УДК 547.85+615.276+615.015.11

К. В. Бондар[1], К. О. Клименко[2], О. І. Александрова[1], І. А. Кравченко[1], І. А. Щепеткін[3], С. А. Ляхов[2]
[1]Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
хімічний факультет, 2, Дворянська, Одеса, Україна, 65082,
bondar_k@ukr.net, aleksa713135@mail.ru
[2]Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
86, Люстдорфська дорога, Одеса, Україна, 65080,
alhimikir@gmail.com, sergey_a_lyakhov@ukr.net
[3]Кафедра імунології та інфекційних хвороб університету штату Монтана,
Бозман, МТ 59717, США, schepetkin@yahoo.com

ІНДЕНО[1,2,3-de]ФТАЛАЗІН-3(2H)-ОН ТА ЙОГО АНАЛОГИ – СИНТЕЗ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ

Біоізостерною модифікацією відомого інгібітору та молекулярним докінгом в JNK здійснений дизайн потенційних протизапальних агентів – інденофталазінону (ІФ) та його аналогів. Конденсацією кетокислот з гідразингідратом ці сполуки були синтезовані та досліджена їх активність в тестах in vitro та in vivo. Показано, що попри низький афінітет до JNK, ІФ проявляє значущу протизапальну активність та може розглядатися як сполука-хіт для подальшого створення протизапальних агентів.

Ключові слова: інденофталазін, синтез, кінази, докінг, прозапальні цитокіни, афінітет, карагінан, набряк, запалення, щури.

Запалення є однією із складових неспецифічної відповіді організму на інфекцію, ушкодження цілісності тканин та стрес. З одного боку воно є одним з елементів імунної відповіді, спрямованим на активізацію клітинного імунітету та нейтралізацію патогенного фактору, з іншого – може викликати тяжкі та хронічні захворювання (сепсис, хвороба Крона, артрити, тощо) і, навіть, спричиняти смерть (летальні пневмонії як ускладнення SARS, MERS, грипу H1N1, тощо). Незважаючи на успішне застосування нестероїдних протизапальних засобів – інгібіторів циклоксигенази – при цілій низці захворювань, що супроводжуються запаленням та болями, їхня ефективність не завжди є задовільною, а довготермінове застосування супроводжується часто-густо тяжкими побічними ефектами. Тому створення нових засобів, що інгібують запальну реакцію на її початкових стадіях, здається перспективним напрямом. Окрім протизапальних властивостей такі сполуки мають проявляти імуномодулюючу активність, що є суттєвим з точки зору протиінфекційної терапії. В Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України достатньо успішно проводиться робота зі створення противірусних агентів широкого спектру дії та імуномодуляторів, які в своїй структурі містять планарні поліциклічні фрагменти карбо- та гетероциклічної природи. Тому планарні поліциклічні інгібітори запального процесу привернули до себе нашу увагу. Серед відомих сполук, що проявляють протизапальну дію, тільки одна – дибензо[cd,g] індазол-6(*2H*)-он (**1**) – є планарною. При цьому ця сполука не тільки є інгібітором JNK – однієї з пулу мітоген-активуємих протеїнкіназ, які опосередковують індукцію прозапальних цитокінів у відповідь на мітогенний фактор, інфекційний агент або стрес [1, 2], – але й противірусним агентом [3 – 6].

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2304-0947.2016.1(57).67512

© К. В. Бондар, К. О. Клименко, О. І. Александрова, І. А. Кравченко, І. А. Щепеткін, С. А. Ляхов, 2016

У зв'язку з цим метою роботи став дизайн планарної поліциклічної структури з вираженими протизапальними властивостями та потенційними противірусною та інтерфероніндукуючою активністями як батьківської для подальшого цілеспрямованого пошуку ефективних протиінфекційних та протизапальних агентів.

Матеріали та методи дослідження

Як вихідні для синтезу використовували комерційно доступні реактиви кваліфікації не нижче «ч». Для контролю перебігу реакцій та чистоти синтезованих речовин використовували метод ТШХ на пластинках «Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ» із застосування елюентів різного складу.

Спектри ^{1}H ЯМР реєстрували в розчинах ДМСО-d_6 відносно сигналу розчинника (2.50 м.ч.) на приборі «Bruker Avance» (400 МГц), мас-спектри електронного удару – на спектрометрі МХ-1321 із прямим введенням зразка. Енергія іонізації електронів 70 еВ, температура джерела 220 °С, мас-спектри FAB – на спектрометрі VG 70-70 EQ. Іонізація здійснювалася пучком атомів аргону з енергією 10 кеV (речовини розчиняли у 3-нітробензиловому спирті). ІЧ-спектри зареєстровані на спектрофотометрі з Фурьє перетворенням SHIMADZU FTIR 8400Sв таблетках KBr.

Мішень для докінгу готували стандартною процедурою «LigX» програми Molecular Operating Environment 2008.10 із оптимізацією умов параметрів розрахунків редокінгом ліганду **1** в складі комплексу із JNK3, результати рентгеноструктурного аналізу якого використовували як модель. Параметри вважаються придатними, якщо величина RMSD (середньо-квадратичне відхілення координат атомів ліганду, отриманих в результаті редокінгу від тих, що були в вихідній моделі) не перевищує 2. Обрані параметри (London dG / Forcefield) забезпечували цю величину на рівні 0.2.

Дослідження впливу сполук на синтез цитокінів здійснювали методом ELISA, як продуценти використовували лінії клітин MonoMac-6 та THP-1Blue.

В експериментах in vivo використовували білих безпородних щурів (віварій ОНМУ) масою 160 – 180 г, які утримувались на стандартному раціоні.

Синтез об'єктів дослідження

9-Оксо-1-флуоренкарбонова кислота (**11** за [7]). Ретельно подрібнюють в ступці 7 г (34.65 ммоль) флуорантену та частково розчиняють цю наважку при перемішуванні в 60 мл безводної оцтової кислоти. Хромовий ангідрид (20 г, 0.2 моль) розчиняють в 20 мл води та додають 30 мл оцтової кислоти. Отриманий розчин додають через крапельну лійку в суміш флуорантену та оцтової кислоти при кімнатній температурі та перемішуванні впродовж 1 – 2 год, перемішують при цій же температурі ще 2 год, нагрівають до кипіння та кип'ятять 1.5 – 2 год із зворотним холодильником до утворення чорно-зеленого розчину.

