

© Коллектив авторов, 2006

А. С. Карпенко¹, М. О. Шибинская¹, Н. М. Жолобак², З. М. Олевинская²,
С. А. Ляхов¹, Л. А. Литвинова¹, Н. Я. Спивак², С. А. Андронатю¹

СИНТЕЗ, ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ И ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ГИДРАЗОНОВ ИЗАТИНА И БЕНЗОИЗАТИНА

¹ Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса;

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев.

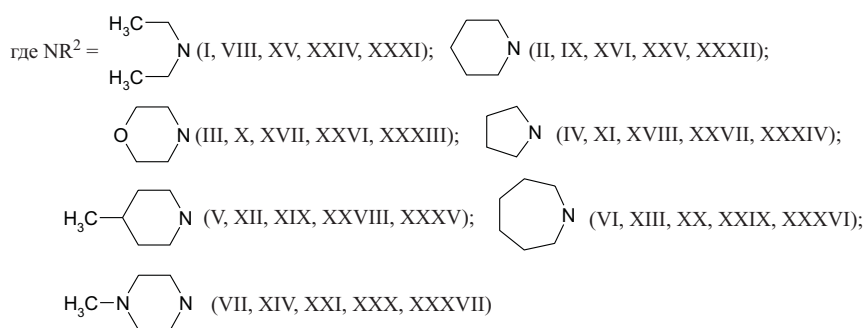
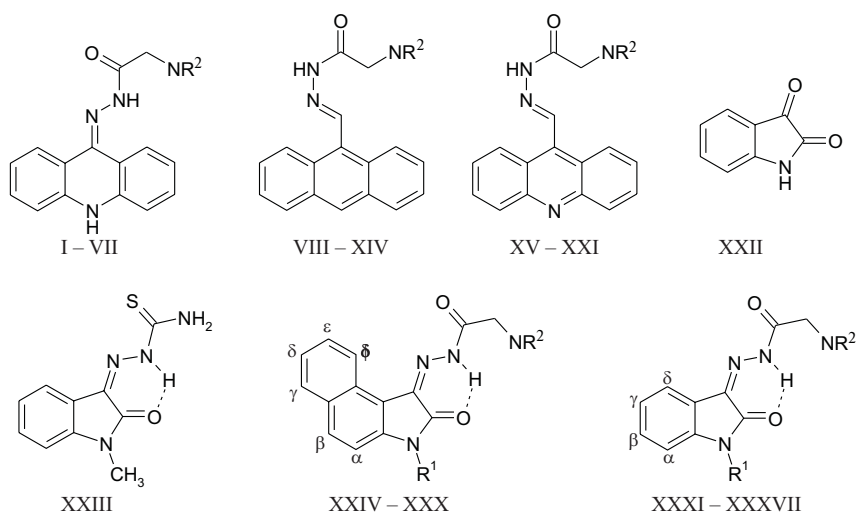
В работе впервые установлена способность производных изатина, в частности их аминокетилгидразонов, к интеркаляции в ДНК и индукции интерферона. Производные изатина оказались значительно менее токсичными и несколько менее активными интерферонгенами, чем аналогичные им производные бензоизатина. Последние обладают на два порядка большим аффинитетом к ДНК, чем производные изатина.

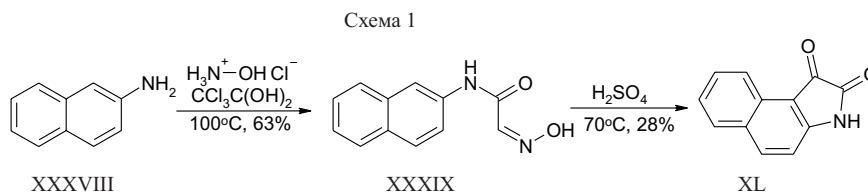
Ранее был синтезирован ряд аминокетилгидразонов акридон (I – VII) [1], 9-формилантрацена (VIII – XIV) и 9-формилакридина (XV – XXI) [2]. Наличие у этих соединений интерферониндуцирующих свойств [3] и способности ингибировать полимеразную цепную реакцию [1, 2] делает их перспективной группой для целенаправленного поиска потенциальных противовирусных препаратов.

Известна противовирусная активность производных изатина (XXII) [4], в частности, тиосемикарбазон

1-метилизатина (XXIII, метисазон, изатизон) проявляет высокую активность против вируса оспы [5].

В качестве объектов исследования нами были выбраны аминокетилгидразоны бензоизатина (XXIV – XXX) и изатина (XXXI – XXXVII). Выбор был обусловлен следующими соображениями. Аминокетилгидразоны бензоизатина (XXIV – XXX) можно *a priori* считать интеркаляторами ДНК, учитывая наличие в структуре их молекул плоского трициклического фрагмента и боковой цепи, способной протонировать-

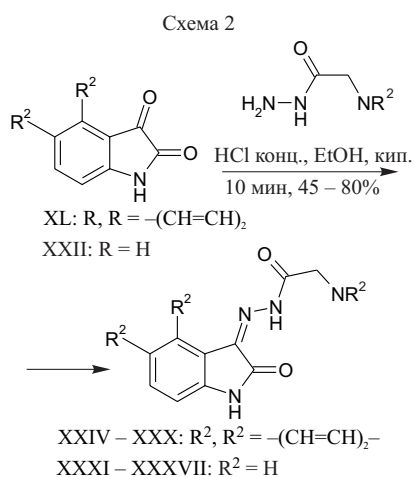




ся в физиологических условиях [6]. Гидразоны изатина, напротив, являются бициклическими соединениями, для которых интеркаляция не характерна. С другой стороны, наличие в молекуле XXIII внутримолекулярной водородной связи [7] дает основания ожидать наличие таковой и в молекулах XXXI – XXXVII. Образование третьего “псевдоцикла” в этом случае позволяет рассматривать эти соединения как потенциальные интеркаляторы ДНК.

