

УДК 547.85+615.276+615.015.11

**К. В. Бондар¹, К. О. Клименко², О. І. Александрова¹, І. А. Кравченко¹,
І. А. Щепеткін³, С. А. Ляхов²**¹Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
хімічний факультет, 2, Дворянська, Одеса, Україна, 65082,
bondar_k@ukr.net, aleksa713135@mail.ru²Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
86, Люстдорфська дорога, Одеса, Україна, 65080,
alhimikir@gmail.com, sergey_a_lyakhov@ukr.net³Кафедра 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 афінитет 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, афінитет, карагінан, набряк, запалення, шури.

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 циклооксигенази – при цілій низці захворювань, що супроводжуються запаленням та болями, їхня ефективність не завжди є задовільною, а довготермінове застосування супроводжується часто-густо важкими 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].

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.

Сpektри ^1H ЯМР реєстрували в розчинах $\text{DMSO-}d_6$ відносно сигналу розчинника (2.50 м.ч.) на приборі «Bruker Avance» (400 МГц), мас-спектри електронного удару – на спектрометрі MX-1321 із прямим введенням зразка. Енергія іонізації електронів 70 eV, температура джерела 220 °C, мас-спектри FAB – на спектрометрі VG 70-70 EQ. Іонізація здійснювалася пучком атомів аргону з енергією 10 keV (речовини розчиняли у 3-нітробензиловому спирті). ІЧ-спектри зареєстровані на спектрофотометрі з Фур'є перетворенням SHIMADZU FTIR 8400Sv таблеток 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 відхилення 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 °C 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. Перекристалізують

з оцтової кислоти. Вихід 5.0 – 5.2 г (64.5 – 67.0 %) у вигляді оранжево-червоних кристалів. $T_{пл}$ 195 – 196 °C (194 – 195 за [7]). ІЧ-спектр: 1700 – 1750 cm^{-1} (C=O кет. + C=O кисл.); 3200 – 3600 cm^{-1} (НО кислоти). Мас-спектр, m/z (I, %): 224 (18) [M^+]; 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 °C (86 – 89 °C за [8]). ІЧ-спектр: 1709 cm^{-1} (C=O кетон); 1732 cm^{-1} (C=O 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 °C (260 – 262 °C за [7]). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ м.ч.: 7.40 (д, 1 H); 7.40 (д, 1 H); 7.70 (д, 1 H); 7.80 (д, 1 H); 7.80 (д, 1 H); 7.90 (д, 1 H); 8.10 (д, 1 H); 12.60 (с, 1 H); m/z = 220; ІЧ-спектр: 3186 cm^{-1} (NH асс.); 3051 cm^{-1} (CH аром.); 1666 cm^{-1} (C=O); 1627 cm^{-1} (C=N). Мас-спектр, m/z (I, %): 220 (90) [M^+]; 164 (100); 45 (72).

4-Фенілфталазін-1(2H)-он (4). Розчиняють у 10 мл ДМАА 4.5 г (0.02 моль) бензоілбензойної 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 °C (232 – 234 °C за [9]). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ м.ч.: 7.48 – 7.61 (м, 5 H); 7.62 – 7.69 (м, 1 H); 7.83 – 7.91 (м, 2 H); 8.30 – 8.36 (м, 1 H); 12.86 (с, 1 H). ІЧ-спектр, cm^{-1} : 3302 (NH асс.); 3156 cm^{-1} (NH асс.); 2997.48 cm^{-1} (CH аром.); 3024 cm^{-1} (CH аром.); 3051 cm^{-1} (CH аром.); 1666 cm^{-1} (C=O); 1604 cm^{-1} (C=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 °C (182 – 183 °C за [10]). ІЧ-спектр: 3159 cm^{-1} (NH асс.); 3028 cm^{-1} (CH аром.); 3009 cm^{-1} (CH аром.); 1651 cm^{-1} (C=O); 1616 cm^{-1} (C=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), перекристалізують з ДМАА та промивають холодним ацетоном (3 × 5 мл). Вихід 2.5 г (26 %). $T_{пл}$ 151 – 152 °C (150 – 151.5 °C за [11]). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ м.ч.: 2.40 (т, 2 H); 2.90 (т, 2 H); 7.40 (м, 3 H); 7.70 (д, 2 H); 10.90 (с, 1 H);

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

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

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. 1а) 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. 1b). Обидві сполуки – **1** та **2** – утворюють водневі зв'язки завдяки фрагменту $=\text{N}-\text{XH}$ (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 вдалися 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-фенілпіридазин-3(2H)-ону (**6**), «заміна» фенілу в **6** на метил – до 6-метилпіридазин-3(2H)-ону (**7**). «Гідрування» подвійного зв'язку в **6** та **7** – до відповідних 6-заміщених-4,5-дигідропіридазин-3(2H)-онів **8** та **9**.

