

Г. А. Рызванович<sup>1</sup>, Р. С. Бегунов<sup>1</sup>, О. А. Рачинская<sup>2</sup>, О. В. Муравенко<sup>2</sup>,  
А. А. Соколов<sup>1</sup>

## СИНТЕЗ И ИНТЕРКАЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПИРИДО[1,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛОВ

<sup>1</sup> Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия,  
e-mail: galia712@yandex.ru;

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарда РАН, Москва, Россия,  
e-mail: chrom@eimb.ru

Реакцией восстановительной циклизации хлоридов N-(2-NO<sub>2</sub>-4-R-фенил)пиридиния получены трициклические конденсированные производные имидазола с узловым атомом азота — пиридо[1,2-а]бензимидазолы. Описаны пути дальнейшей модификации в условиях реакций нитрования и восстановления. Показано, что все изученные пиридо[1,2-а]бензимидазолы обладают вставочной активностью, т.е. способностью вызывать недоконденсацию хромосом посредством встраивания молекул пиридо[1,2-а]бензимидазолов между парами азотистых оснований ДНК. Наиболее активное соединение — 7-NH<sub>2</sub>-пиридо[1,2-а]бензимидазол в концентрации 1 мкг/мл приводит к недоконденсации хромосом, увеличивая линейные размеры хромосомы 3 *L. grandiflorum* Desf. в 2,23 раза по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** пиридо[1,2-а]бензимидазолы, синтез, интеркалирующая активность.

Синтез биоизостерных аналогов азотистых оснований является одним из перспективных направлений химии азотсодержащих гетероциклических соединений. Это связано с тем, что данные вещества широко используются при проведении генетических исследований [1, 2], а так же в химиотерапии [3 – 5] в качестве интеркаляторов ДНК — соединений, искусственно тормозящих процесс конденсации хромосом за счет встраивания между парами азотистых оснований ДНК. Так, использование интеркаляторов ДНК не только расширяет возможности исследования хромосомной организации геномов мелкохромосомных сельскохозяйственных культур [1], но и существенно повышает точность цитогенетического анализа и картирования хромосом человека, что особенно важно для проведения сложной перинатальной цитогенетической диагностики плода.

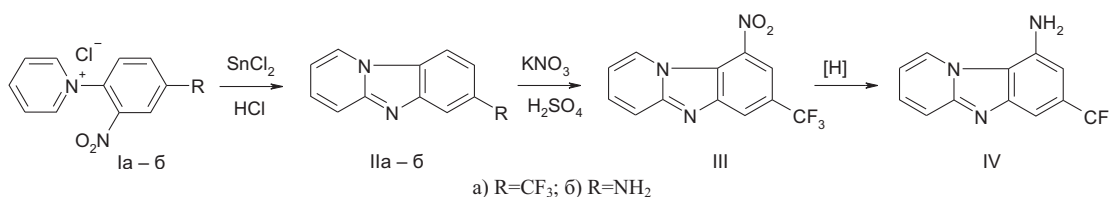
Обычно к качеству интеркаляторов используют конденсированные три- и тетрациклические азатетероциклы с относительно простой структурой, содержащие немногочисленные функциональные группы, способствующие их нековалентному связыванию с ДНК (-NH<sub>2</sub>, -COOH) [6]. Так, одними из традиционно используемых интеркаляторов являются такие широко применяемые флуоресцентные красители, как этидий бромистый [7], акридиновый оранжевый [8] и 9-аминоакридин [9]. К недостаткам перечисленных соединений относится высокая действующая концентрация,

и, как следствие, повышенные цитостатическое и мутагенное свойства. Поэтому целью работы стал синтез конденсированных азатетероциклов и исследование их биологической активности — возможности использования в качестве интеркалирующих агентов. В качестве конденсированных трициклических азатетероциклов нами были использованы новые замещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы. Синтез последних осуществляли по предложенной нами схеме, включающей восстановительную циклизацию солей N-(2-NO<sub>2</sub>-4-R-фенил)пиридиния, с последующей модификацией соединений в реакциях нитрования и восстановления.

Структура впервые синтезированных соединений доказана данными ПМР- и масс-спектроскопии (табл. 1, 2).