Бензоизатин (XL) получали конденсацией 2-аминонафталина (XXXVIII) с хлоральгидратом в присутствии гидроксилamina с последующей обработкой оксима XXXIX (выход чистого оксима составляет 60 – 65 %) без дополнительной очистки серной кислотой; выход по двум стадиям при этом составляет 30 % (схема 1).

Несмотря на возможность образования при циклизации оксима XXXIX двух изомеров, после кристаллизации неочищенного продукта из толуола было получено индивидуальное вещество (ТСХ: Silufol UV-254, элюент — смесь хлороформа с ацетоном в соотношении 10:1), в спектре ПМР которого (рис. 1) наблюдались сигналы от протонов 1,2-дизамещенного бензольного кольца и два дублета при 7,314 и 8,320 м.д. с одинаковым значением константы спин-спинового взаимодействия ($J = 8,4$ Гц), что и позволило приписать продукту структуру XL. Региоселективность циклизации объясняется, по-видимому, большей реакционной способностью положения 1 нафталинового цикла в реакциях электрофильного замещения [8].



В ИК-спектре наблюдаются полосы поглощения колебаний связей N–H ($3100 - 3400 \text{ см}^{-1}$), ароматических C–H-связей ($3050 - 3070 \text{ см}^{-1}$) и две полосы (1700 и 1755 см^{-1}) в области, характерной для карбонильных групп. В масс-спектре имеется пик молекулярного иона, который соответствует структуре XL.

Аминоацетилгидразоны изатина (XXXI – XXXVII) и его бензоаналога (XXIV – XXX) получали конденсацией XXII и XL с ранее синтезированными [1] гидразидами аминокислот в кипящем этаноле в присутствии избытка HCl (схема 2).

Чистоту синтезированных аминоацетилгидразонов контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 с применением элюентов различного состава. Строение соединений XXIV – XXXVII подтверждено методами масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии и спектроскопии ПМР.

В масс-спектрах всех соединений имеются малоинтенсивные пики молекулярных ионов. Основным путем фрагментации является β -расщепление в алифатической части аминокислотного гидразона и разрыв N–N-связи гидразинового фрагмента.

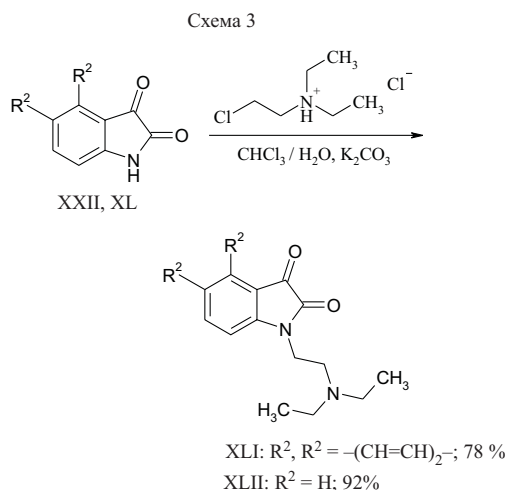
В ИК-спектрах соединений XXIV – XXX наблюдается широкая сложная полоса при $3010 - 3090 \text{ см}^{-1}$, соответствующая колебаниям C–H связей ароматических ядер. Эта же полоса в спектрах соединений XXXI – XXXVII значительно слабее и уже. Колебания алифатических C–H связей — при $2780 - 2980 \text{ см}^{-1}$. Валентные колебания карбонильной группы проявляются в виде плохо разрешенных полос при $1680 - 1700 \text{ см}^{-1}$. В области $3410 - 3450 \text{ см}^{-1}$ наблюдается узкая полоса, соответствующая колебаниям группы N–H, участвующей в образовании внутримолекулярной водородной связи.

В спектрах ПМР соединений XXIV – XXXVII наблюдаются сигналы протонов как ароматической, так и алифатической частей молекулы, причем соотношения интегральных интенсивностей этих сигналов соответствуют расчетным для приписываемых структур. Точные значения химических сдвигов протонов соединений XXIV – XXXVII представлены в табл. 1.

Модельные аминоэтильные производные бензоизатина и изатина (XLI и XLII, соответственно) получали аминоалкилированием изатинов (XX и XL) действием диэтиламиноэтилхлорида (схема 3). Во избежание гидролиза изатинов и алкилирующего агента в качестве основания был использован карбонат калия; реакцию проводили в двухфазной водно-органической (хлороформ) среде при комнатной температуре.

В масс-спектрах присутствуют пики молекулярных ионов, наиболее интенсивным является пик с $m/z = M^+ - 86$ и $m/z = 86$. Наличие в ИК-спектрах обоих продуктов двух полос ($1710, 1729 \text{ см}^{-1}$ и $1714, 1750 \text{ см}^{-1}$, для XLI и XLII соответственно) в области, характерной для карбонильных групп, свидетельствует в пользу приписываемых структур. В спектрах ^1H ЯМР наблюдаются сигналы как алифатических, так и ароматических протонов, причем характер расщепле-

ния сигналов и соотношение интегральных интенсивностей соответствуют приписываемым структурам.



Выше мы упоминали возможность проявления гидразонами изатина интеркалирующих свойств, исходя из образования “псевдо-трициклической” структуры за счет водородной связи, наличие которой можно считать надежно установленным [7]. С другой стороны, в литературе отсутствуют сведения об интеркаляции производных изатина в ДНК. Описано [9] только лишь взаимодействие с ДНК медного комплекса тиосемикарбазона изатина. В связи с этим представлялось целесообразным проверить возможность интеркаляции синтезированных соединений XXXI – XXXVII в ДНК.

Для интеркаляции существенно: увеличение характеристической вязкости растворов ДНК в присутствии лиганда (при постоянстве pH, ионной силы и температуры) [6, 10], батохромный сдвиг в электронных спектрах длинноволновых полос хромофора при одновременном гипохромизме [11] и уменьшение интенсивности флуоресценции интеркалирующих лигандов (этидия бромид, акридинового оранжевого, профлавина) [12].