Таким чином, маємо (рис. 2) логічну низку сполук, які містять суттєвий для зв'язування в кармані JNK фрагмент $=\text{N}-\text{NH}-$, з поступовою зміною будови, такою, що дозволяє відстежити основні тенденції в зміні афінитету 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. 1a, 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).

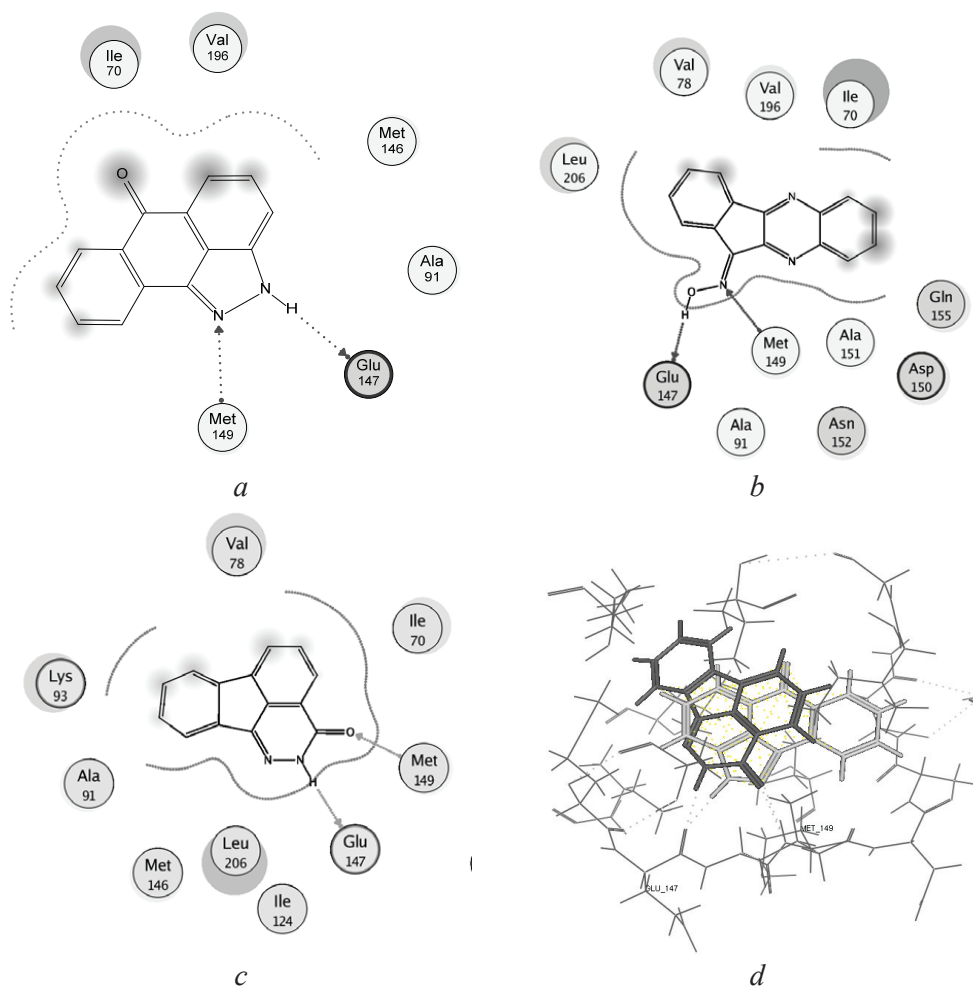


Рис. 1. Схема взаємодії сполук **1** (a) за [13], **2** (b) за [14] та **3** (c) з амінокислотами в субстрат-зв'язуючому центрі JNK3 та суперпозиція **3** з **1** в кармані JNK (d).

