

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

САЗОНОВ КИРИЛО ДМИТРОВИЧ

УДК 547.863.18+547-327

ДИСЕРТАЦІЯ

**СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ АМІДНИХ
ПОХІДНИХ ІНДЕНОХІНОКСАЛІНОВОГО РЯДУ**

102 Хімія

10 Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К.Д. Сазонов

Науковий керівник – Ішков Юрій Васильович, доктор хімічних наук, ст. наук. сп.

Одеса 2025

АНОТАЦІЯ

Сазонов К.Д. Синтез та біологічна активність нових амідних похідних інденохіноксалінового ряду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 10 – Природничі науки за спеціальністю 102 Хімія. Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, МОН України, Одеса, 2025.

Дисертацію присвячено розробці ефективного методу синтезу амідних похідних 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти, дослідженню їх фізико-хімічних характеристик, афінитету до ДНК, а також деяких біологічних властивостей.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, зазначено наукову новизну і практичну значимість отриманих результатів.

У **першому розділі** представлено огляд літератури, в якому систематизовано дані літературних джерел щодо методів синтезу інденохіноксалінових похідних та аналізу їх біологічної активності. Окремо увагу приділено інтеркаляційному способу взаємодії сполук цього класу із ДНК. Охарактеризовано *in silico* методи, які застосовувались в роботі.

У **другому розділі** представлено методики синтезу як досліджуваних, так і вихідних сполук, їх ідентифікаційні параметри. Наведено методики, умови й основні етапи хімічних досліджень та біологічного скринінгу, опис реактивів, характеристики устаткування та обладнання, які застосовували у роботі.

Третій розділ присвячено прогнозуванню *in silico* біологічної активності амідів, які планувалося синтезувати. За допомогою програми ADMETlab 2.0. проаналізовано їх фізико-хімічні параметри та встановлено, що за правилами Ліпінські вони можуть бути віднесені до “drug-like”. Оцінка фармакокінетичних характеристик показала, що всі сполуки з невеликою долею ймовірності здатні абсорбуватися у кишечнику людини, а деякі – здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр. Майже всі сполуки характеризуються низьким

значенням кліренсу і відносяться до препаратів з коротким та надкоротким періодом напіввиведення. Згідно прогнозу всі синтезовані речовини є доволі токсичними, проте високі значення параметрів мутагенного потенціалу та генотоксичності опосередковано можуть вказувати на можливість їх інтеркаляції до ДНК, що вказує на їх потенціал для лікування пухлин або вірусних інфекцій.

Скринінг фармакологічних властивостей веб-сервером PharmMapper підтвердив здатність амідів зв'язуватись з біологічними мішенями, переважна більшість яких приймають участь у реплікації ДНК та поділі клітин. Зокрема передбачено, що деякі із синтезованих сполук можуть взаємодіяти з білками умовно-патогенних мікроорганізмів *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*. Майже всі сполуки з високою вірогідністю можуть інгібувати протеїнкінази, які відіграють ключову роль у процесі зростання та поділі клітин. Крім того, деякі з них потенційно можуть пригнічувати дію інтерферон-індукованої протеїнкінази, надмірна активність якої призводить до запалення та пошкодження тканин.

Молекулярним докінгом підтверджено, що усі сполуки можуть утворювати комплекси включення із двоспіральними полінуклеотидами, тобто є потенційними інтеркаляторами до ДНК. Показано, що 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонова кислота значно поступається за виграшем в енергії зв'язування з ДНК у порівнянні з її амідними похідними, що підтвердило доцільність їх синтезу та подальших досліджень.

Четвертий розділ присвячено синтезу базової сполуки – 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти та розробці на її основі ефективного та універсального методу синтезу амідних похідних. Було доведено регіоселективність реакції синтезу 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти при конденсації 2,3-діамінобензойної кислоти з нінгідрином і встановлено, що утворюється кислота із карбоксильною групою в положенні 6 інденохіноксалинового каркасу. Описано етапи розробки способу амідування 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти та визначений найефективніший метод – шляхом активації карбоксильної групи етиловим естером монохлорвугільної кислоти. Цим методом синтезовано десять амідних

похідних 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти (з них дев'ять сполук описано вперше) з естерами амінокислот, амінами різної будови, аміноетанолом. Нові отримані сполуки охарактеризовано елементним аналізом, ЯМР спектроскопією, хромато-мас-спектрометрією. Визначено температури плавлення всіх синтезованих речовин та константи іонізації сполук, що мають аміногрупи у складі бічного ланцюга.

