQ demonstrate the ability to compete with ethidium

bromide for DNA binding sites, which is typical for DNA intercalators. The AMIQ affinity to DNA was investigated by this method and appeared as close to that of amixine (lgKa = 5.7 – 6.8). The amino groups' structure and the position of the substituent do not significantly affect the affinity at $P < 0.05$. AMIQ toxicity was evaluated in a 24-hour toxicity test against *A. parthenogenetica*, in which these compounds were less toxic than amixine in most cases with $-lgLC_{50}$ values less than 4. Obtained results testify to perspective of the further AMIQ and their analogs investigations as potential broad spectra antiviral agents.

Keywords: aminomethyl-11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-ones, synthesis, intercalation, affinity, toxicity.

REFERENCES

1. Lerman L.S. *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*. J. Mol. Biol, 1961, vol. 3, no 1, pp. 18-30. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80004-1)
2. Douthart R.J., Burnett J.P., Beasley F.W., Frank B.H. *Binding of ethidium bromide to double-stranded ribonucleic acid*. Biochemistry, 1973, vol. 12, no 2, pp. 214-220. <https://doi.org/10.1021/bi00726a006>
3. Berman H.M., Young P.R. *The Interaction of Intercalating Drugs with Nucleic Acids*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng, 1981, vol. 10, no 1, pp. 87-114. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.10.060181.000511>
4. Piestrzeniewicz M., Studzian K., Wilmanska D., Plucienniczak G., Gniazdowski M. *Effect of DNA-interacting drugs on phage T7 RNA polymerase*. Acta Biochim.Pol, 1998, vol. 45, no 1, pp. 127-132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701505>
5. Acheson R.M., Taylor G.N., Waring M.J., Haylock S., Abel G. *The intercalative DNA binding and antitumor activity of some bis-acridines related to nitracrine*. Chem. Biol. Interact, 1985, vol. 53, pp. 371-375. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(85\)80111-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(85)80111-3)
6. Drake J.W. *The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes*. Ann. N. Y. Acad. Sci, 1999, vol. 870, pp. 100-107. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08870.x>
7. Muesi I., Molnar J., Tanaka M., Santelli-Rouvier C., Patelis A.M., Galy J.P., Barbe J. *Effect of acridine derivatives on the multiplication of herpes simplex virus*. Anticancer Res, 1998, vol. 18, no 4C, pp. 3011-3015.
8. Loddo R., Francesconi vol., Laurini E., Boccardo S., Aulic S., Fermeglia M., Pricl S., Tonelli M. *9-Aminoacridine-based agents impair the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) replication targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)*. Bioorg. Med. Chem, 2018, vol. 26, no 4, pp. 855-868. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.001>
9. Andrews E.R., Fleming R.W., Grisar J.M., Kihm J.C., Wenstrup D.L., Mayer G.D. *Bis-basic-substituted polycyclic aromatic compounds. A new class of antiviral agents. 2. Tilorone and related bis-basic ethers of fluorenone, fluorenol, and fluorene*. J. Med. Chem, 1974, vol. 17, no 8, pp. 882-886. <https://doi.org/10.1021/jm00254a020>
10. Garcia-Gancedo A., Gil C., Roldan C.M., Perez S., Vilas P. *Antiviral action of benzo[de]isoquinoline-1,3-diones: 5-nitro-2-(2-dimethyl-aminoethyl) and 5-nitro-2-[2-(1-pyrrolidine)-ethyl] derivatives*. Chemotherapy, 1979, vol. 25, no 2, pp. 83-90.
11. Harmenberg J., Wahren B., Bergman J., Akerfeldt S., Lundblad L. *Antiherpesvirus activity and mechanism of action of indolo[2,3-b]quinoxaline and analogs*. Antimicrob. Agents Chemother, 1988, vol. 32, no 11, pp. 1720-1724. <https://doi.org/10.1128/aac.32.11.1720>
12. Shibinskaya M.O., Lyakhov S.A., Mazepa A.vol., Andronati S.A., Turov A.vol., Zholobak N.M., Spivak N.Y. *Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines*. Eur. J. Med. Chem, 2010, vol. 45, no 3, pp. 1237-1243. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.014>
13. Tseng C.H., Chen Y.R., Tzeng C.C., Liu W., Chou C.K., Chiu C.C., Chen Y.L. *Discovery of indenof[1,2-b]quinoxaline derivatives as potential anticancer agents*. Eur.J.Med.Chem, 2016, vol. 108, no , pp. 258-273. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.031>
14. Deady L.W., Desneves J., Ross A.C. *Synthesis of some 11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-ones*. Tetrahedron, 1993, vol. 49, no 43, pp 9823-9828. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80184-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80184-8)
15. Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M., Gupta M.P., Phillipson J.D. *A microwell cytotoxicity assay using Artemia salina (brine shrimp)*. Planta Med, 1993, vol. 59, no 3, pp 250-252. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959661>
16. Antonini I., Polucci P., Kelland L.R., Menta E., Pescalli N., Martelli S. *2,3-Dihydro-1H,7H-pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-trione Derivatives, a Class of Cytotoxic Agents Active on Multidrug-Resistant Cell Lines: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships*. J. Med. Chem, 1999, vol. 42, no 14, pp. 2535-2541. <https://doi.org/10.1021/jm9805586>