Після охолодження реакційної суміші до температури 10 – 15 °С осад, що випав, відфільтровують, ретельно промивають на фільтрі водою від солей хрому (до зникнення зеленого забарвлення промивних вод), розчиняють в гарячому водному розчині соди (10 %). Залишки флуорантену, які не вступили в реакцію, і деякі проміжні продукти його окислення відфільтровують, а розчин натрієвої солі підкислюють 10 % сульфатною кислотою до кислої реакції (за індикаторним папером до pH 2 – 3). Кислоту, що випала в осад, відфільтровують, ретельно відмивають на фільтрі від залишків сульфатної кислоти водою та висушують. Перекристалізовують

з оцтової кислоти. Вихід 5.0 – 5.2 г (64.5 – 67.0 %) у вигляді оранжево-червоних кристалів. $T_{пл.}$ 195 – 196 ºС (194 – 195 за [7]). ІЧ-спектр: 1700 – 1750 $см^{-1}$ (С=О кет. + С=О кисл.); 3200 – 3600 $см^{-1}$ (НО кислоти). Мас-спектр, m/z (I, %): 224 (18) [$M^{\cdot+}$]; 180 (100); 152 (37).

Метил 9-оксо-1-флуоренкарбоксилат (**12**). До 2.24 г (0.01 моль) **11** додають 15 мл абсолютного метанолу, 1 мл концентрованої сульфатної кислоти та кип'ятять при перемішуванні 8 год. Реакційну суміш розбавляють 150 мл холодної води, екстрагують хлороформом, органічний шар промивають 5 % розчином карбонату натрію (3 × 15 мл), водою (3 × 15 мл) та висушують хлоридом кальцію. Якщо естер отримують з технічної кислоти, то висушений розчин **12** в хлороформі фільтрують через стовпчик силікагелю (3 × 2 см), який додатково промивають хлороформом (3 × 15 мл). Хлороформ випарюють досуха, сухий залишок екстрагують киплячим гептаном, з якого при охолодженні випадає кристалічний осад (2 г, 84 %). $T_{пл.}$ 98 – 99 ºС (86 – 89 ºС за [8]). ІЧ-спектр: 1709 $см^{-1}$ (С=О кетон); 1732 $см^{-1}$ (С=О естер).

Індено[1,2,3-de]фталазін-3(*2H*)-он (**3**). Наважку 9-оксо-1-флуоренкарбонової кислоти (0.02 моль) розчиняють у 10 мл диметилацетаміду (ДМАА), додають 1.0 мл (0.025 моль) гідразингідрату і кип'ятять суміш впродовж 3 год. Після охолодження розчину до кімнатної температури, осад, що випав, промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл), перекристалізують з ДМАА і промивають ацетоном (3 × 5 мл). Вихід продукту 0.9 г (20 %). $T_{пл.}$ 259 ºС (260 – 262 ºС за [7]). ^{1}Н ЯМР (400 MHz, DMSO-d_6) d м.ч.: 7.40 (д, 1 Н); 7.40 (д, 1 Н); 7.70 (д, 1 Н); 7.80 (д, 1 Н); 7.80 (д, 1 Н); 7.90 (д, 1 Н); 8.10 (д, 1 Н); 12.60 (с, 1 Н); m/z = 220; ІЧ-спектр: 3186 $см^{-1}$ (NH асс.); 3051 $см^{-1}$ (СН аром.); 1666 $см^{-1}$ (С=О); 1627 $см^{-1}$ (С=N). Мас-спектр, m/z (I, %): 220 (90) [$M^{\cdot+}$]; 164 (100); 45 (72).

4-Фенілфталазін-1(*2H*)-он (**4**). Розчиняють у 10 мл ДМАА 4.5 г (0.02 моль) бензоїлбензойної кислоти, додають 1.0 мл гідразингідрату (0.02 моль) і кип'ятять суміш впродовж 3 год. Після охолодження розчину до кімнатної температури, осад, що випав, промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл), перекристалізують з ДМАА і промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл). Вихід 1.9 г (43 %). $T_{пл.}$ 239 – 240 ºС (232 – 234 ºС за [9]). ^{1}Н ЯМР (400 MHz, DMSO-d_6), d м.ч.: 7.48 – 7.61 (м, 5 Н); 7.62 – 7.69 (м, 1 Н); 7.83 – 7.91 (м, 2 Н); 8.30 – 8.36 (м, 1 Н); 12.86 (с, 1 Н). ІЧ-спектр, $см^{-1}$: 3302 (NH асс.); 3156 $см^{-1}$ (NH асс); 2997.48 $см^{-1}$ (СН аром.); 3024 $см^{-1}$ (СН аром.); 3051 $см^{-1}$ (СН аром.); 1666 $см^{-1}$ (С=О); 1604 $см^{-1}$ (С=N); Мас-спектр, m/z (I, %): 223 (100) [$M+H^+$].

Фталазін-1(*2H*)-он (**5**). Суміш 3 г (0.02 моль) 2-формілбензойної кислоти, 1.0 мл (0.02 моль) гідразингідрату та 10 мл етанолу кип'ятять при перемішуванні впродовж 3 годин. Контроль реакції – за ТШХ (хлороформ-ацетон 10:1). Осад, що випав, промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл), перекристалізують з ДМАА і промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл). Вихід: 1.6 г (55 %). $T_{пл.}$ 183 – 185 ºС (182 – 183 ºС за [10]). ІЧ-спектр: 3159 $см^{-1}$ (NH асс.); 3028 $см^{-1}$ (СН аром.); 3009 $см^{-1}$ (СН аром.); 1651 $см^{-1}$ (С=О); 1616 $см^{-1}$ (С=N).

6-Феніл-4,5-дигідропіридазин-3(*2H*)-он (**8**). Суміш 3-бензоілпропанової кислоти 10.0 г (0.056 моль), 2.8 мл гідразингідрату (0.056 моль) та 30 мл етанолу кип'ятять при перемішуванні впродовж 3 годин. Контроль реакції – за ТШХ (хлороформ-ацетон 10:1). Осад, що випав, промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл), перекристалізовують з ДМАА та промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл). Вихід 2.5 г (26 %). $T_{пл.}$ 151 – 152 ºС (150 – 151.5 ºС за [11]). ^{1}Н ЯМР (400 MHz, DMSO-d_6) d м.ч.: 2.40 (т, 2 Н); 2.90 (т, 2 Н); 7.40 (м, 3 Н); 7.70 (д, 2 Н); 10.90 (с, 1 Н);

ІЧ-спектр: 1620 $см^{-1}$ (C=N), 1670 $см^{-1}$ (C=O), 2943 $см^{-1}$ (CH-аліф.), 3086 $см^{-1}$ (CH-аром.), 3194 $см^{-1}$ (NH). Мас-спектр, m/z (I, %): 175 (100) $[M+H^+]$.