П'ятий розділ присвячено визначенню афінітету отриманих сполук до ДНК, а також дослідженню антибактеріальної, антифунгальної та анальгетичної активності. Встановлено, що всі синтезовані карбоксаміди є високоафінними лігандами ДНК та за своїм афінітетом є або близькими до відомого препарату аміксину, або навіть переважають його, що дозволяє їх розглядати як потенційні противірусні агенти з можливою імуномодуляторною дією.

Для сполук з аміногрупами у складі лінкерного амідного ланцюга методом спектрофотометрії досліджено спосіб їх зв'язування з ДНК. Показано, що взаємодія N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду з ДНК в електронних спектрах відображується як батохромний зсув смуг поглинання з одночасним гіпохромізмом, що експериментально доводить їх взаємодію шляхом «чистої» інтеркаляції. Для інших сполук спостерігався лише батахромний зсув, без гіпохромного ефекту, що вказує на те, що разом з інтеркаляцією можливе додаткове зв'язування в малому чи великому жолобах за рахунок лінкерних груп, або поверхнєве зв'язування.

Протимікробний скринінг сполук підтвердив антибактеріальні властивості N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду по відношенню до *S. aureus*, а N-(2-гідроксіетил)-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду – до *E. coli*, як попередньо було передбачено *in silico* методом. При цьому було виявлено здатність N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду незалежно від концентрації забарвлювати середовище з *S. aureus* у зелений колір, що може мати практичне значення при розробці тест-методів на вказаний мікроорганізм.

Дослідження антифунгальної активності щодо *C. albicans*, яке також було спрогнозовано *in silico*, виявило цю властивість у сполук N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду та метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3-фенілпропаноату. При цьому значний ефект для спостерігається для них за дуже малих кількостей (0,44 та 4,0 мкг, відповідно), що вказує на значний фармацевтичний потенціал для розробки на її основі протигрибкових лікарських засобів.

2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоат був протестований на прояв аналгетичної активності, яка вивчалася *in vivo* на термічних та хімічних моделях болю. Для термічних моделей найкращий результат знеболення відзначався у групі тварин, які отримували аплікації 5 % мазі за одну годину до експерименту та достовірно зменшували больові відчуття на 63,8 %, відносно показників контрольної групи. Аналіз динаміки аналгетичної активності мазей з концентраціями 3 та 5 % свідчить про те, що вони здатні впливати на центральний компонент ноцицептивної системи та пригнічувати больові відчуття у піддослідних тварин.

Дослідження антиноцицептивної активності дослідних зразків мазей на моделі АІТЦ-індукованого болю показало, що місцеві нанесення аплікації засобів сприяли зменшенню больової чутливості у піддослідних тварин, особливо при використанні 5% мазі, що свідчить про здатність даного засобу блокувати периферичні ноцицептори, зокрема, TRPV1 та P2X-рецептори. В формалін-індукованому тесті жодна з мазей не вплинула на першу та другу фазу больової реакції, а отже можна припустити, що обраний зразок не здатний впливати на TRPA1 рецептори. Здатність дослідного зразка мазі цієї сполуки зменшували больові відчуття на термічних моделях болю, а також на моделі АІТЦ-індукованого болю вказує на перспективи для подальших поглиблених досліджень цієї сполуки в якості місцевого знеболюючого засобу.

Ключові слова: синтез, нітрогенвмісні гетероцикли, інденохіноксалін-6-карбонова кислота, амідування, аміни, естери амінокислот, константи іонізації, спектрофотометрія, інтеркалятори ДНК, *in silico* прогнозування, ADMETlab 2.0, молекулярний докінг, біологічна активність, антимікробні та антифунгальні властивості.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V. Development of an effective method for synthesis of new derivatives of indenoquinoxaline carboxylic acids with esters of α -, β -amino acids. *Вісник Одеського національного університету. Хімія*; **2024**, 1(87), 91-98.
[https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1\(87\).307869](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1(87).307869) (Фахове видання, Категорія Б)
2. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Synthesis of new derivatives of indenoquinoxalinecarboxylic acids with amines and in silico prediction of their biological activity. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*. **2024**, 6, pp 40-46.
<http://dx.doi.org/10.32434/0321-4095-2024-157-6-40-46> (Scopus, Q4)
3. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Acid-base properties and affinity to DNA of indenoquinoxalinecarboxylic acid derivatives. *Journal of Chemistry and Technologies* **2024**, 32(4), pp 916-923.
<https://doi.org/10.15421/jchemtech.v32i4.311315> (Scopus, Q4)

праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В. Розробка зручного варіанту синтезу нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з естерами α , β , γ - амінокислот. *Проблеми та досягнення сучасної хімії*, Тези Доповідей XXII Наукової Молодіжної Конференції, Одеса, Україна, Вересень 14-15, 2023; Одеса, 2023; с 24.
2. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В. Синтез нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з амінами та дослідження їх афінитету до ДНК. *Хімія і сучасні технології*, Тези Доповідей XI Міжнародної Науково-практичної інтернет-конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених, Дніпро, Україна, Грудень 06-07, 2023; ДВНЗ «УДХТУ»: Дніпро; с 74.
3. **Сазонюк К.Д.**, Ішков Ю.В., Шевченко О.В. Нові біологічно активні амідні інденохіноксалін-6-карбонової кислоти: Синтез, властивості та афінитет до ДНК. *Інноваційні напрями розвитку хімії*, Тези Доповідей I наукової конференції з

міжнародною участю, Одеса, Україна, Вересень 9-11, 2024; ОНУ імені І.І. Мечникова: Одеса, с 79.

4. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В., Шевченко О.В. Кількісне визначення афінитету до ДНК нових похідних хіноксалінового ряду з естерами амінокислот. *Modern chemistry of medicines*, Тези Доповідей Міжнародної internet-конференції, Харків, Україна, Вересень 25, 2024; НФУ: Харків; с 117.

5. **Сазонов К.Д.**, Еберле Л.В., Шевченко О.В., Ішков Ю.В. Синтез амідних похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з аміноетанолом і морфоліном та дослідження їх біологічної активності. *Хімічні проблеми сьогодення*, Збірник тез доповідей VIII Міжнародної (XVIII Української) Наукової Конференції студентів, аспірантів і молодих учених, Вінниця, Україна, Березень 25-27, 2025; ДНУ ім. Василя Стуса: Вінниця; с 74.

ANNOTATION

Sazonov K.D. Synthesis and biological activity of new amide derivatives of the indenoquinoxaline series. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field 10 – Natural Sciences, specialty 102 Chemistry. – Odesa I.I. Mechnikov National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Odesa, 2025.

The dissertation is devoted to the development of an effective method for the synthesis of amide derivatives of 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid, the study of their physicochemical characteristics, their affinity for DNA and some biological properties.

The **introduction** substantiates the relevance of the dissertation topic, formulates the goal and objectives of the research, and indicates the scientific novelty and practical significance of the results obtained.

The **first section** presents a literature review, which systematizes data from literature sources on methods for the synthesis of indenoquinoxaline derivatives and the analysis of their biological activity. Special attention is paid to the intercalation method of interaction of these compounds with DNA. The in silico methods used in the work are characterized.

The **second section** presents the synthesis methods of both the studied and the starting compounds and their identification parameters. The methods, conditions and main stages of chemical research and biological screening, a description of reagents, and characteristics of equipment and instruments used in the work are presented.

The **third section** is devoted to the in silico prediction of the biological activity of the amides that were planned to be synthesized. Using the ADMETlab 2.0 program, their physicochemical parameters were analyzed, and it was established that according to Lipinski's rules, they can be classified as “drug-like”. The assessment of pharmacokinetic characteristics showed that all compounds are likely to be absorbed in the human intestine, and some are able to penetrate the blood-brain barrier. Almost all compounds are characterized by low clearance values and belong to drugs with short and ultra-short half-lives. According to the prediction, all synthesized substances are

quite toxic; however, high values of mutagenic potential and genotoxicity parameters may indirectly indicate the possibility of their intercalation into DNA, which indicates their potential for the treatment of tumors or viral infections.

Screening of pharmacological properties by the PharmMapper web server confirmed the ability of amides to bind to biological targets, the vast majority of which are involved in DNA replication and cell division. In particular, it is predicted that some of the synthesized compounds can interact with proteins of opportunistic pathogens *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*. Almost all compounds have a high probability of inhibiting protein kinases, which play a key role in cell growth and division. In addition, some of them have the potential to inhibit the action of interferon-induced protein kinase, the excessive activity of which leads to inflammation and tissue damage.

Molecular docking confirmed that all compounds can form inclusion complexes with double-stranded polynucleotides, i.e., are potential intercalators to DNA. It was shown that 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid is significantly inferior in the gain in binding energy with DNA compared to its amide derivatives, which confirmed the feasibility of their synthesis and further studies.

The **fourth section** is devoted to the synthesis of the basic compound - 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid and the development of an effective and universal method for the synthesis of amide derivatives based on it. The regioselectivity of the synthesis reaction of 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid by condensation of 2,3-diaminobenzoic acid with ninhydrin was proven, and it was found that an acid with a carboxyl group in position 6 of the indenoquinoxaline skeleton is formed. The stages of developing a method for amidation of 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid are described, and the most effective method is determined - by activating the carboxyl group with an ethyl ester of monochlorocarbonic acid. Ten amide derivatives of 11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carboxylic acid (nine of them are described for the first time) with amino acid esters, amines of various structures, and amino ethanol were synthesized using this method. The newly obtained compounds were characterized by elemental

analysis, NMR spectroscopy, and chromatography-mass spectrometry. The melting points of all synthesized substances and the ionization constants of compounds containing amino groups in the side chain were determined.