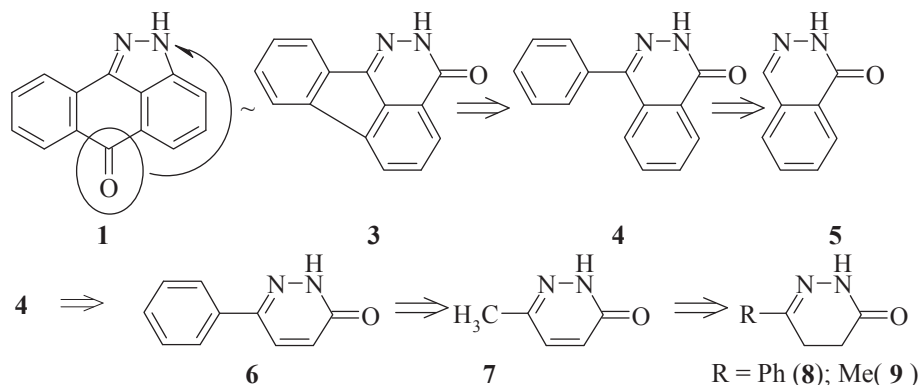


Рис. 2. Логічний зв'язок між структурами дибензо[cd,g]-індазол-6(2H)-ону (1) індено[1,2,3-de]фталазін-3(2H)-ону (3), фталазіну (4, 5) та піридазіну (6–9).

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 (с, 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, впливає, що наявність арильного замісника положенні, аналогічному для **4** має суттєво сприяти стабільності комплексу лігандів з JNK3 та, можливо, їх вибірковості.

-SF

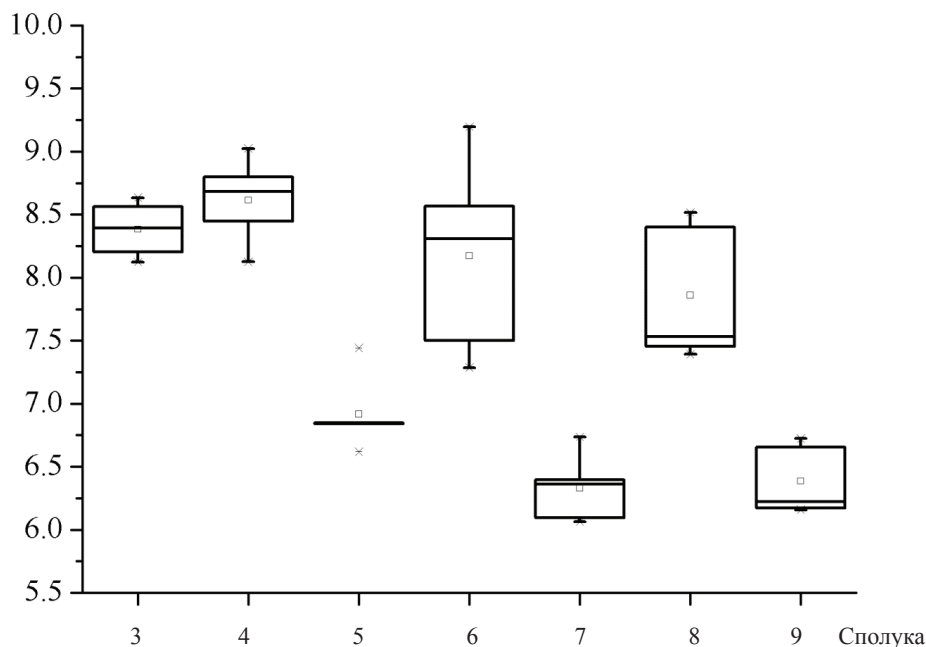
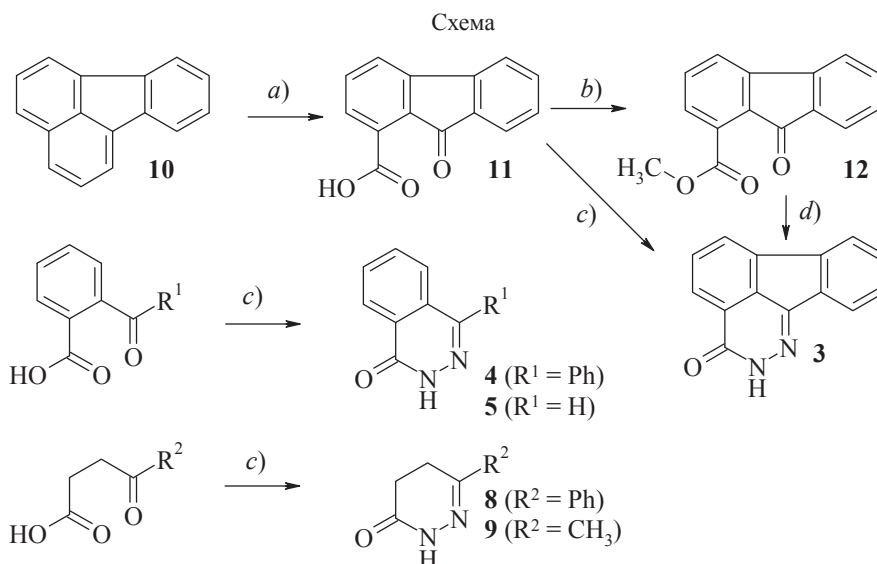