6-Метіл-4,5-дигідропіридазин-3(*2H*)-он (**9**). Додають до розчину 10 г (0.086 моль) левулінової кислоти в 25 мл етанолу 5.0 мл (0.086 моль) гідразин-гідрату та кип'ятять при перемішуванні впродовж 3 год. Контроль реакції – за ТШХ (хлороформ-ацетон 10:1). Осад, що випав, промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл), перекристалізовують з ДМАА та промивають ацетоном (3 × 5 мл). Вихід: 3 г (31 %). $T_{пл.}$ 111 – 113 °C (103 – 105 °C [12]). ІЧ-спектр: 1624 $см^{-1}$ (C=N), 1662 $см^{-1}$ (C=O), 2916 $см^{-1}$ (CH-аліф.), 2947 $см^{-1}$ (CH-аліф.), 3190 $см^{-1}$ (NH), 3429 $см^{-1}$ (NH). Мас-спектр, m/z (I, %): 113 (100) $[M+H^+]$.

Фармакологічні властивості. Дослідження протизапальної активності сполук на щурах

Гостру запальну реакцію (набряк) викликають субплантарним (під плантарний апоневроз) введенням 0.2 мл 0.2 % розчину карагінану. Спостереження за функціональним станом тварин проводять впродовж дванадцяти днів. Після розвитку запалення через 24 год після введення флогогенного агента, перорально вводять досліджувану речовину в дозі 30 мг/кг. Протизапальну дію досліджуваної речовини оцінюють ґрунтуючись на динаміці зміни ширини та об'єму ураженої кінцівки (ширину фіксують електронним штангенциркулем, об'єм визначають волюметрично).

Результати та їх обговорення

Дизайн об'єктів дослідження

Раніше було показано [13], що суттєву роль в зв'язуванні сполуки **1** в АТФ-зв'язуючій кишені JNK (рис. 1*a*) відіграють водневі зв'язки, які утворюються між атомами нітрогену піразольного циклу сполуки **1** та амінокислотами Met149 та Glu147 JNK. «Протилежна» піразольному циклу сторона **1** не бере участь у зв'язуванні, та висувається назовні з карману зв'язування. Амінокислоти Ile70, Val196, Met146, та Ala91 забезпечують вигідні гідрофобні взаємодії поліциклічної системи із стінками карману зв'язування.

Крім того, в роботі [14] було показано, що оксим (11Z)-11H-індено[1,2-b] хіноксалін-11-ону (**2**) зв'язується в кишені JNK аналогічно сполуці **1**, з утворенням водневих зв'язків з тими ж амінокислотами (рис. 1*b*). Обидві сполуки – **1** та **2** – утворюють водневі зв'язки завдяки фрагменту =N–XH (X = N, O). Виходячи з цього, можна припустити, що будь яка сполука, яка містить аналогічний фрагмент та близька за своєю топологією до **1**, має проявляти аналогічні **1** властивості. Для генерації базового скефолду для подальших досліджень ми вдались до біоізостерної модифікації **1**, отримавши структуру **3.** Подальша «трансформація» з «розривом» зв'язку між бензольними кільцями призводить до 4-фенілфталазін-2-ону (**4**); «відрив» фенілу від **4** – до фталазін-1(*2H*)-ону (**5**), а «видалення» конденсованого бензольного кільця – до 6-фенілпіридазін-3(*2H*)-ону (**6**), «заміна» фенілу в **6** на метил – до 6-метилпіридазін-3(*2H*)-ону (**7**). «Гідрування» подвійного зв'язку в **6** та **7** – до відповідних 6-заміщених-4.5-дигідропіридазін-3(*2H*)-онів **8** та **9**.

Таким чином, маємо (рис. 2) логічну низку сполук, які містять суттєвий для зв'язування в кармані JNK фрагмент =N–NH–, з поступовою зміною будови, такою, що дозволяє відстежити основні тенденції в зміні афінітету до JNK залежно від структури.

Загальні міркування, викладені вище були нами перевірені докінгом сполук **3** – **9**. Віртуальний скринінг проводили молекулярним докінгом засобами програми Molecular Operating Environment 2008.10. Як модель мішені використовували результати рентгено-структурного аналізу комплексу JNK3 з лігандом **1** [13]. Докінг проводили в порожнину, утворену переважно гідрофобними амінокислотами (рис. 1*a, b*), визначену авторами [13] як місце зв'язування **1**. Для кожної сполуки проводили 30 спроб розташування з оптимізацією геометрії комплексу методом London dG (Forcefield). П'ять найвигідніших варіантів відбирали за значенням скорінг-функції як найбільш вірогідні (значення скорінг-функції наведені в табл. 1).