The **fifth section** is devoted to determining the affinity of the obtained compounds for DNA, as well as the study of antibacterial, antifungal, and analgesic activity. It was found that all synthesized carboxamides are high-affinity DNA ligands, and their affinity is either close to the known drug amixin or even exceeds it, which allows them to be considered as potential antiviral agents with possible immunomodulatory effects.

For compounds with amino groups in the linker amide chain, the method of their binding to DNA was studied spectrophotometrically. It was shown that the interaction of N-[3-(dimethylamino)propyl]-11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carboxamide with DNA in the electronic spectra is displayed as a bathochromic shift of absorption bands with simultaneous hypochromism, which experimentally proves their interaction by "pure" intercalation. For other compounds, only a bathochromic shift was observed, without a hypochromic effect, indicating that, along with intercalation, additional binding in the minor or major grooves due to linker groups, or surface binding, is possible.

Antimicrobial screening of the compounds confirmed the antibacterial properties of N-[3-(dimethylamino)propyl]-11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carboxamide against *S. aureus*, and N-(2-hydroxyethyl)-11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carboxamide against *E. coli*, as previously predicted by the in silico method. At the same time, the ability of N-[3-(dimethylamino)propyl]-11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carboxamide to color the medium with *S. aureus* green, regardless of concentration, was revealed, which may be of practical importance in the development of test methods for this microorganism.

Antifungal activity against *C. albicans*, which was also predicted in silico, revealed this property in the compounds N-[3-(dimethylamino)propyl]-11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carboxamide and methyl 2-[(11-oxoindeno[1,2-b]quinoxaline-6-carbonyl)amino]-3-phenylpropanoate. At the same time, a significant

effect is observed for them at very small amounts (0,44 and 4,0 μg , respectively), which indicates significant pharmaceutical potential for the development of antifungal drugs based on it.

2-(Diethylamino)ethyl-4-[(11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carbonyl)amino]benzoate was tested for analgesic activity, which was studied in vivo in thermal and chemical pain models. For thermal models, the best analgesic result was observed in the group of animals that received applications of 5% ointment one hour before the experiment and significantly reduced pain by 63.8%, relative to the control group. Analysis of the analgesic activity dynamics of ointments with concentrations of 3 and 5% indicates that they are able to influence the central component of the nociceptive system and suppress pain in experimental animals.

A study of the antinociceptive activity of experimental ointment samples in the AITC-induced pain model showed that local application of the agents contributed to a decrease in pain sensitivity in experimental animals, especially when using 5% ointment, which indicates the ability of this agent to block peripheral nociceptors, in particular, TRPV1 and P2X receptors. Whereas in the formalin-induced test, none of the ointments affected the first and second phases of the pain response, and therefore it can be assumed that the selected sample is not capable of affecting TRPA1 receptors. The ability of the experimental sample of the ointment to reduce pain in thermal pain models, as well as in the AITC-induced pain model, indicates prospects for further in-depth studies of 2-(diethylamino)ethyl-4-[(11-oxoindeno[2,1-b]quinoxaline-6-carbonyl)amino]benzoate as a local analgesic.

Keywords: synthesis, nitrogen-containing heterocycles, indenoquinoxaline-6-carboxylic acid, amidation, amines, amino acid esters, ionization constants, spectrophotometric method, DNA intercalators, in silico prediction, ADMETlab 2.0, molecular docking, biological activity, antimicrobial and antifungal properties.

LIST OF PUBLICATIONS OF THE APPLICANT BY THESIS TOPIC

Articles in scientific and professional publications:

1. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V. Development of an effective method for synthesis of new derivatives of indenoquinoxaline carboxylic acids with esters of α -, β -amino acids. *Вісник Одеського національного університету. Хімія*; **2024**, 1(87), 91-98. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1\(87\).307869](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1(87).307869) (Фахове видання, Категорія Б)
2. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Synthesis of new derivatives of indenoquinoxalinecarboxylic acids with amines and in silico prediction of their biological activity. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*. **2024**, 6, pp 40-46. <http://dx.doi.org/10.32434/0321-4095-2024-157-6-40-46> (Scopus, Q4)
3. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Acid-base properties and affinity to DNA of indenoquinoxalinecarboxylic acid derivatives. *Journal of Chemistry and Technologies* **2024**, 32(4), pp 916-923. <https://doi.org/10.15421/jchemtech.v32i4.311315> (Scopus, Q4)