Рис. 3. Залежність діапазону значень скорінг-функції від будови сполуки

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(2*H*)-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(2*H*)-он (**4**), фталазін-1(2*H*)-он (**5**) та 6-заміщені-4,5-дигідропіридазін-3(2*H*)-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 мас-спектрах (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 cm^{-1} (C=N-зв'язок), 1650 – 1682 cm^{-1} (C=O-група); 3024 – 3087 cm^{-1} (ароматичні C–H-зв'язки); 3150 – 3200 cm^{-1} (N–H-зв'язки); в спектрах сполук **8** та **9** додатково спостерігалися смуги при 2916 – 2050 cm^{-1} (алі-



a) CrO_3 , $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 100 °C, 6 год; b) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ кип. 8 год.; c) $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$, нагрівання, 3 год.; d) $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$, AcOH/MeOH кип., 45хв

фатичні C–H-зв'язки). В ІЧ-спектрі **12** спостерігалися дві смуги поглинання при 1709 cm^{-1} та 1732 cm^{-1} (карбонільні групи флуоренону та естеру, відповідно) та була відсутня широка смуга при 3250 – 3650 cm^{-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- κ B/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 десяти-двадцятикратного 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 афінитет до JNK в стандартних умовах [15] компанією KINOMEscan (San Diego, CA, USA). Встановлено, що константа дисоціації для **3** відносно JNK1 становить $111 \pm 25 \mu\text{M}$, (крива концентрація – ефект, з яких впливає це значення наведена на рис. 4).

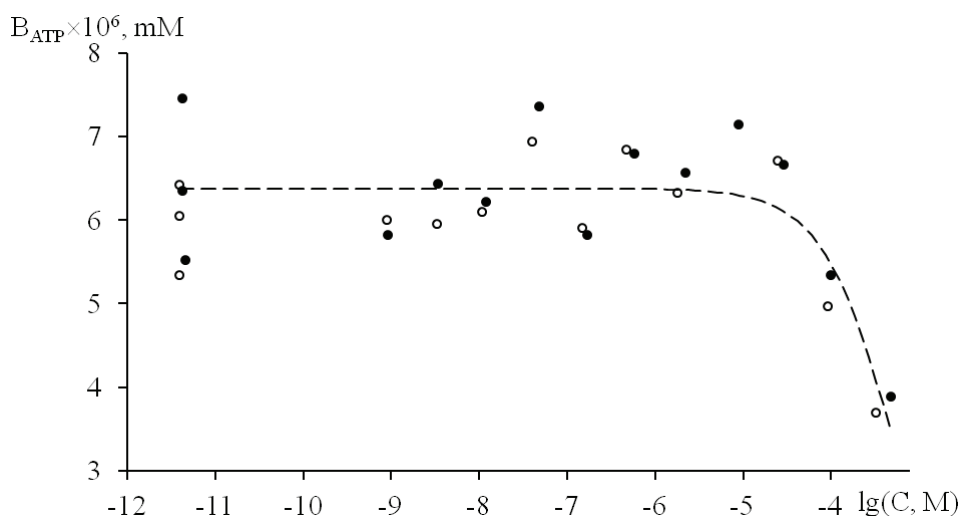


Рис. 4. Результати дослідження афінитету сполуки **3** конкуренцією з АТФ за місце зв'язування на JNK (наведені результати двох паралельних експериментів)

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 перевірено 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.