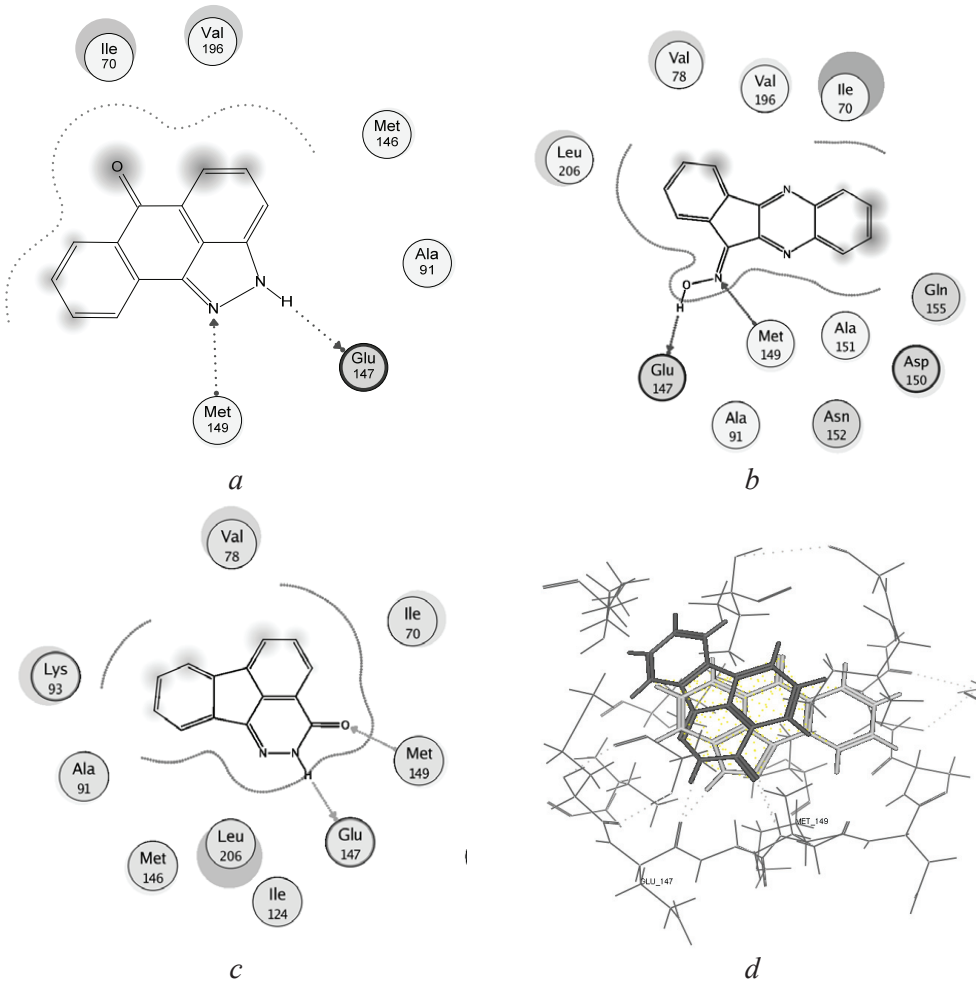


Рис. 1. Схема взаємодії сполук **1** (*a*) за [13], **2** (*b*) за [14] та **3** (*c*) з амінокислотами в субстрат-зв'язуючому центрі JNK3 та суперпозиція **3** з **1** в кармані JNK (*d*).

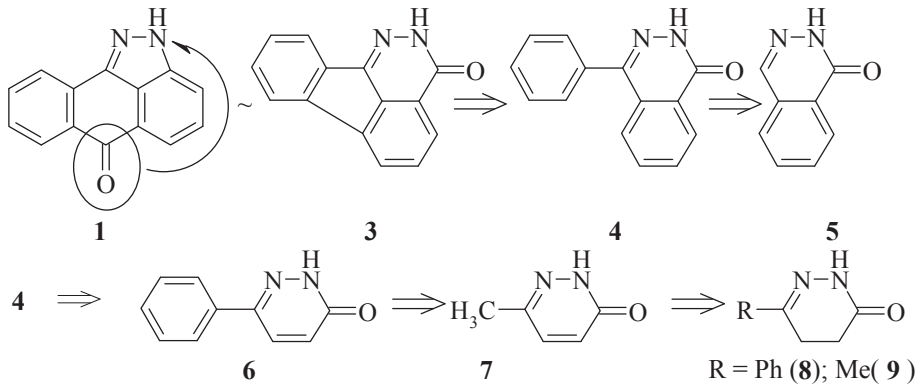


Рис. 2. Логічний зв'язок між структурами дибензо[cd,g]-індазол-6(*2H*)-ону (**1**) індено[1,2,3-de] фталазін-3(*2H*)-ону (**3**), фталазіну (**4**, **5**) та піридазіну (**6–9**).

Узагальнюючи отримані результати докінгу, маємо зазначити що сполуки **3** – **9** розподіляються на дві групи (рис. 2) – ті, що мають фенільний замісник в гетероциклічному ядрі (**3**, **4**, **6**, **8**), та ті, що його не мають (**5**, **7**, **9**). В кожній з груп різниця між сполуками за їх скорінг-функцією незначуща ($P > 0.05$), в той час як за обома групами метод Краскела-Уоліса вказує на суттєвість різниці ($P < 0.01$) для сполук.

Ймовірне розташування сполук **3** – **9** в кармані мішені в порівнянні із сполукою **1** та схема взаємодій цих молекул із амінокислотними залишками, що утворюють місце зв'язування наведені на прикладі сполуки **3** на рис. 1 (*c*, *d*).

Таблиця 1

Значення скорінг-функції (SF) п'яти найвигідніших варіантів розташування лігандів 3 – 9 в субстрат-зв'язуючому центрі JNK3

Сполука	SF				
3	-8.634	-8.562	-8.391	-8.206	-8.123
4	-9.025	-8.799	-8.685	-8.448	-8.126
5	-7.442	-6.848	-6.846	-6.841	-6.619
6	-9.196	-8.565	-8.309	-7.502	-7.287
7	-6.736	-6.398	-6.361	-6.094	-6.063
8	-8.518	-8.401	-7.533	-7.457	-7.392
9	-6.723	-6.656	-6.222	-6.173	-6.157

Виходячи з отриманих результатів, випливає, що наявність арильного замісника положенні, аналогічному для **4** має суттєво сприяти стабільності комплексу лігандів з JNK3 та, можливо, їх вибірковості.