Works that additionally reflect the scientific results of the PhD thesis:

1. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В. Розробка зручного варіанту синтезу нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з естерами α , β , γ - амінокислот. *Проблеми та досягнення сучасної хімії*, Збірник тез доповідей XXII Наукової Молодіжної Конференції, Одеса, Україна, Вересень 14-15, 2023; Одеса, 2023; с 24.
2. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В. Синтез нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з амінами та дослідження їх афінитету до ДНК. *Хімія і сучасні технології*, Тези Доповідей XI Міжнародної Науково-практичної інтернет-конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених, Дніпро, Україна, Грудень 06-07, 2023; ДВНЗ «УДХТУ»: Дніпро; с 74.
3. **Сазонок К.Д.**, Ішков Ю.В., Шевченко О.В. Нові біологічно активні амідн інденохіноксалін-6-карбонової кислоти: Синтез, властивості та афінитет до ДНК. *Інноваційні напрями розвитку хімії*, Тези Доповідей I наукової конференції з

міжнародною участю, Одеса, Україна, Вересень 9-11, 2024; ОНУ імені І.І. Мечникова: Одеса, с 79.

4. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В., Шевченко О.В. Кількісне визначення афінитету до ДНК нових похідних хіноксалінового ряду з естерами амінокислот. *Modern chemistry of medicines*, Матеріали Міжнародної internet-конференції, Харків, Україна, Вересень 25, 2024; НФУ: Харків; с 117.

5. **Сазонов К.Д.**, Еберле Л.В., Шевченко О.В., Ішков Ю.В. Синтез амідних похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з аміноетанолом і морфоліном та дослідження їх біологічної активності. *Хімічні проблеми сьогодення*, Збірник тез доповідей VIII Міжнародної (XVIII Української) Наукової Конференції студентів, аспірантів і молодих учених, Вінниця, Україна, Березень 25-27, 2025; ДНУ ім. Василя Стуса: Вінниця; с 74.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ СИНТЕЗУ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ІНДЕНОХІНОКСАЛІНОВОГО РЯДУ (огляд літератури) .	24
1.1. Будова та методи синтезу сполук з інденохіноксалиновим каркасом	25
1.2. Функціоналізація інденохіноксалинового хромофору, введення лінкерних груп	35
1.3. Біологічні властивості похідних інденохіноксалину як потенційних лікарських засобів	42
1.3.1. Загальні теоретичні відомості про інтеркаляцію та структурні особливості сполук-інтеркаляторів.....	42
1.3.2. Відомості щодо біологічних властивостей інденохіноксалинових сполук	47
1.4. In silico методи прогнозування біологічної активності.....	52
Висновки до розділу 1	56
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИХІДНИХ РЕЧОВИНИ, ОПИС МЕТОДИК ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	57
2.1. Вихідні сполуки для одержання 11-оксоіндено[1,2-b]інденохіноксалин-6-карбонової кислоти та методика її синтезу	57
2.1.1. Методика синтезу 2-карбамоїл-3-нітробензойної кислоти	57
2.1.2. Методика синтезу 2-аміно-3-нітробензойної кислоти.....	57
2.1.3. Методика синтезу 2,3-діамінобензойної кислоти	58
2.1.4. Методика синтезу 11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалин-6-карбонової кислоти	58
2.2. Методики синтезу естерів амінокислот та амідів 11-оксоіндено[1,2-b]інденохіноксалин-6-карбонової кислоти	59
2.2.1. Загальна методика синтезу естерів амінокислот	59
2.2.2. Загальна методика синтезу амідів 11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалин-6-карбонової кислоти	59
2.3. Методика визначення $pK_{\text{вн+}}$ амідних похідних з аміногрупами	63
2.4. Методики визначення афінітету до ДНК	64
2.4.1. Визначення афінітету планшетним способом	65
2.4.2. Визначення афінітету методом флуоресцентної спектроскопії	68