В связи с тем, что изучаемые изатины являются формально бициклическими системами, для проверки гипотезы мы применяли все три критерия. Эксперименты проводили в водном ацетатном (0,02 моль) буферном растворе при pH = 5,5 и в присутствии 0,05 М NaCl.

Вискозиметрические исследования проводили для соединений XLI и XXXIII с раствором ДНК селезенки КРС (молекулярная масса в диапазоне 4 – 6 МДа).

Обнаружено, что добавление соединения XLI во всем исследованном диапазоне концентраций не приводит к увеличению вязкости* раствора ДНК постоянной концентрации. Все отклонения от контрольного значения (вязкость раствора ДНК в отсутствие лиганда) находятся в пределах ошибки эксперимента.

Напротив, соединение XXXIII дает достоверное, хотя и небольшое по величине, увеличение вязкости. Ввиду того, что использовалась полидисперсная ДНК, количественно охарактеризовать интеркаляционные

* Вязкость растворов не рассчитывали, в качестве критерия изменения вязкости использовали время вытекания раствора из вискозиметра

свойства изученных соединений этим методом не представляется возможным.

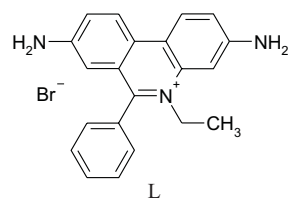
Спектрофотометрические исследования проводили в диапазоне 300 – 500 нм при постоянной концентрации изучаемых лигандов ($C \approx 1,8 \cdot 10^{-4}$ М), варьируя концентрацию ДНК в диапазоне $2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$ М. В изученных сериях при повышении концентрации ДНК наблюдается небольшое смещение максимума поглощения (с $320,3 \pm 0,2$ до $321,5 \pm 0,2$ нм) полосы 3-иминоизатинового хромофора при 320 нм (рис. 2) при одновременном уменьшении молярного коэффициента светопоглощения с 2261 до $1737 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (гипохромизм – 24 %).

Для интеркаляторов характерен гипохромизм, достигающий в отдельных случаях 40 %. Относительно небольшие величины гипохромизма в случае изученных гидразонов изатина могут быть объяснены низкими константами ассоциации их с ДНК и, как следствие, неполным связыванием. Вероятно, при больших (чем были использованы) концентрациях ДНК, т.е. при условиях, обеспечивающих почти 100 % связывание лиганда, полученные значения гипохромизма были бы заметно больше. Использование больших концентраций ДНК приводит к сильной опалесценции растворов, затрудняющих регистрацию спектров, а использовать менее концентрированные растворы иминов изатинов и ДНК нецелесообразно в связи с низкими значениями экстинкции этих веществ в диапазоне 330 – 550 нм. При меньших длинах волн начинает сказываться поглощение ДНК.

В присутствии соединения XXXIII (10^{-4} М) интенсивность флуоресценции интеркалированного этидия бромида значительно меньше, чем при его отсутствии, а при концентрации соединения XXXIII большей, чем $5 \cdot 10^{-3}$ М, не наблюдается совсем, что характерно для интеркаляции.

Таким образом, по всем трем тестам имеются свидетельства интеркаляционного характера взаимодействия гидразонов изатина с ДНК, что позволяет приписать им этот механизм.

Сродство синтезированных соединений к ДНК изучено методом вытеснения этидия бромида из его комплекса с ДНК тимуса телят согласно [1]. Критерием интеркаляции изучаемых соединений являлось снижение интенсивности флуоресценции интеркалированного этидия бромида (L) за счет вытеснения его из интеркаляционного комплекса. Учитывая незначительность поглощения изучаемых лигандов в области возбуждения этидия бромида (545 нм), тушением флуоресценции последнего можно пренебречь [12].



Общепринятым параметром, отражающим аффинность лиганда к ДНК, является концентрация лиганда, приводящая к 50 % снижению интенсивности флуо-