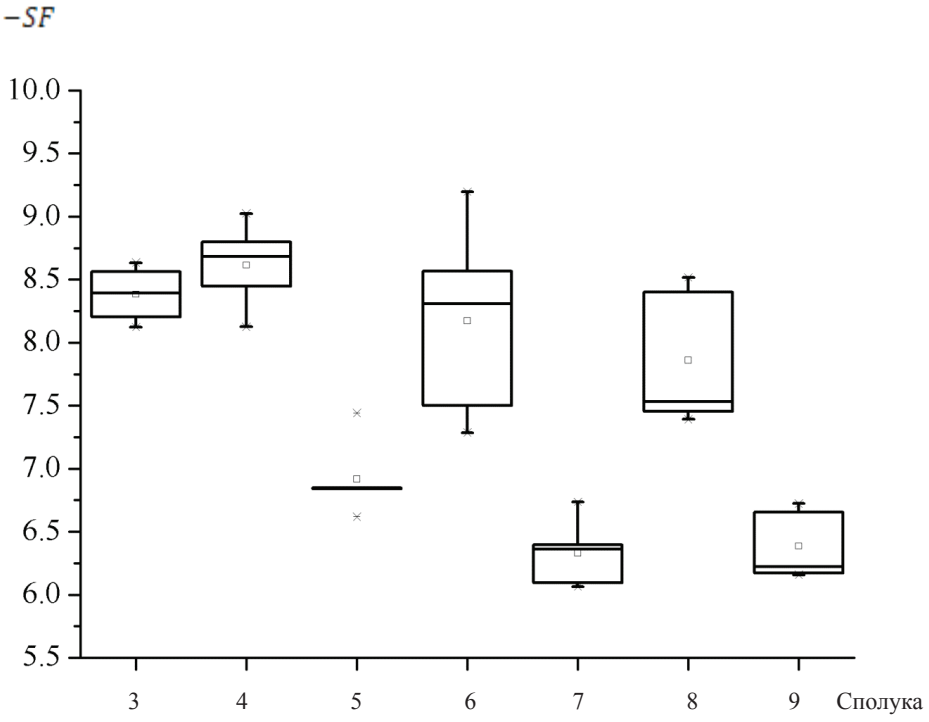


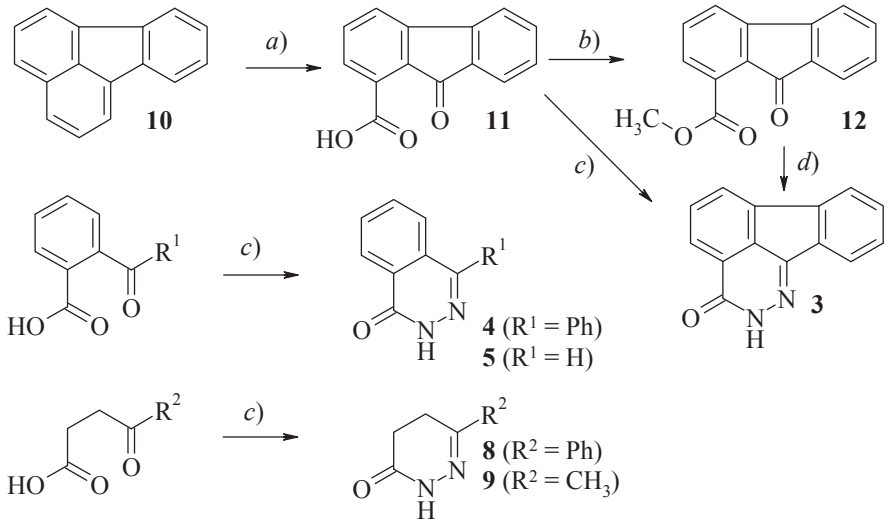
Рис. 3. Залежність діапазону значень скорінг-функції від будови сполуки

Синтез об'єктів дослідження

Окисненням (схема) флуорантену (**10**) дією хромового ангідриду в водній оцтовій кислоті за [7] отримували 9-оксофлуорен-1-карбонову кислоту (**11**) як технічний продукт із виходом на рівні 64.5 – 67 %. Етерифікація **11** метанолом в умовах кислотного каталізу приводила з виходом 84 % (після перекристалізації з гептану) до естеру **12**, кип'ятінням якого з розрахунковою кількістю гідразингідрату в метанолі впродовж 45 хв. в присутності льодяної оцтової кислоти синтезували індено[1,2,3-de]фталазін-3(*2H*)-он (**3**). Чистота та вихід **3** в такий спосіб синтезу виявились значно більшими, ніж при синтезі, виходячи з кислоти **11** описаним методом [7].

Модельні сполуки – 4-фенілфталазін-1(*2H*)-он (**4**), фталазін-1(*2H*)-он (**5**) та 6-заміщені-4.5-дигідропіридазін-3(*2H*)-он (**8** та **9**) синтезували кип'ятінням 2-бензоїлбензойної, 2-формілюензойної, 3-бензоїлпропанової та левулінової кислот, відповідно, з гідразингідратом, причому **4** – в диметилацетаміді, а **5**, **8** та **9** – в етанолі при кип'ятінні. Після охолодження всі продукти спонтанно кристалізувалися з реакційної суміші та були очищені перекристалізацією з ДМАА. В масспектрах (FAB) синтезованих сполук піки протонованих молекулярних іонів були хіба що не єдиними. В ІЧ-спектрах сполук спостерігалися смуги поглинання, типові для приписуваних структур 1604 – 1625 $см^{-1}$ (C=N-зв'язок), 1650 – 1682 $см^{-1}$ (C=O-група); 3024 – 3087 $см^{-1}$ (ароматичні C–H-зв'язки); 3150 – 3200 $см^{-1}$ (N–H-зв'язки); в спектрах сполук **8** та **9** додатково спостерігалися смуги при 2916 – 2050 $см^{-1}$ (алі-

Схема



a) CrO_3, AcOH/H_2O 100 °C, 6 год; *b*) H_2SO_4/MeOH кип. 8 год.; *c*) $N_2H_4 \cdot H_2O$, нагрівання, 3 год.; *d*) $N_2H_4 \cdot H_2O$, AcOH/MeOH кип., 45хв

фатичні С–Н-зв'язки). В ІЧ-спектрі **12** спостерігалися дві смуги поглинання при 1709 $см^{-1}$ та 1732 $см^{-1}$ (карбонільні групи флуоренону та естеру, відповідно) та була відсутня широка смуга при 3250 – 3650 $см^{-1}$ (гідроксильна група кислоти).

Біологічна активність

Протизапальну активність in vitro досліджували як описано в [14]. Як тестову використовували продукцію прозапальних цитокінів (TNF та IL6) клітинами MonoMac-6 та лужної фосфатази (AP-1) стабільно трансфікованими моноцитами людини THP-1Blue, в яких ген AP-1 знаходиться під контролем промотора, який індукує NF-κB/AP-1). Серед досліджених виявлені як активні, так і неактивні сполуки (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив синтезованих сполук на окремі ланки та показники прозапального каскаду

Сполука	Цитотоксичність (LC_{50}, μM)		EC_{50}, μM		
	MM6[1]	THP[2]	TNF[1]	IL-6[1]	AP[2]
3	N.T.	N.T.	13	2.8	1.5
4	N.T.	N.T.	N.A.	20.6	34.5
5	N.T.	N.T.	n.d.	N.A.	N.A.
8	N.T.	N.T.	N.A.	N.A.	42.4
9	N.T.	N.T.	N.A.	N.A.	103.0

Сполука 3, як і очікувалось, проявила максимальну активність як інгібітор індукції прозапальних цитокінів. «Розрив» зв'язку Ph–Ph призводить до десятидвадцятикратного зниження інгібуючої активності (сполука 4). Сполуки 5, 8 та 9 виявились практично неактивними. За здатністю інгібувати продукцію прозапальних цитокінів ці сполуки розташовані практично так само як і за результатами докінгу. Для найактивнішої в цій низці сполуки 2 був досліджений її афінітет до JNK в стандартних умовах [15] компанією KINOMEscan (San Diego, CA, USA). Встановлено, що константа дисоціації для 3 відносно JNK1 становить 111 ± 25 μM, (крива концентрація – ефект, з яких випливає це значення наведена на рис. 4).