2.4.3. Методика спектрофотометричного визначення здатності сполук до інтеркаляції.....	68
2.5. In silico методи для прогнозування ADMET властивостей та взаємодії з біологічними об'єктами	69
2.6. Методики дослідження біологічної активності	69
2.6.1. Методика антимікробного скринінгу	69
2.6.2. Методика дослідження антифунгальної активності методом резазуринової проби	70
2.7. Методи дослідження аналгетичної активності	71
2.7.1. Дослідження аналгетичної активності на моделі термічного подразнення хвоста у щурів	71
2.7.2. Дослідження аналгетичної активності при термічному подразненні у тесті «гаряча пластина»	72
2.7.3. Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «формаліновому» тесті	72
2.7.4. Дослідження аналгетичної активності на моделі алілізотіюціанат-індукованого болю	73
2.8. Апаратурне оформлення експериментальної частини.....	74
Висновки до розділу 2	75
РОЗДІЛ 3. ПРОГНОЗУВАННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ АМІДНИХ ПОХІДНИХ ІНДЕНОХІНОКСАЛІНУ МЕТОДАМИ IN SILICO	76
3.1. Визначення і аналіз ADMET-показників	76
3.2. Ідентифікація потенційних біологічних мішеней за допомогою бази даних PharmMapper.....	82
3.3. Молекулярний докінг	85
Висновки до розділу 3	89
РОЗДІЛ 4. СИНТЕЗ ТА КИСЛОТНО-ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІДНИХ ПОХІДНИХ 11-ОКСОІНДЕНО-[1,2-Б]ІНДЕНОХІНОКСАЛІН-6-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	90
4.1. Синтез 11-оксоіндено[1,2-б]інденохіноксалін-6-карбонОВОЇ кислоти	91
4.2. Синтез амідних похідних 11-оксоіндено[1,2-б]інденохіноксалін-6-карбонОВОЇ кислоти	95
4.3. Дослідження протолітичних властивостей амідів – визначення константи іонізації.....	102

Висновки до розділу 4	105
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ СИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК З ДНК ТА ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ	106
5.1. Якісне визначення можливості взаємодії з ДНК та кількісний розрахунок афінітету	106
5.1.1. Якісна перевірка на здатність сполук зв'язуватись із ДНК	106
5.1.2. Кількісне визначення афінітету до ДНК	107
5.1.3. Спектрофотометричне дослідження способу взаємодії сполук з амінними замісниками з ДНК	112
5.2. Дослідження антибактеріальних властивостей N-(2-гідроксіетил)-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду та N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду	114
5.3. Дослідження антифунгальної активності щодо <i>C. albicans</i>	118
5.4. Дослідження анагетичної активності 2-(діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату	121
5.4.1. Дослідження анагетичної активності на термічних моделях болю .	122
5.4.2. Дослідження анагетичної активності на хімічних моделях болю ...	125
Висновки до розділу 5	128
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	130
Список використаних джерел	132
ДОДАТОК А	148
ДОДАТОК Б	150
ДОДАТОК В	151

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АІТЦ – алілізотіоціанат

ДЗІ – діаметр зони інгібування

ДНК ВРХ – ДНК, виділена із селезінки великої рогатої худоби

ЕБ – етидій бромід

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ТЕА – триетиламін

ADMET – **a**bsorption, **d**istribution, **m**etabolism, **e**xcretion, **t**oxicity

CDI – карбонілдіімідазол

DCC – дициклогексилкарбодіімід

IQ – інденохіноксалін

IQ-он – 11Н-індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-он

JNK – Jun N-terminal Kinase

SF – скорінг функція

ВСТУП

Актуальність теми. Стрімке зростання інфекційних хвороб та онкологічних захворювань в сучасному світі є однією з основних проблем людства. Фахівці з синтезу лікарських препаратів пліч о пліч з біохіміками та спеціалістами в галузі фармацевтики і медицини стоять на заваді розповсюдженню небезпечних захворювань, вирішуючи проблему розробки сучасних та безпечних ліків. Органічна хімія є провідна наукою, що забезпечує перший етап на цьому шляху – синтез біологічно активних речовин. Розробка простих та надійних методик отримання органічних субстанцій, які мають лікувальну дію, була й залишається актуальною задачею. Не останню роль в цьому відіграють сучасні комп'ютерні технології, що допомагають спрогнозувати біологічну активність сполук, ще до етапу її синтезу, тим самим вони дозволяють розробникам суттєво зекономити час і ресурси.

Відомо, що біологічна активність речовини обумовлена її можливістю взаємодіяти з біологічними об'єктами в організмі, у тому числі із ДНК. Взаємодія між лікарською субстанцією та ДНК може відбуватись за рахунок різного роду взаємодій, одним із яких є інтеркаляція – вбудовування плоскої молекули хромофора між двома сусідніми парами основ ДНК (π - π -стекингова взаємодія). Якщо ДНК належить патогену (пухлини, вірусу або бактерії), це приводить до інгібування його росту. Серед сполук-інтеркаляторів вагоме значення мають N-гетероциклічні сполуки з конденсованими плоскими циклами, зокрема похідні інденохіноксалінового ряду. Останнє десятиліття вчені приділяють цьому класу значну увагу, у зв'язку із наявністю інформації про їх широкий спектр фармакологічної активності. В літературних джерелах мають місце повідомлення щодо їх протипухлинних, протизапальних, протівірусних, антибактеріальних, антидіабетичних та ін. властивостей.