Таблица 1  
Свойства синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	T <sub>пл.</sub> , °C	Брутто-формула
IIa	89,7	233 – 235	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub>
IIб	91	180 – 182	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub>
III	92	226 – 228	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
IV	98	236 – 240	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub>



ЯМР  $^1\text{H}$  и масс-спектры синтезированных соединений

Соединение	Сигналы ЯМР $^1\text{H}$	MS, $m/z$ ( $I_{\text{отн.}}$ , %)
IIa	9,15 (д, 1H, $\text{H}^1$ , J 7,5 Гц), 8,53 (дд, 1H, $\text{H}^8$ , J 8 Гц, J 2 Гц), 8,16 (д, 1H, $\text{H}^6$ , J 1,5 Гц), 7,75 (д, 1H, $\text{H}^4$ , J 9 Гц), 7,68 (д, 1H, $\text{H}^9$ , J 8 Гц), 7,66 (т, 1H, $\text{H}^3$ , J 8 Гц), 7,09 (т, 1H, $\text{H}^2$ , J 7 Гц)	236 (100) [ $\text{M}^+$ ], 217 (20), 186 (12), 118 (5), 69 (5)
IIб	8,82 (д, 1H, $\text{H}^1$ , J 7 Гц), 7,9 (д, 1H, $\text{H}^9$ , J 9,5 Гц), 7,47 (д, 1H, $\text{H}^4$ , J 10 Гц), 7,38 (т, 1H, $\text{H}^3$ , J 7,5 Гц), 6,85 (т, 1H, $\text{H}^2$ , J 7 Гц), 6,82 (д, 1H, $\text{H}^6$ , J 1,5 Гц), 6,7 (дд, 1H, $\text{H}^8$ , J 10 Гц, J 2 Гц), 5,1 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	183 (100) [ $\text{M}^+$ ], 166 (4), 155 (15), 78 (12)
III	9,45 (д, 1H, $\text{H}^8$ , J = 1,0 Гц), 9,35 (дд, 1H, $\text{H}^1$ , J = 9,0 Гц, J = 1,0 Гц), 8,35 (д, 1H, $\text{H}^6$ , J = 1,0 Гц), 7,80 – 7,90 (м, 2H, $\text{H}^{3,4}$ ), 7,25 (т, 1H, $\text{H}^2$ , J = 7,5 Гц)	281 (63) [ $\text{M}^+$ ], 251 (36), 235 (100), 185 (15), 78 (29), 51 (15)
IV	8,72 (д, 1H, $\text{H}^1$ , J 6,9 Гц), 7,88 (с, 1H, $\text{H}^6$ ), 7,56 (д, 1H, $\text{H}^4$ , J = 9,3 Гц), 7,52 (с, 1H, $\text{H}^8$ ), 7,42 – 7,46 (м, 1H, $\text{H}^3$ ), 6,87 – 6,91 (м, 1H, $\text{H}^2$ ), 5,4 (с, 2H, $\text{NH}_2$ )	251 (100) [ $\text{M}^+$ ], 231 (82), 212 (14), 204 (20), 180 (40), 166 (16), 116 (23), 78 (40)

## Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  записаны на приборе Bruker DRX500 (SF = 500 МГц), растворитель DMSO- $d_6$  +  $\text{CCl}_4$ , внутренний стандарт TMS. Масс-спектры записаны на приборе FINNIGAN MAT. INCOS 50, энергия электронного потока 70 эВ. Элементный состав определяли на элементном анализаторе CHN-1, данные элементного анализа (C, H, N) соответствуют вычисленным.

**7- $\text{CF}_3$ -пиридо[1,2-*a*]бензимидазол (IIa).** К раствору соли Ia 5 г (0,0164 моль) в 20 мл изопропилового спирта при перемешивании добавляют  $\text{SnCl}_2$  11 г (0,0657 моль) в 3 % HCl. Реакцию ведут при комнатной температуре (20 – 25 °C) в течение 0,25 ч. Реакционную смесь переносят в делительную воронку, нейтрализуют раствором аммиака, экстрагируют хлороформом ( $\Sigma = 200 - 250$  мл). Органическую часть отделяют и растворитель отгоняют. Получают оранжево-желтый порошок, который перекристаллизовывают из спирта.

**7- $\text{NH}_2$ -пиридо[1,2-*a*]бензимидазол (IIб).** Получают в условиях, аналогичных для IIa, с тем лишь отличием, что восстанавливающий агент берется в соотношении, необходимом для восстановления 2 нитрогрупп субстрата, соотношение соль IIб: $\text{SnCl}_2 = 1:10$ .