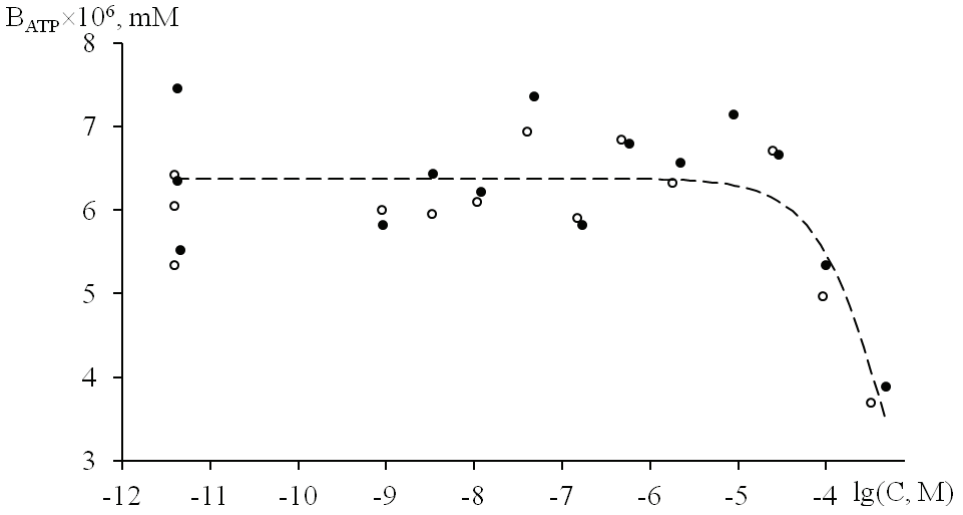


Рис. 4. Результати дослідження афінітету сполуки **3** конкуренцією з АТФ за місце зв'язування на JNK (наведені результати двох паралельних експериментів)

Сполуки **3** – **9** були досліджені як протизапальні агенти in vivo в тесті карагінанового набряку задньої кінцівки щурів. Сполуки досліджували в терапевтичному та профілактичному режимах. В обох випадках сполука **3** значущо інгібувала величину набряку, причому ефект був більш вираженим (рис. 5) при профілактичному застосуванні.

Звертає на себе увагу невідповідність результатів докінгу (табл. 1), результатам дослідження впливу цих сполук на індукцію прозапальних цитокінів та протизапальної активності в тесті карагінанового набряку. На наш погляд ця невідповідність може бути поясненою тим, що основною мішенню **3** є не JNK, незважаючи на оптимістичні результати докінгу, а якась близька до неї (за структурою АТФ-зв'язуючого центру) кіназа, задіяна в запальному каскаді. Однак, це припущення носить поки ще спекулятивний характер та має бути перевіреним в експерименті.

Таким чином, встановлено, що індено[1,2,3-de]фталазін-3(2H)-он дійсно може розглядатися як сполука-хіт при подальшій модифікації структури для отримання ефективних протизапальних агентів. Наявність планарної поліциклічної структури є суттєвою структурною особливістю активних молекул в цій низці.

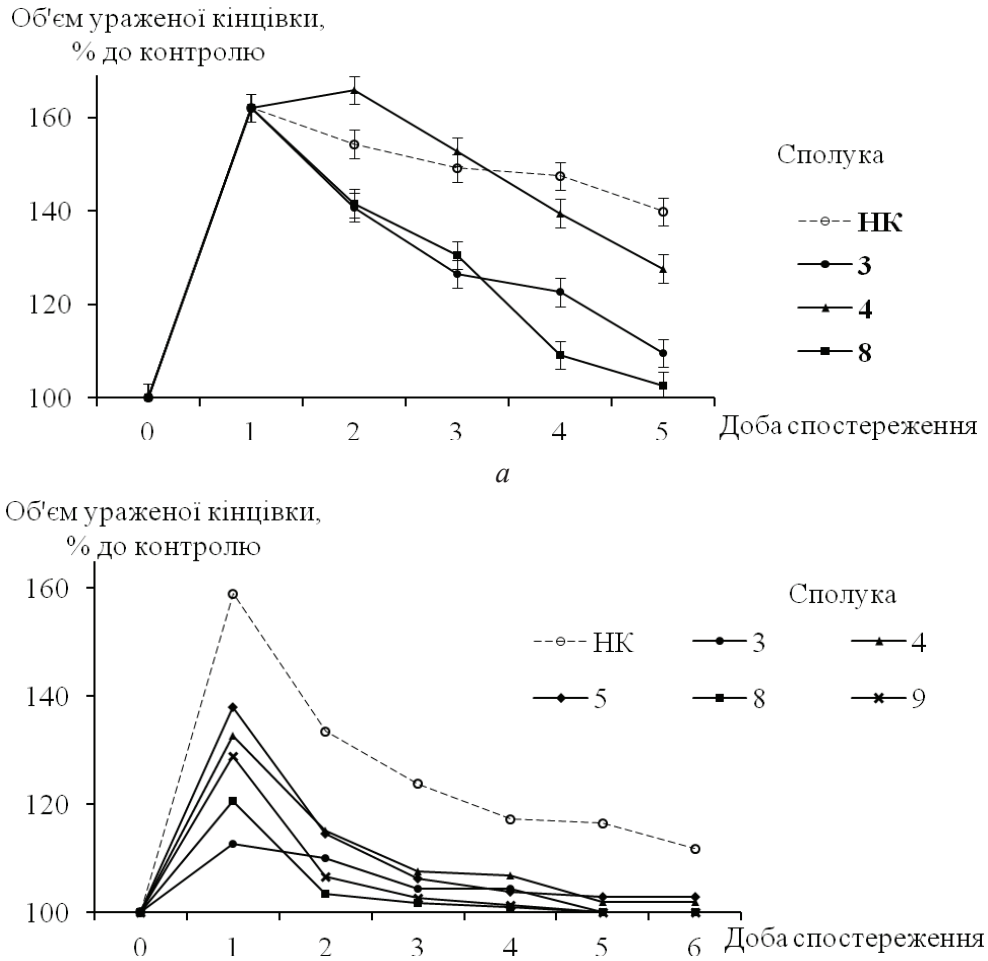


Рис. 5. Вплив інденофталазінону (**3**) та його аналогів на об’єм набряку, викликаного введенням карагінану; *а* – терапія; *б* – профілактика. НК – нелікований контроль

Показано, що не JNK є основною мішенню агенту, а якась інша кіназа запального каскаду, що має аналогічну до JNK будову АТФ-зв’язуючого центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Bogoyevitch M.A., Boehm I., Oakley A., Ketterman A.J., Barr R.K.* Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. – 2004. – Vol. 1697, N 1 – 2. P. 89 – 101. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.016
2. *Bennett B.L., Sasaki D.T., Murray B.W., O’Leary E.C., Sakata S.T., Xu W., Leisten J.C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S.S., Manning A.M., Anderson D.W.* SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 24. – P. 13681 – 13686. doi:10.1124/dmd.31.11.1279
3. *Pereira A.C.P., Soares-Martins J.A.P., Leite F.G.G., Da Cruz A.F.P., Torres A.A., Souto-Padrón T., Kroon E.G., Ferreira P.C.P., Bonjardim C.A.* SP600125 inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 -independent man-

ner: Implication as a potential antipoxviral. // Antiviral Res. – 2012. – V. 93, № 1. – P. 69 – 77. doi:10.1016/j.antiviral.2011.10.020