Характеристики спектров ПМР синтезированных соединений

Соединение	Параметры спектра*
XXIV	Алифат.: т. 1,138 м. д., 7,2 Гц (6H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N), кв. 2,657 м. д., 7,2 Гц (4H, (CH ₃ -CH ₂) ₂ N), с. 3,384 м. д. (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,337 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,473 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,674 м. д., 7,8 Гц, H _ε (1H), д. 7,974 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 8,051 м. д., 8,4 Гц, H _γ (1H), д. 8,805 м. д., 8,4 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,095 м. д., (1H).
XXV	Алифат.: м. 1,483 м. д., 5,4 Гц (2H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 1,706 м. д., (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 2,560 м. д., (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,305 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,342 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,475 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,674 м. д., 7,2 Гц, H _ε (1H), д. 7,978 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 8,058 м. д., 8,7 Гц, H _γ (1H), д. 8,795 м. д., 8,7 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,103 м. д., (1H).
XXVI	Алифат.: м. 2,660 м. д., (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,387 м. д., (2H, COCH ₂ N), м. 3,807 м. д., (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N), ароматические СН: д. 7,333 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,474 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,673 м. д., 8,1 Гц, H _ε (1H), д. 7,973 м. д., 8,1 Гц, H _φ (1H), д. 8,051 м. д., 8,7 Гц, H _γ (1H), д. 8,786 м. д., 8,1 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,150 м. д., (1H).
XXVII	Алифат.: м. 1,863 м. д., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), н/р м. 2,727 м. д., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,508 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,338 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,473 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,677 м. д., 7,5 Гц, H _ε (1H), д. 7,976 м. д., 8,1 Гц, H _φ (1H), д. 8,052 м. д., 8,1 Гц, H _γ (1H), д. 8,795 м. д., 8,4 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,047 м. д., (1H).
XXVIII	Алифат.: д. 0,957 м. д., (3H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N), сл. м. 1,400 – 1,519 м. д., (4H), м. 1,641 – 1,672 м. д., (2H), т. 2,225 – 2,274 м. д., 10,5 Гц, (3H), с. 3,324 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,342 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,474 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,673 м. д., 8,1 Гц, H _ε (1H), д. 7,973 м. д., 8,1 Гц, H _φ (1H), д. 8,051 м. д., 8,7 Гц, H _γ (1H), д. 8,786 м. д., 8,1 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,150 м. д., (1H).
XXIX	Алифат.: м. 1,652 – 1,736 м. д., (8H), м. 2,821 – 2,919 м. д., (4H), с. 3,488 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,351 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,469 м. д., 7,5 Гц, H _ε (1H), т. 7,671 м. д., 7,5 Гц, H _δ (1H), д. 7,971 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 8,047 м. д., 8,1 Гц, H _γ (1H), д. 8,804 м. д., 8,4 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,090 м. д., (1H).
XXX	Алифат.: с. 2,255 м. д., (3H, CH ₃ N(CH ₂ CH ₂) ₂ N), н/р м. 2,499 м. д., (4H, CH ₃ -N(CH ₂ CH ₂) ₂ N), н/р м. 2,674 – 2,729 м. д., (4H, CH ₃ N(CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,298 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,345 м. д., 8,1 Гц, H _α (1H), т. 7,476 м. д., 8,1 Гц, H _δ (1H), т. 7,677 м. д., 2,5 Гц, H _ε (1H), д. 7,979 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 8,057 м. д., 9,0 Гц, H _γ (1H), д. 8,792 м. д., 9,0 Гц, H _β (1H). NH: ш. с. 14,050 м. д., (1H).
XXXI	Алифат. СН: т. 1,107 м. д., 7,2 Гц (6H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), кв. 2,624 м. д., 7,2 Гц (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,340 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,037 м. д., 8,1 Гц, H _α (1H), т. 7,140 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,423 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 7,634 м. д., 7,2 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,909 м. д., (1H)
XXXII	Алифат. СН: м. 1,477 – 1,815 м. д., (2H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 1,666 – 1,699 м. д., (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 2,450 – 2,655 м. д., (4H, CH ₂ (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,253 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,044 м. д., 7,5 Гц, H _α (1H), т. 7,135 м. д., 7,8 Гц, H _δ (1H), т. 7,423 м. д., 7,8 Гц, H _β (1H), д. 7,630 м. д., 7,2 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,911 м. д., (1H).
XXXIII	Алифат. СН: с. 2,622 м. д., (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,772 м. д., (2H, COCH ₂ N), с. 3,333 м. д., (4H, O(CH ₂ CH ₂) ₂ N), ароматические СН: д. 7,050 м. д., 7,8 Гц, H _α (1H), т. 7,133 м. д., 7,5 Гц, H _δ (1H), т. 7,422 м. д., 7,8 Гц, H _φ (1H), д. 7,627 м. д., 7,2 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 14,002 м. д., (1H).
XXXIV	Алифат. СН: м. 1,863 м. д., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), н/р т. 2,727 м. д., (4H, (CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,508 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,037 м. д., 8,1 Гц, H _α (1H), т. 7,140 м. д., 7,2 Гц, H _δ (1H), т. 7,423 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 7,634 м. д., 7,2 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,909 м. д., (1H)
XXXV	Алифат. СН: д. 0,940 м. д., 5,4 Гц, (3H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N), сл. м. 1,386 – 1,484 м. д., (1H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 1,619 – 1,650 м. д., (4H, CH ₃ -CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N), т. 2,194 м. д., 11 Гц (4H, CH ₃ CH(CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,273 м. д. (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,037 м. д., 7,8 Гц, H _α (1H), т. 7,141 м. д., 7,6 Гц, H _δ (1H), т. 7,424 м. д., 7,6 Гц, H _φ (1H), д. 7,633 м. д., 7,5 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,872 м. д., (1H).
XXXVI	Алифат. СН: м. 1,555 – 1,815 м. д., (8H, (CH ₂ CH ₂ CH ₂) ₂ N), м. 2,711 – 2,745 м. д., (4H, (CH ₂ CH ₂ CH ₂) ₂ N), с. 3,433 м. д., (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: д. 7,040 м. д., 8,1 Гц, H _α (1H), т. 7,133 м. д., 7,5 Гц, H _δ (1H), т. 7,418 м. д., 7,8 Гц, H _β (1H), д. 7,627 м. д., 7,8 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,888 м. д., (1H).
XXXVII	Алифат. СН: с. 2,052 м. д., (3H, N(CH ₂ CH ₂) ₂ NCH ₃), н/р тр. 2,301 м. д., (4H, N(CH ₂ CH ₂) ₂ NCH ₃), н/р тр. 2,421 м. д., (4H, N(CH ₂ CH ₂) ₂ NCH ₃), с. 3,123 м. д. (2H, COCH ₂ N), ароматические СН: м. 6,795 – 6,995 м. д. H _α +H _δ (2H), т. 7,220 м. д., 7,2 Гц, H _β (1H), д. 7,425 м. д., 7,2 Гц, H _γ (1H), NH: ш. с. 13,757 м. д.
XL	Ароматические СН: д. 7,313 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,486 м. д., 7,65 Гц, H _δ (1H), т. 7,733 м. д., 7,5 Гц, H _ε (1H), т. 7,975 м. д., 8,4 Гц, H _φ (1H), д. 8,320 м. д., 8,7 Гц, H _γ (1H), д. 8,487 м. д., 8,4 Гц, H _β (1H).
XLI*	Алифатические СН: т. 0,910 м. д., 7,5 Гц (6H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N), кв. 2,529 м. д., 7,5 Гц (4H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N), т. 2,750, 6,6 Гц, (2H, N _(алиф) (CH ₂ CH ₂) ₂ N _(ар)), т. 3,935 м. д., 6,6 Гц, (2H, N _(алиф) (CH ₂ CH ₂) ₂ N _(ар)), ароматические СН: т. 7,510 м. д., 6,9 Гц, H _δ (1H), д. 7,634 м. д., 8,7 Гц, H _α (1H), т. 7,749 м. д., 6,9 Гц, H _ε (1H), д. 8,015 м. д., 9,0 Гц, H _φ (1H), д. 8,422 м. д., 8,7 Гц, H _β (1H), д. 8,521 м. д., 8,4 Гц, H _γ (1H).
XLII*	Алифатические СН: т. 0,9210 м. д., 7,2 Гц (6H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N), кв. 2,526 м. д., 7,0 Гц (4H, (CH ₃ CH ₂) ₂ N), т. 2,715, 6,4 Гц, (2H, N _(алиф) (CH ₂ CH ₂) ₂ N _(ар)), т. 3,858, 6,4 Гц, (2H, N _(алиф) (CH ₂ CH ₂) ₂ N _(ар)), ароматические СН: т. 7,198 м. д., 7,5 Гц, H _δ (1H), д. 7,301 м. д., 7,5 Гц, H _α (1H), т. д. 7,749 м. д., 1,5 Гц, 7,5 Гц, H _β (1H), д. д. 7,614 м. д., 7,5 Гц, 1,2 Гц, H _γ (1H).