**7- $\text{CF}_3$ -9- $\text{NO}_2$ -пиридо[1,2-*a*]бензимидазол (III).** К раствору 2,35 г (0,01 моль) IIa в концентрированной серной кислоте медленно прикапывают 1,02 г

(0,01 моль)  $\text{KNO}_3$  в 50 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , перемешивают при 60 °C в течение 2 – 3 ч. Реакционную массу выливают в холодную воду, нейтрализуют раствором аммиака. Выпавший осадок отфильтровывают, несколько раз промывают водой на фильтре. Кристаллизуют в смеси ДМФА — спирт.

**7- $\text{CF}_3$ -9- $\text{NH}_2$ -пиридо[1,2-*a*]бензимидазол (IV).** К раствору 1,0 г (0,0036 моль) III в спирте добавляют 4,0 г (0,026 моль)  $\text{TiCl}_3$  в 10 % HCl. Реакционную массу перемешивают в течение 0,25 ч при 20 °C. После реакцию смесь аккуратно нейтрализуют до pH = 7, затем экстрагируют продукт хлороформом ( $\Sigma = 200 - 250$  мл). После отделения органического слоя хлороформ отгоняют, получают ярко-желтый порошок, который кристаллизуют из спирта.

## Экспериментальная биологическая часть

Способность соединений IIa – б и IV вызывать недоконденсацию хромосом в клетках меристемы корешков льна вида *Linum grandiflorum* Desf. сравнивали с активностью известного и широко применяемого 9-аминоакридина [9, 10]. Для этого за 12 ч перед фиксацией препаратов проводили предобработку материала водно-спиртовыми растворами веществ в концентрации 1 мкг/мл. После клеточные препараты красили и проводили флуоресцентную детекцию хромосомы 3 *L. grandiflorum* Desf. по отработанной методике [11, 12]. Регистрацию хромосом проводили с помощью 12-битной (4095 уровней серого) черно-белой ПЗС камеры CoolSnap (Roper Scientific, USA), установленной на микроскоп Karl Zeiss Axio Imager D1 с объективами 63 × 100. Камера управлялась с помощью программы RSIImage (RoperScientific, USA). Для получения более точной локализации сигнала изображения подвергались деконволюции с помощью программы Huygens Essential by Scientific Volume Imaging B. V. Дальнейшая обработка изображений, кариотипирование и измерение длин хромосом производились с помощью программы Adobe Photoshop CS3 (Adobe Inc., USA). В качестве контроля выступали хромосомные препараты, полученные без использования интеркаляторов ДНК.

Таблица 3  
Действие предобработки ДНК-интеркаляторами на размер хромосомы 3 *Linum grandiflorum* Desf.

Соединение	Относительная длина района хромосомы 3 <i>Linum grandiflorum</i> Desf.		
	W	S	CHt
Контроль	1,0	1,0	1,0
9-Аминоакридин	1,59	1,58	1,65
IIa	1,9**	1,75**	2,48**
IIб	2,23**	2,40**	3,18**
IV	1,85*	1,64*	2,87**

\* отличия от контроля достоверны; \*\* отличия от контроля и 9-аминоакридина достоверны,  $p < 0,05$ .

Для определения удлинения хромосом в каждом варианте были измерены линейные параметры (длина: W — хромосомы, S — короткого плеча хромосомы, Cht — прицентромерного гетерохроматина) хромосом 3 *L. grandiflorum* Desf не менее чем из 30 метафазных пластинок. Достоверность различий средних значений длин в выборках определялась с использованием U-критерия Манна-Уитни,  $p < 0,05$ . Относительное увеличение размеров хромосомы 3 при действии соединений Па – б и IV представлены в табл. 3.

Установлено, что относительные размеры митотических хромосом препаратов, предобработанных новыми соединениями, по сравнению с контролем, увеличены на 85 % для IV, на 90 % для Па и на 123 % для Пб. 9-Аминоакридин увеличивает длину хромосомы 3 на 59 %, близки к нему Па и его аминозамещенное производное IV. В случае Пб недоконденсация хромосомы выражается удлинением хромосомы в 2,23 раза по сравнению с контролем без интеркалятора. Отмечено, что если 9-аминоакридин равномерно увеличивает недоконденсацию как плечей хромосомы 3 *L. grandiflorum* Desf., так и прицентромерно-теломерно-го района, в котором располагаются крупные гетерохроматические блоки, то для пиридо[1,2-а]бензимидазольных соединений характерно сродство к прицентромерному гетерохроматину. Так, средняя длина прицентромерного гетерохроматина на 42 % для Па, на 75 % для IV и на 33 % для Пб больше, чем для плеч хромосомы 3 *L. grandiflorum* Desf.