4. *Nacken W., Ehrhardt C., Ludwig S.* Small molecule inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) possess antiviral activity against highly pathogenic avian and human pandemic influenza A viruses. // Biol. Chem. – 2012. – Vol. 393, № 6. – P. 525 – 534. doi: 10.1515/hsz-2011-0270
5. *Zhang H., Niu X., Qian Z., Qian J., Xuan B.* The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human cytomegalovirus replication. // J. Med. Virol. – 2015. – Vol. 87, № 12. – P. 2135 – 2144. doi: 10.1002/jmv.24286
6. *Marozin S., Altomonte J., Apfel S., Dinh P.X., De Toni E.N., Rizzani A., Nűssler A., Kato N., Schmid R.M., Pattnaik A.K., Ebert O.* Posttranslational Modification of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein, but Not JNK Inhibition, Is the Antiviral Mechanism of SP600125 // J. Virol. – 2012. – Vol. 86, № 9. – P. 4844 – 4855. doi:10.1128/JVI.06649-11
7. *Назаров В.Н.* Полициклические ароматические углеводороды в синтезе биологически активных веществ: Монография. – Х.: «БЭТ», 2013. – 166с.
8. Словарь органических соединений. Строение. Физические и химические свойства важнейших органических соединений и их производных. Том 2: Eccaine – Myrtillin chloride. / Под ред. И.Хейльборна, Г.М. Бэнбери.–М.: Иностранная литература, 1949. – 891с.
9. *Fekry Ismail M., El-Bassiouny F.A., Younes H.A.* New convenient one-step synthesis of 4-arylphthalaz-1-ones // Tetrahedron. – 1984. – Vol. 40, № 15. – P. 2983 – 2984. doi:10.1016/S0040-4020(01)91312-2
10. *Wharton C.J., Wrigglesworth R.* Synthesis and reactions of 2,3-dihydro-oxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-ones // J. Chem. Soc., Perkin Trans.1. – 1985. – P. 809 – 813. doi: 10.1039/P19850000809
11. *Tóth G.R., Molnár S., Tamás T., Borbély I.* An Efficient Synthesis of 4,5-Dihydro-3(2H)-pyridazinone Derivatives // Synthetic Communications. – 1997. – V. 27, № 20. – P. 3513 – 3523. doi: 10.1080/00397919708007072
12. *Reichelt I., Reissig H.U.* Eine einfache und flexible Synthese fur 4,5-Dihydro-2H-3-pyridazinone // Synthesis. – 1984., № 9. – P. 786 – 787.
13. *Scapin G., Patel S.B., Lisnock J.M., Becker J.W., LoGrasso P.V.* The Structure of JNK3 in Complex with Small Molecule Inhibitors: Structural Basis for Potency and Selectivity. // Chem. Biol. – 2003. – Vol. 10, № 8. – P. 705 – 712. doi:10.1016/S1074-5521(03)00159-5 (http://www.rcsb.org/pdb/files/1PMV.pdb)
14. *Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I., Hanks T.S., Kochetkova I., Pascual D.W., Jutila M.A., Quinn M.T.* Identification and Characterization of a Novel Class of c-Jun N-terminal Kinase Inhibitors. // Mol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 81, № 6. – P. 832 – 845. doi:10.1124/mol.111.077446
15. *Fabian M.A., Biggs W.H., III, Treiber D.K., Atteridge C.E., Azimioara M.D., Benedetti M.G., Carter T.A., Ciceri P., Edeen P.T., Floyd M., Ford J.M., Galvin M., Gerlach J.L., Grotzfeld R.M., Herrgard S., Insko D.E., Insko M.A., Lai A.G., Lelias J.M., Mehta S.A., Milanov Z.V., Velasco A.M., Wodicka L.M., Patel H.K., Zarrinkar P.P., Lockhart D.J.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. // Nat. Biotechnol. – 2005. – Vol. 23, № 3. – P. 329 – 336. doi:10.1038/nbt1068

Стаття надійшла до редакції 25.01.2016

Е. В. Бондарь[1], К. О. Клименко[2], О. И. Александрова[1], И. А. Кравченко[1], И. А. Щепеткин[3], С. А. Ляхов[2]
[1]Одесский национальний университет им. И.И. Мечникова,
химический факультет, 2, Дворянская, Одесса, Украина, 65082,
bondar_k@ukr.net, aleksa713135@mail.ru
[2]Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
86, Люстдорфская дорога, Одесса, Украина, 65080,
alhimikir@gmail.com, sergey_a_lyakhov@ukr.net
[3]Кафедра иммунологии и инфекционных болезней,
Университет штата Монтана, Бозман, MT 59717, США, schepetkin@yahoo.com

ИНДЕНО[1,2,3-de]ФТАЛАЗИН-3(2H)-ОН И ЕГО АНАЛОГИ – СИНТЕЗ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Биоизостерной модификацией известного ингибитора и молекулярным докингом в JNK осуществлен дизайн потенциальных противовоспалительных агентов – инденоф-

талазинона (ИФ) и его аналогов. Конденсацией кетокислот с гидразин-гидратом эти соединения были синтезированы и исследована их активность в тестах in vitro и in vivo. Показано, что несмотря на низкий аффинитет к JNK, ИФ проявляет значимую противовоспалительную активностью и может рассматриваться как соединение-хит для последующего создания противовоспалительных агентов.

Ключевые слова: инденофталазин, синтез, киназы, докинг, провоспалительные цитокины, афинитет, карагинан, оттек, воспаление, крысы.

K. V. Bondar[1], K. O. Klimenko[2], O. I. Alexandrova[1], I. A. Kravchenko[1], I. A. Schepetkin[3], S. A. Lyakhov[2]
[1]Odessa National University, Chemistry department,
Dvoryanskaya St. 2., Odessa, 65026, Ukraine
[2]A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine,
Lyustdorfskaya Doroga 86, Odessa, 65080, Ukraine
[3]Department of Immunology and Infectious Diseases,
Montana State University, Bozeman, MT 59717, USA