* Положения протонов, обозначенных буквами α – φ — см., соответственно, структуры XXIV – XXX и XXXI – XXXVII.

ресценции этидия бромида, которую определяли как абсциссу точки перегиба кривой зависимости I, % – lg(C₅₀), где I – степень уменьшения интенсивности флуоресценции раствора (в % к контролю) при постоянной концентрации этидия бромида и ДНК [1].

Константа ассоциации лиганда с ДНК рассчитывается по формуле 1 [12]:

$$K_a = \frac{C_{Et}}{C_{50}} K_{Et}, \quad (1)$$

где K_a – константа ассоциации с ДНК исследуемого вещества, K_{Et} – константа ассоциации с ДНК этидия бромида (из [12] K_{Et} = 10⁷ М⁻¹), C₅₀ – концентрация исследуемого лиганда, которая приводит к 50 % сни-

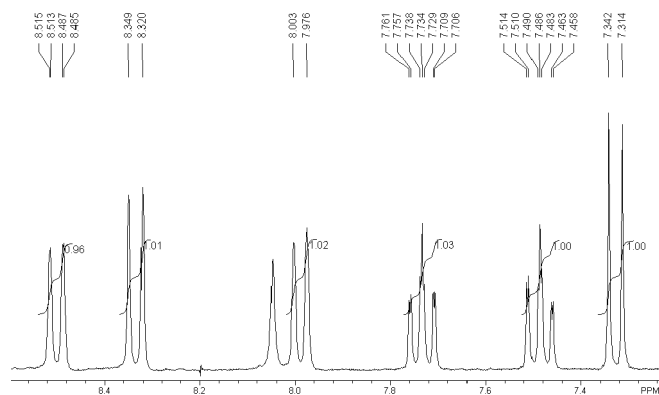


Рис. 1. Спектр ^1H ЯМР соединения XL

жению интенсивности флуоресценции, C_{Et} – концентрация этидия бромида, применявшаяся в эксперименте.

Статистическую обработку результатов выполняли согласно [13] при $p < 0,05$.

Значения $\lg C_{50}$ и $\lg K_{acc}$ исследуемых соединений приведены в табл. 2.

Как следует из приведенных данных, производные бензоизатина являются весьма сильными интеркаляторами с константами ассоциации с ДНК приблизительно на 1 – 1,5 порядка большими, чем аналогичные им изатины. Как и в случае аминоацетилгидразонов акридон [1], формилакридина и формилантрацена [2], наименее аффинными являются производные, содержащие в качестве терминальной аминогруппы 4-метилпиперазин.

Цитотоксические свойства соединений XXXI – XXXVII и XXIV – XXX и их способность к индукции интерферона изучены на культуре перевиваемых клеток тестикул поросенка, титрование интерферона проводили по способности предотвращать цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита согласно [14].

Показано, что аминоацетилгидразоны изатина XXXI – XXXVII в концентрации 250 мкг/мл не оказывают цитотоксического действия в течение 24 ч. Среди производных бензоизатина (XXIV – XXX) 4 соединения также не проявляют цитотоксичность (250 мкг/мл), а соединения XXIV и XXVII при 24-часовой экспозиции вызывают гибель 50 и 30 % клеток соответственно. Относительно высокотоксичным является только соединение XXX, оказывавшее в концентрациях 120 – 250 мкг/мл 100 % гибель клеток.

Сравнение интерферониндуцирующей активности производных изатина и бензоизатина дает (табл. 3) основание утверждать, что последние являются в целом более активным классом соединений — только 1 соединение (XXVI) оказалось малоактивным, остальные 5 — высокоактивными индукторами, в то время как из производных изатина интерферон в значительных титрах индуцировала только половина изученных веществ (3 из 6).

Таким образом, исследованные аминоацетилгидразоны изатина и бензоизатина способны интеркалиро-

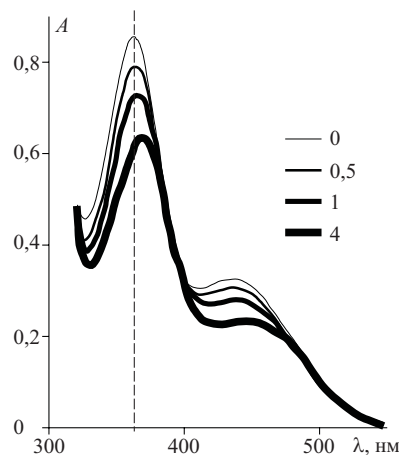


Рис. 2. Спектры XXXIII в присутствии различных концентраций ДНК.

вать в ДНК и индуцировать интерферон. Интерферониндуцирующие свойства и цитотоксичность в этом ряду соединений симпатны их аффинитету к ДНК.