Важливу роль в утворенні комплексів ліганд-ДНК відіграє не лише інденохіноксаліновий цикл, а й будова бічних (лінкерних) ланцюгів. Вони відповідальні за додаткові взаємодії, які стабілізують комплекс. Більша частина наявних публікацій присвячена синтезу похідних із замісниками відносно

простої будови (-Hal, -Alk, -NO₂, -NH₂ тощо). Їх отримують конденсацією заміщених *o*-фенілендіамінів з ди- або три- кетосполуками. Інденохіноксалінові похідні із лінкерами більш складної будови потребують розробки подальших стадій синтезу і в літературі зустрічаються нечасто, основна частина таких публікацій присвячена модифікаціям по кетонній групі (утворення оксимів, гідразидів та ін.). Разом з тим введення до інденохіноксалінового фармакофору біологічно споріднених фрагментів, таких як амідні групи, викликає науковий і практичний інтерес і потребує розробки простих і ефективних способів амідування. Малочислені публікації, щодо синтезу подібних об'єктів, вказують на їх значний біологічний потенціал.

Дане дисертаційне дослідження присвячено розробці зручного та універсального методу синтезу нових амідних похідних інденохіноксалінового ряду, визначенню їх афінитету до ДНК та оцінці пов'язаної з нею біологічної активності.

Зв'язок роботи з науковими темами, програмами, планами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі органічної та фармацевтичної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова в межах науково-дослідної теми № 368 «Пошук шляхів синтезу нових похідних нітрогеновмісних гетероциклів з біологічною активністю» (2024-2029 рр., № держреєстрації 0124U005001).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є цілеспрямований пошук ефективного методу синтезу нових амідних похідних інденохіноксалінового ряду, дослідження протолітичних властивостей, прогнозування та оцінка їх біологічної активності.

Для виконання поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. *In silico* методами оцінити можливості карбоксамідів 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти, синтез яких передбачався, як потенційних сполук-кандидатів: ADMET-скрінінгом фізико-хімічні та фармакокінетичні параметри, токсичність; молекулярним докінгом – їх

здатність до інтеркаляції в ДНК; сервісом PharmMapper визначити потенційні біологічні мішені для зв'язування.

2. Отримати 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонову кислоту реакцією циклоконденсації нінгідрину з 2,3-діамінобензойною кислотою.
3. Запропонувати препаративно зручний, ефективний та універсальний метод амідування 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти; синтезувати цим методом нові амідні похідні: з аміновмісними сполуками різної будови.
4. Дослідити протолітичні властивості тих амідних похідних, що містять аміногрупу в лінкерному фрагменті.
5. Спектрофотометричним методом дослідити афінитет синтезованих сполук до ДНК, визначити константи асоціації комплексів сполука-ДНК та спосіб їх зв'язування.
6. На підставі даних, отриманих *in silico* та експериментальними методами оцінити біологічну активність найбільш перспективних карбоксамідів на предмет антимікробної, фунгіцидної, аналгетичної активності.

Об'єкт дослідження – реакції амідування, методи і методики синтезу, *in silico* прогнозування, фізико-хімічні та біологічні властивості нових сполук інденохіноксалинового ряду.

Предмет дослідження – нові амідні похідні 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти.

Методи дослідження – органічний синтез, тонкошарова та препаративна хроматографія, елементний аналіз, ЯМР спектроскопія, хроматомас-спектрометрія, спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія, віртуальний (*in silico*: ADMET, PharmMapper, молекулярний докінг) та експериментальний (*in vitro*, *in vivo*) біологічний скринінг.

Наукова новизна одержаних результатів. В представленій роботі вперше:

- здійснений регіоселективний підхід до синтезу 6-заміщених похідних 11Н-інденохіноксалінону на прикладі 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти;
- запропонований зручний, ефективний та універсальний метод амідування інденохіноксалінових кислот, який дозволяє приєднувати аміновмісні складові різної будови (естери амінокислот, аміни, аміноспирти);
- синтезовано та ідентифіковано дев'ять нових амідів, які містять в лінкерному амідному ланцюзі фрагменти: метил- та етил-2-аміноацетату; метил 3-амінопропаноату; етил 2-[(2-аміноацетил)аміно] ацетату; метил 2-аміно-3-фенілпропаноату; новокаїну, 2,6-диметилпіримідину, етаноламіну та морфоліну;
- для останніх чотирьох вищезгаданих сполук, а також для описаної в літературі сполуки з N,N-диметилпропанаміном визначено константи протонування;
- проведений віртуальний скринінг синтезованих сполук засвідчив потенційну можливість їх використання як біологічно-активних речовин з протиінфекційною та протипухлинною дією; молекулярним докінгом показана можливість їх інтеркаляції до ДНК;
- спектроскопічними методами підтверджений афінітет синтезованих карбоксамідів до ДНК, розраховані константи асоціації комплексів та визначений характер взаємодії сполук, що містять лінкерні аміногрупи;
- експериментальним дослідженням біологічної активності встановлена антибіотична, антигрибкова та аналгетична дія окремих представників синтезованих амідів.