INDENO[1,2,3-de]PHTHALAZIN-3(2H)-ONE AND ITS ANALOGS – SYNTHESIS AND ANTIINFLAMMATORY PROPERTIES

The purpose of this work was design planar polycyclic compounds as inhibitors of kinases, involved in the pro-inflammatory cascade. These compounds can be used as potential hits for the further anti-inflammatory drug design.
Dibenzo[cd,g]indazol-6(2H)-one (**1**) has been shown as a competitive JNK inhibitor and antiviral agent and was used in this work as a prototype. Due to a presence of =N–NH– fragment in its structure **1** forms hydrogen bonds with methionine and aspartic acid residues in the JNK ATP-binding pocket. Bioisosteric modification of this compound leads to indeno[1,2,3-de]phthalazin-3(2H)-one (**3**), which also contains =N–NH– fragment in its structure. Further modification by «removing» bonds and/or fragments resulted in 4-phenylphthalazin-1(2H)-one (**4**), phthalazin-1(2H)-one (**5**), 6-phenyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one (**8**) and 6-methyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one (**9**) as potential ligands of JNK, which was confirmed by molecular docking. Compounds **3**, **4**, **5**, **8** and **9** were synthesized by condensation of 9-oxo-9H-fluorene-1-carboxylic acid, 2-benzoylbenzoic acid, 2-formylbenzoic acid, 4-oxo-4-phenylbutanoic acid and 4-oxopentanoic acid respectively with hydrazine-hydrate. Structures were confirmed by a set of spectral methods (^{1}H ЯМР spectroscopy, IR spectroscopy and mass spectrometry). Compounds **3**, **4**, **8** and **9** were shown as inhibitors of the inflammatory cytokines (IL-6 та TNF) and NF-κB production stimulated by bacterial LPS. Compound **3** appeared as the most active among other tested both in these tests and in the carrageenan rats paw edema prophylactics one. On the other hand JNK affinity of **3** appeared as very low with $IC_{50} > 100$ μM.
So, it was shown, that indeno[1,2,3-de]phthalazin-3(2H)-one really demonstrates its' properties as a hit for further design of anti-inflammatory agents. It was also shown, that planar polycyclic ring system is essential structure peculiarity for such substances high activity. Not JNK but some other kinase with the similar structure of the ATP-binding pocket is the most likely target of **3**.

Keywords: indenophthalazin, synthesis, kinases, docking, proinflammatory cytokines, affinity, carrageenan, edema, inflammation, rats.

REFERENCES

1. Bogoyevitch M.A., Boehm I., Oakley A., Ketterman A.J., Barr R.K. *Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2004, vol. 1697, no 1 – 2, pp. 89 – 101. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.016
2. Bennett B.L., Sasaki D.T., Murray B.W., O'Leary E.C., Sakata S.T., Xu W., Leisten J.C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S.S., Manning A.M., Anderson D.W. *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, vol. 98, no 24, pp. 13681 – 13686. doi:10.1124/dmd.31.11.1279
3. Pereira A.C.P., Soares-Martins J.A.P., Leite F.G.G., Da Cruz A.F.P., Torres A.A., Souto-Padrón T., Kroon E.G., Ferreira P.C.P., Bonjardim *C.A. SP600125 inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 -independent manner: Implication as a potential antipoxviral.* Antiviral Res, 2012, V. 93, no 1. pp. 69 – 77. doi:10.1016/j.antiviral.2011.10.020
4. Nacken W., Ehrhardt C., Ludwig S. *Small molecule inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) possess antiviral activity against highly pathogenic avian and human pandemic influenza A viruses*. Biol. Chem, 2012, vol. 393, no 6, pp. 525 – 534. doi: 10.1515/hsz-2011-0270
5. Zhang H., Niu X., Qian Z., Qian J., Xuan B. *The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human cytomegalovirus replication.* J.Med.Virol, 2015, vol. 87, no 12, pp. 2135 – 2144. doi: 10.1002/jmv.24286
6. Marozin S., Altomonte J., Apfel S., Dinh P.X., De Toni E.N., Rizzani A., N+-ssler A., Kato N., Schmid R.M., Pattnaik A.K., Ebert O. Posttranslational Modification of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein, but Not JNK Inhibition, Is the Antiviral Mechanism of SP600125. J.Virol, 2012, vol. 86, no 9, pp. 4844 – 4855. doi:10.1128/JVI.06649-11
7. Nazarov V.N. *Policiklicheskie aromaticheskie uglevodorody v sinteze biologicheski aktivnyh veshhestv: Monografija* [Polycyclic aromatic hydrocarbons in the synthesis of biologically active substances]. – H.: «BET», 2013. 166 p.
8. *Slovar' organicheskih soedinenij. Stroenie. Fizicheskie i himicheskie svojstva vazhnejshih organicheskih soedinenij i ih proizvodnyh.* Tom 2: Eccaine – Myrtillin chloride [Dictionary of Organic Compounds. The constitutions and physical and chemical properties of the principle carbon compounds and their derivatives. Vol 2: Eccaine – Myrtillin chloride]. / Pod red. I.Hejl'borna, G.M. Bjenberi. –M.: Inostrannaja literatura, 1949. 891p. (*in Russian*)
9. Fekry Ismail M., El-Bassiouny F.A., Younes H.A. *New convenient one-step synthesis of 4-arylphthalaz-1-ones*. Tetrahedron, 1984, vol. 40, no 15, pp. 2983 – 2984.
10. Wharton C.J., Wrigglesworth R. *Synthesis and reactions of 2,3-dihydro-oxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-ones*. J. Chem. Soc., Perkin Trans.1, 1985, pp. 809 – 813.
11. Tóth G.R., Molnár S., Tamás T., Borbély I. *An Efficient Synthesis of 4,5-Dihydro-3(2H)-pyridazinone Derivatives*. Synthetic Communications, 1997, vol. 27, no 20, pp. 3513 – 3523.
12. Reichelt I., Reissig H.U. *Eine einfache und flexible Synthese fur 4,5-Dihydro-2H-3-pyridazinone.* Synthesis, 1984, no 9, pp. 786 – 787.
13. Scapin G., Patel S.B., Lisnock J.M., Becker J.W., LoGrasso P.V. *The Structure of JNK3 in Complex with Small Molecule Inhibitors: Structural Basis for Potency and Selectivity*. Chem. Biol, 2003, vol. 10, no 8, pp. 705 – 712. (http://www.rcsb.org/pdb/files/1PMV.pdb)
14. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I., Hanks T.S., Kochetkova I., Pascual D.W., Jutila M.A., Quinn M.T. *Identification and Characterization of a Novel Class of c-Jun N-terminal Kinase Inhibitors*. Mol. Pharmacol, 2012, vol. 81, № no 6, pp. 832 – 845. doi:10.1124/mol.111.077446
15. Fabian M.A., Biggs W.H., III, Treiber D.K., Atteridge C.E., Azimioara M.D., Benedetti M.G., Carter T.A., Ciceri P., Edeen P.T., Floyd M., Ford J.M., Galvin M., Gerlach J.L., Grotzfeld R.M., Herrgard S., Insko D.E., Insko M.A., Lai A.G., Lelias J.M., Mehta S.A., Milanov Z.V., Velasco A.M., Wodicka L.M., Patel H.K., Zarrinkar P.P., Lockhart D.J. *A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors*. Nat Biotechnol, 2005, vol. 23, no 3, pp. 329 – 336. doi:10.1038/nbt1068