Экспериментальная химическая часть

2-Гидроксиимино-N-нафтален-2-ил-ацетамид (XXXIX). В круглодонной колбе объемом 250 мл растворяют 5,5 г (0,033 моль) хлоралгидрата в 115 мл воды и затем последовательно добавляют: 35,5 г сульфата натрия, раствор 3,2 г (0,03 моль) β -нафтиламина в смеси 100 мл воды с 2,6 мл (0,03 моль) конц. HCl (уд. вес 1,19) и раствор 6,6 г (0,095 моль) солянокислого гидроксиламина в 30 мл воды. Колбу нагревают с таким расчетом, чтобы через 40 – 45 мин реакционная смесь закипела. Через 1 – 2 мин после начала кипения реакция заканчивается. После охлаждения раствора холодной водой продукт, начинающий выпадать еще во время нагревания, полностью кристаллизуется. Через 1 ч его отфильтровывают и сушат на воздухе. Продукт используют без дополнительной очистки. Выход 4 г (63 %), т. пл. $> 185^\circ\text{C}$ (с разл.); $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$.

3H-Бензо[e]индол-1,2-дион (XL). К 24 г (13 мл) нагретой до 50°C конц. H_2SO_4 (уд. вес 1,84) добавляют 4 г (0,00178 моль) сухого XXXIX с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси была в диапазоне $60 - 70^\circ\text{C}$. После добавления всего количества XXXIX раствор нагревают до 80°C и эту температуру поддерживают в течение 10 мин. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и выливают в 10 – 12-кратный объем колотого льда. Через 30 мин продукт отфильтровывают под вакуумом, промывают холодной водой (3×25 мл) до нейтральной реакции фильтрата и сушат на воздухе. Выход 1 г (28 %), т. пл. $254 - 256^\circ\text{C}$ (субл.); $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_2$. Масс-спектр: 39 (9); 51 (5); 63 (16); 70 (10); 74 (7); 88 (13); 114 (53); 126 (9); 141 (36); 169 (100); 197 (39).

1-(2-Диэтиламиноэтил)-1H-индол-2,3-дион (XLII). К раствору 11,4 г изатина (0,068 моль) в 50 мл хлороформа в присутствии суспензии 83 г (0,6 моль) карбоната калия в 20 мл воды при перемешивании добавля-

ют раствор 34,4 г (0,2 моль) диэтиламиноэтил- хлорида в 25 мл воды. Смесь эффективно перемешивают в течение 10 – 12 ч при комнатной температуре. Органический слой отделяют, водный слой экстрагируют хлороформом (3 × 20 мл). Хлороформные растворы объединяют и промывают водой (3 × 30 мл). Хлороформ упаривают, сухой остаток экстрагируют гептаном. Гептановый экстракт упаривают. Выход 18,5 г (92 %), т. пл. 25 – 26° С; C₁₄H₁₈N₂O₂. Масс-спектр: 58(10); 86(100); 246(1).

Аналогично получают соединение ХLI.

3-(2-Диэтиламиноэтил)-3Н-бензо[е]индол-1,2-дион (ХLI). Выход 0,92 г (78 %), т. пл. 105,2 – 105,5° С; C₁₈H₂₀N₂O₂. Масс-спектр: 58 (5); 86 (100); 127 (2); 296 (2).

Диэтиламиноуксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХIV). К кипящему раствору 0,789 г (0,004 моль) ХI в 55 мл этанола добавляют в один прием 0,58 г (0,004 моль) диэтиламиноуксусной кислоты гидразида и 3 мл 12 М НСl. Реакционную смесь кипятят 10 мин, охлаждают. Кристаллический осадок отфильтровывают, промывают на фильтре этанолом, охлажденным до — 18° С (3 × 2 мл) и высушивают. Перекристаллизовывают из смеси этанол – вода (5:1). Выход 0,60 г (42 %), т. пл. 212 – 214° С; C₁₈H₂₀N₄O₂. Масс-спектр: 58 (8); 72 (7); 86 (100); 324 (2).

Аналогично получают соединения ХХV – ХХХVII.

Пиперидин-1-илуксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХV). Выход 0,4 г (48 %), т. пл. 279 – 281° С; C₁₉H₂₀N₄O₂. Масс-спектр: 43 (10); 56 (8); 84 (13); 98 (100); 336 (3).

Морфолин-4-илуксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХVI). Выход 0,88 г (59 %), т. пл. 271 – 272° С; C₁₈H₁₈N₄O₃. Масс-спектр: 56 (16); 100 (100); 253 (8); 338 (3).

Пирролидин-1-илуксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХVII).

Выход 0,38 г (26 %), т. пл. 264 – 265° С; C₁₈H₁₈N₄O₂. Масс-спектр: 42 (13); 56 (8); 70 (14); 84 (100); 322 (2).

(4-Метилпиперидин-1-ил)уксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХVIII). Выход 0,95 г (61 %), т. пл. 271 – 272° С; C₂₀H₂₂N₄O₂. Масс-спектр: 44 (10); 69 (5); 97 (17); 112 (100); 350 (3).

Азепан-1-илуксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХIX). Выход 1,05 г (66 %), т. пл. 252 – 254° С; C₂₀H₂₂N₄O₂. Масс-спектр: 41 (12); 58 (12); 98 (15); 112 (100); 350 (1).

(4-Метилпиперазин-1-ил)уксусной кислоты (2-оксо-2,3-дигидробензо[е]индол-1-илиден)гидразид (ХХХ). Выход 0,93 г (55 %), т. пл. 269 – 271° С; C₁₉H₂₁N₅O₂. Масс-спектр: 42 (14); 56 (8); 58 (7); 70 (56); 99 (6); 113 (100); 154 (8); 351 (14).

Диэтиламиноуксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (ХХХI). Выход 0,7 г (45 %), т. пл. 180,5 – 182,5° С (с разл.); C₁₄H₁₈N₄O₂. Масс-спектр: 58 (8); 72 (7); 86 (100); 274 (1).