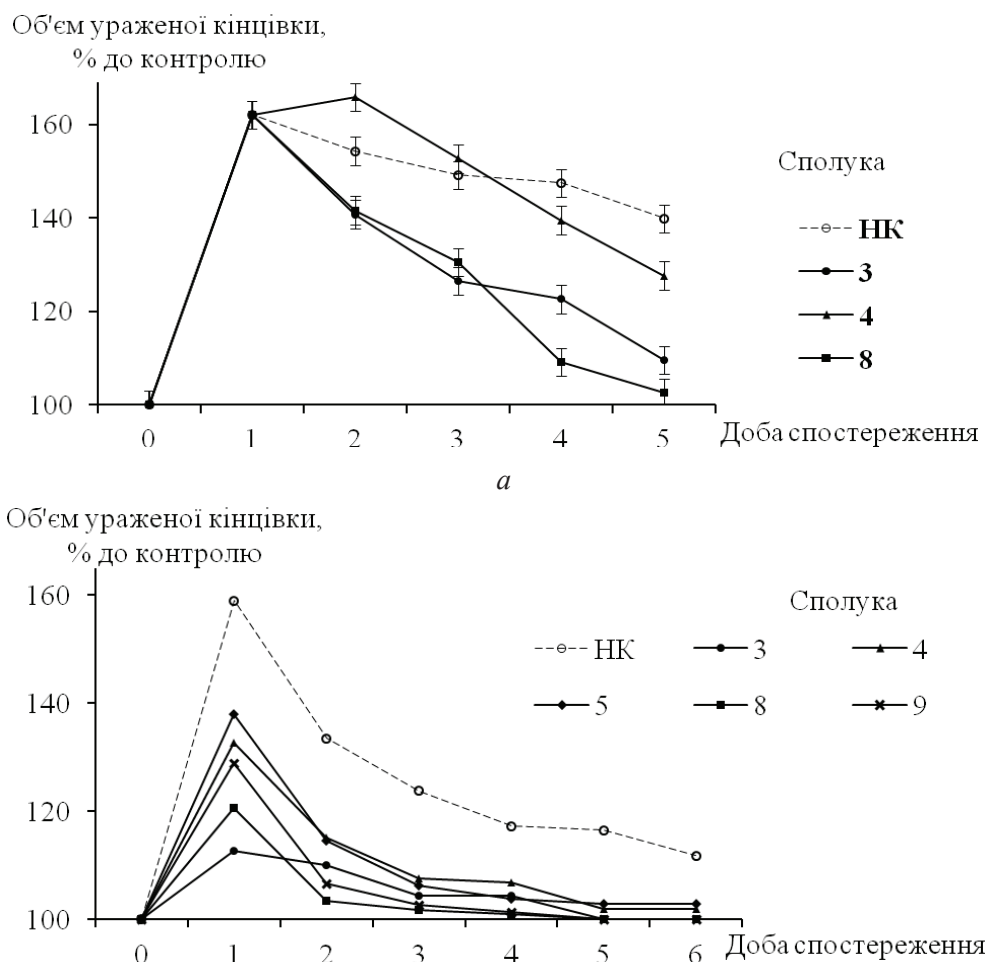


Рис. 5. Вплив інденфталазінону (3) та його аналогів на об'єм набряку, викликаного введенням карагінану; а – терапія; б – профілактика. НК – нелікований контроль

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., Nüssler 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: Ecaine – 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 für 4,5-Dihydro-2H-3-pyridazinone // *Synthesis.* – 1984., № 9. – P. 786 – 787.
 13. Scapin G., Patel S.B., Lissnock 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. Бондарь¹, К. О. Клименко², О. И. Александрова¹, И. А. Кравченко¹,
И. А. Щепеткин³, С. А. Ляхов²**

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
химический факультет, 2, Дворянская, Одесса, Украина, 65082,
bondar_k@ukr.net, aleksa713135@mail.ru

²Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
86, Люстдорфская дорога, Одесса, Украина, 65080,
alhimikir@gmail.com, sergey_a_lyakhov@ukr.net

³Кафедра иммунологии и инфекционных болезней,
Университет штата Монтана, Бозман, МТ 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 активность и может рассматриваться как соединение-хит для последующего создания противовоспалительных агентов.

Ключевые слова: инденофталазин, синтез, киназы, докинг, провоспалительные цитокины, аффинитет, карагинан, отек, воспаление, крысы.

**K. V. Bondar¹, K. O. Klimenko², O. I. Alexandrova¹, I. A. Kravchenko¹,
I. A. Schepetkin³, S. A. Lyakhov²**

¹Odessa National University, Chemistry department,
Dvoryanskaya St. 2., Odessa, 65026, Ukraine

²A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine,
Lyustdorfskaya Doroga 86, Odessa, 65080, Ukraine

³Department 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 (¹H 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 IC₅₀ > 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. *Polciklicheskie aromaticheskie uglevodorody v sinteze biologicheskii aktivnykh veshchestv: Monografija* [Polycyclic aromatic hydrocarbons in the synthesis of biologically active substances]. – H.: «BET», 2013. 166 p.
8. *Slovar' organicheskikh soedinenij. Stroenie. Fizicheskie i himicheskie svoystva vazhnejshih organicheskikh 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(9*bH*)-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(2*H*)-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-2*H*-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