Показано, что синтезированные пиридо[1,2-а]бензимидазолы (Па – б, IV) обладают интеркалярной активностью и способны вызывать достоверную недоконденсацию хромосом, сравнимую с действием 9-аминоакридина. Кроме того, 7-аминопроизводное Пб увеличивает относительную длину хромосомы 3 *L. grandiflorum* Desf. почти в полтора раза сильнее, чем 9-аминоакридин в той же концентрации. Рекомендовано проведение дальнейших исследований по разработ-

ке методики получения препаратов хромосом низкой степени конденсации с помощью предобработки делящихся клеток Пб. Поскольку предобработка последним приводит к увеличению линейных размеров хромосомы 3 в 2,7 – 3,6, тогда как для достоверного цитогенетического анализа хромосом длина недоконденсированных хромосом не должна более чем в 3 раза превышать средний размер этих же хромосом, то действующую концентрацию и, следовательно, побочное цитостатическое действие интеркалятора ДНК возможно значительно уменьшить.

Работа выполнена при поддержке гранда концерна “Carl Zeiss” (№ ЯРУ 1/11 КЦ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Муравенко, А. В. Зеленин, *Генетика*, **45**(11), 1457 – 1471 (2009).
2. E. B. Skibo, I. Islam, A. J. Heileman, et al., *J. Med. Chem.*, **37**(1), 78 – 92 (1994).
3. И. С. Голубева, И. Ю. Кубасова, Н. П. Яровская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(7), 3 – 5 (2000);
4. С. К. Котовская, З. М. Баскакова, В. Н. Чарушин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(11), 12 – 16 (2005).
5. O. Himanshu, M. M. Bhaskar, A. Sneh, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **57**(5), 481 – 486 (2009).
6. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, et al., *J. Med. Chem.*, **50**, 5696 – 5711 (2007).
7. A. T. Karapetian, N. M. Mehrabian, G. A. Terzikian, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, No. 14, 275 – 283 (1996).
8. A. V. Zelenin, *Acridine orange as a probe for cell and molecular biology*, in: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*, Acad. Press., London (1999), pp. 117 – 135.
9. O. V. Muravenko, A. V. Amosova, T. E. Samatadze, et al., *Cytometry*, **51**(1), 52 – 57 (2003).
10. И. В. Носова, О. Ю. Семенова, Т. Е. Саматадзе и др., *Биол. мембраны*, **22**, 227 – 231 (2005).
11. О. В. Муравенко, В. А. Лемеш, Т. Е. Саматадзе и др., *Генетика*, **39**(4), 510 – 518 (2003).
12. О. В. Муравенко, Е. Д. Бадаева, А. В. Амосова и др., *Генетика*, **37**(12), 1721 – 1724 (2001).

Поступила 16.09.10

## SYNTHESIS AND INTERCALATION ABILITY OF NEW PYRIDO[1,2-a]BENZIMIDAZOLES

G. A. Ryzvanovich<sup>1\*</sup>, R. S. Begunov<sup>1</sup>, O. A. Rachinskaya<sup>2\*\*</sup>, O. V. Muravenko<sup>2</sup>, and A. A. Sokolov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150000 Russia

<sup>2</sup> Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;  
e-mail: \* galia712@yandex.ru; \*\* olga.rach@gmail.com

Reductive intermolecular cyclization of N-(2-NO<sub>2</sub>-4-R-phenyl)pyridinium chloride has been used to synthesize condensed imidazole derivatives with a nodal nitrogen atom, pyrido[1,2-a]benzimidazoles. Ways of the further modification of these compounds by means of nitriding and reduction reactions are outlined. It is established that all the obtained pyrido[1,2-a]benzimidazoles possess the intercalation activity, that is, are capable of producing undercondensation of chromosomes by incorporating between pairs of DNA nitrous bases. The most active 7-R-9-R1-pyrido[1,2-a]benzimidazoles are promising DNA-intercalators for increasing the resolution of the methods of genome sequencing. It is found that most effective substances at a concentration of 1 mg/ml increase the length of chromosomes of *L. grandiflorum* in comparison to the control by a factor of 2.23 and provide a greater delay of condensation in the experiments with 9-NH<sub>2</sub>-acridine.

**Key words:** Pyrido[1,2-a]benzimidazoles, synthesis, intercalation ability