Пиперидин-1-илуксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (ХХХII). Выход 0,88 г (55 %), т. пл. 220 – 221,5° С (с разл.); C₁₅H₁₈N₄O₂. Масс-спектр: 42 (7); 56 (6); 84 (12); 98 (100); 286 (1).

Морфолин-4-илуксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (ХХХIII). Выход 1,1 г (68 %), т. пл. 212 – 214° С (с разл.); C₁₄H₁₆N₄O₃. Масс-спектр: 30 (5); 42 (7); 56 (16); 86 (12); 100 (100); 101 (7); 288 (1).

Пирролидин-1-илуксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (ХХХIV). Выход 0,5 г (32 %), т. пл. 228 – 231° С (с разл.); C₁₄H₁₆N₄O₂. Масс-спектр: 42 (11); 56 (7); 70 (12); 84 (100); 272 (1).

Таблица 2

Значения констант ассоциации и lg(C₅₀) исследуемых соединений в эксперименте вытеснения этидия бромидом из его комплекса с ДНК

Соединение	lg(C ₅₀ , М)	lg K _x	ε _p < 0,05
ХХIV	-4,5	6,30	0,18
ХХV	-4,41	6,21	0,13
ХХVII	-4,64	6,44	0,17
ХХVIII	-5,31	7,11	0,20
ХХIX	-4,72	6,52	0,18
ХХХ	-4,19	5,99	0,20
ХХХI	-4,16	5,96	0,13
ХХХII	-3,85	5,65	0,13
ХХХIII	-3,48	5,28	0,18
ХХХIV	-3,78	5,58	0,19
ХХХV	-3,6	5,40	0,16
ХХХVI	-3,69	5,49	0,15
ХХХVII	-3,63	5,43	0,13

Таблица 3

Интерферониндуцирующая активность аминоацетилгидразонов изатина и бензоизатина

Тип структуры	Соединение	Инкубация 24 ч		Инкубация 48 ч	
		Концентрация, мкг/мл	Титр (Xlog ₂)	Концентрация, мкг/мл	Титр (Xlog ₂)
Изатины	ХХХI	60 – 120	следы	180	2 – 3
	ХХХII	30 – 250	< 1	30 – 250	< 1
	ХХХIII	30 – 250	5 – 6
	ХХХIV	250	5
	ХХХV	30 – 250	5	30 – 250	5
	ХХХVI	30 – 250	< 1	180	5 – 6
	ХХХVII	30	следы	180	2 – 3
Бензоизатины	ХХIV	250	4 – 5
	ХХV	30 – 60	< 1	30 – 250	5 – 6
	ХХVI	30 – 250	< 1	30 – 250	< 1
	ХХVII	30 – 250	5 – 6
	ХХVIII	30 – 250	< 1	30 – 250	5 – 6
	ХХIX	30 – 250	< 1	180	4 – 5
	ХХХ	120	2	45	4 – 5
	250	4	30 – 250	6	

(4-Метилпиперидин-1-ил)уксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (XXXV). Выход 1,04 г (62 %), т. пл. 235 – 237° С (с разл.); $C_{16}H_{20}N_4O_2$. Масс-спектр: 44 (11); 69 (7); 98 (14); 112 (100); 113 (9); 300 (1).

Азепан-1-илуксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (XXXVI). Выход 1,05 г (66 %), т. пл. 202,5 – 204° С (с разл.); $C_{16}H_{20}N_4O_2$. Масс-спектр: 42 (8); 56 (6); 98 (11); 112 (100); 113 (8); 300 (1).

(4-Метилпиперазин-1-ил)уксусной кислоты (2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиден)гидразид (XXXVII). Выход 0,78 г (61 %), т. пл. 233 – 235° С (с разл.); $C_{15}H_{19}N_5O_2$. Масс-спектр: 32 (6); 42 (21); 43 (12); 44 (6); 56 (10); 58 (7); 70 (64); 71 (12); 98 (6); 113 (100); 146 (5); 301 (14).

Экспериментальная биологическая часть

Для формирования монослоя клеток использовали “среду роста” — синтетическую питательную среду 199 (НИИ вирусных инфекций МОЗ, Свердловск, Россия), содержащую 5 – 10 % эмбриональной сыворотки телят (“Serva”), 25 мМ НЕРЕС, 10 мМ глутамина, пенициллина и стрептомицина (по 100 ед/мл каждого). “Поддерживающая среда” — 199, содержащая 2 % эмбриональной сыворотки телят, 25 мМ НЕРЕС, 10 мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин по 100 ед/мл каждого. Для промывки монослоя клеток использовали “промывочную среду” — среда 199, 25 мМ НЕРЕС, 10 мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин по 100 ед/мл каждого. Для снятия клеток с поверхности стекла использовали 0,25 % раствор версена. Инкубирование клеток во всех случаях проводили при 37° С в термостате ТС-80 М-2, в атмосфере с влажностью 98 %, содержащей 5 % CO_2 . Использовали 96-луночные планшеты “Falcon”, США. Центрифугирование проводили на центрифуге MF-05 (ЛКВ).

Для формирования монослоя клетки вносили в лунки планшетов по 0,2 мл суспензии клеток, содержащей $2 \cdot 10^5$ клеток/мл, и инкубировали планшеты 24 – 48 ч.

Для определения токсичности исследуемых веществ и изучения индукции интерферона под их влиянием использовали культуры клеток перевивной линии тестикул поросят, полученные из музея Института ветеринарной медицины УААН. В качестве положительного контроля использовали лаферон (ИМБ НАН Украины).

Цитотоксические свойства соединений, их способность к индукции интерферона и противовирусную активность изучали согласно [14 – 17]. Статистическую обработку результатов выполняли согласно [13] при $p < 0,05$.

Изучение цитотоксичности

После формирования сплошного монослоя клеток среду роста заменяли поддерживающей средой, содержащей изучаемые соединения в концентрациях от 0,7 до 2500 мкг/мл (не менее 4 лунок на каждую изучаемую

концентрацию вещества). В качестве контроля использованы лунки, в которые была внесена поддерживающая среда, не содержащая изучаемые вещества.

Определяли $ТЦД_{100}$ — тканевую цитотоксическую дозу (мкг/мл), вызывающую полную деструкцию клеток, $ТЦД_{50}$ — тканевую цитотоксическую дозу (мкг/мл), вызывающую изменения 50 % монослоя клеток; МПК — максимально переносимая концентрация (мкг/мл), не вызывающая морфологических изменений тканей в сравнении с контролем (фактически она соответствует $ТЦД_0$). Расчет $ТЦД_{50}$ проводили по методу Рида и Мэнча [18] по формуле:

$$\log_2 ТЦД_{50} = \log_2 A - \frac{(50 - b)}{(a - b)} \cdot \log_2 \frac{A}{B} \quad (2)$$

или

$$\log_2 ТЦД_{50} = \log_2 B + \frac{(a - 50)}{(a - b)} \cdot \log_2 \frac{A}{B}, \quad (3)$$

где $\log_2 A$ и $\log_2 B$ — логарифмы концентраций по основанию 2, вызывавшие эффекты соответственно больше и меньше 50 %, но ближайшие к 50 %; a и b — эффект, вызванный концентрациями A и B , %.

Исследование интерферогенной активности

На сформированный монослой клеток вносили исследуемые вещества в виде раствора в фосфатном буфере и инкубировали в течение 1 ч. Клетки отмывали и добавляли поддерживающую среду. Через 24 и 48 ч после внесения индукторов культуральную среду центрифугировали 20 мин при 250 g, надосадочную жидкость использовали для титрования интерферона.

Для определения количества индуцированного интерферона в лунки планшета к сформированному монослою клеток тестикул поросенка вносили по 0,2 мл исследуемых проб, последовательно раститровывая их в ряду лунок. Каждое разведение испытывали в трех параллелях. Планшеты с внесенными пробами инкубировали 18 – 20 ч, культуральную среду удаляли, а к клеткам вносили ВВС в дозе 100 $ТЦД_{50}$. Контролем клеток были лунки, содержащие только поддерживающую среду, контролем вируса — лунки со сформированным монослоем, в который вносили только дозу вируса, использованную в данном опыте.

После 24-часового инкубирования проводили подсчет результатов, которые принимали во внимание только в случае, если в контрольных культурах, не содержащих вирус, цитодеструктивные изменения отсутствовали, а в контроле вируса наблюдалась полная дегенерация клеток. За титр интерферона принимали максимальное разведение препарата, которое вызывало защиту от цитопатического действия вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Ляхова, С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(4), 16 – 21 (2003).
2. Е. А. Ляхова, С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(4), 16 – 20 (2005).
3. Патент Украины 65845А (2004); Б. И., № 4 (2004).

4. J. C. Logan, M. P. Fox, J. H. Morgan, et al., *J. Gen. Virol.*, **28**(3), 271 – 283 (1975).
5. А. И. Потопальский, Л. В. Лозюк, А. Н. Миролубова, Б. Ф. Бессарабов, *Противовирусный, противоопухолевый и антилейкозный препарат изатизон*, Наукова думка, Киев (1991).
6. D. T. Graves, L. M. Velea, *Current Org. Chem.*, **4**(9), 915 – 929 (2000).
7. E. Labisbal, A. Sousa-Pedrares, W. Kaminsky, D. X. West, *Z. Naturforsch.*, **57b**, 908 – 913 (2002).
8. Н. Доналдсон, *Химия и технология соединений нафталинового ряда*, Госхимиздат, Москва (1963), сс. 69 – 70.
9. W. Rohde, R. Shafer, J. Idriss, and W. Levinson, *J. Inorg. Biochem.*, **10**(3), 183 – 194 (1979).
10. K. Hirata, J. Araya, S. Nakaike, et al, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **49**(1), 44 – 48 (2001).
11. J. Sturm, L. Schriber, *Biopolymers*, **20**, 765 – 782 (1981).
12. I. Antonini, P. Polucci, L. R. Kelland, et al., *J. Med. Chem.*, **42**(14), 2535 – 2541 (1999).
13. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990), сс. 298 – 303.
14. О. В. Стефанов (ред.), *Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. рекомендації*, Державний фармакологічний центр, Київ (2001), сс. 390 – 392.
15. В. И. Вотяков, И. Е. Бореко, Г. В. Владыко и др., *Первичное изучение противовирусных свойств синтетических и природных соединений: Метод. рекомендации*, Минск (1986), сс. 18 – 25.
16. Л. М. Вильнер, *Актуальные вопросы скрининга и последующего изучения противовирусных препаратов типа интерфероногенов В сб.: Методические вопросы научной разработки противовирусных средств*, Минск (1977), сс. 134 – 136.
17. В. И. Ильенко (сост.), *Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа. Методические указания*, Ленинград (1977), с. 35.
18. Т. В. Перадзе (ред.), *Иммунологическая диагностика вирусных инфекций*, Медицина, Москва (1985).

Поступила 06.03.06

SYNTHESIS, DNA-BINDING, AND INTERFERON-INDUCING PROPERTIES OF ISATIN AND BENZOISATIN HYDRAZONES

A. S. Karpenko¹, M. O. Shibinskaya¹, N. M. Zholobak², Z. M. Olevinskaya², S. A. Lyakhov¹, L. A. Litvinova¹, M. Ya. Spivak², and S. A. Andronati¹

¹ Bogatsky Institute of Physical Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine;

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

The ability of isatin derivatives (in particular, aminoacetyl hydrazones) to intercalate into DNA and to induce interferon secretion is demonstrated for the first time. The toxicity of isatin is much lower and its interferon inducing activity is somewhat lower as compared to the analogous properties of benzoisatin derivatives. The DNA affinity of benzoisatin derivatives is two orders of magnitude greater than that of isatin derivatives.