Практична значимість одержаних результатів. Представлений у роботі експериментальний матеріал є новим у галузі синтезу похідних 11Н-інденохіноксалінону. Запропоновано зручну, ефективну і препаративно доступну методику амідування для одержання карбоксамідних похідних інденохіноксалінового ряду, що дає можливість здійснювати цілеспрямований дизайн нових біологічно активних сполук з широким спектром дії. Віртуальним скринінгом за програмою PharmMapper спрогнозовано протиракову та

протівірусну активність синтезованих сполук. Експериментальним біологічним скринінгом виявлено низку перспективних з точки зору практичного застосування нових біологічно активних сполук, які проявляють антимікробну, антигрибкову та анальгетичну дію.

Окремі матеріали дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес кафедри органічної та фармацевтичної хімії факультету хімії та фармації Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних досліджень, аналіз літературних джерел, а також їх опрацювання виконані автором самостійно. Постановка мети й завдань дослідження, а також аналіз і узагальнення отриманих результатів проведені спільно із науковим керівником д.х.н., ст. наук. сп. Ішковим Ю.В. В експериментах щодо біологічної активності приймали участь к.б.н., доц. Зінченко О. Ю. (Одеський національний університет імені І.І. Мечникова) та к.б.н., доц. Еберле Л. В. (Одеський національний медичний університет), за що автор висловлює їм глибоку вдячність. Також автор вважає за необхідне подякувати д.х.н., проф. Шевченко О.В. за цінні поради та зауваження під час обговорення результатів експериментів та оформлення дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наступних конференціях: XXII Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (Одеса, 2023); XI Міжнародна науково-практична інтернет-конференція здобувачів вищої освіти та молодих учених (Дніпро, 2023); I наукова конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями розвитку хімії» (Одеса, 2024); Міжнародна internet-конференція «Modern chemistry of medicines» (Харків, 2024); VIII Міжнародної (XVIII Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 2025)

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті у фахових періодичних наукових виданнях, із них 2 у виданнях, що індексуються

наукометричною базою Scopus та 5 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

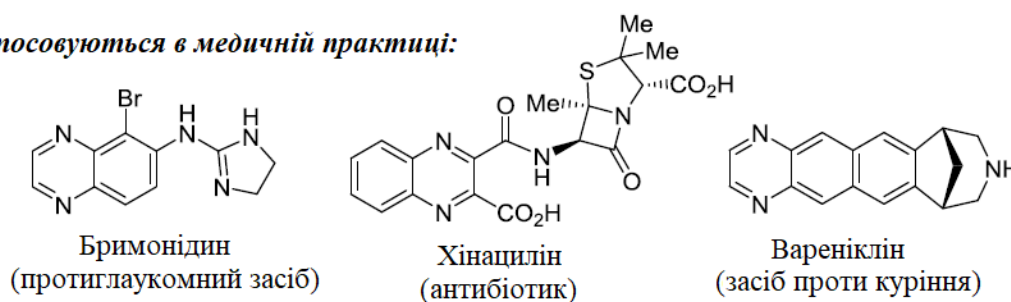
Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку цитованої літератури, який налічує 140 джерел, містить 63 рисунки, 13 таблиць та 3 додатки. Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 151 сторінку.

РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ СИНТЕЗУ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ІНДЕНОХІНОКСАЛІНОВОГО РЯДУ (огляд літератури)

Нітрогеновмісні гетероциклічні сполуки займають важливе місце серед органічних сполук через їх ключову роль у розробці нових лікарських субстанцій в світі останніх викликів, що постають перед людством: стрімке зростання хвороб, викликаних розповсюдженням нових штамів вірусів, бактерійних інфекцій, злоякісних пухлин тощо.

Хіноксалін відноситься до нітрогеновмісних гетероциклічних структур сімейства бензодіазинів, в якому бензенове кільце сполучене із піразиновим циклом. Похідні хіноксаліну демонструють широкий спектр терапевтичних властивостей, таких як протиінфекційні [1, 2], протипухлинні [3, 4] та багато інших [5]. Хіноксаліновий фармакофор входить до складу як добре відомих ліків, таких як бримонідин, хінацилін варениклін, так і нових лікарських речовин, що лише розробляються [6] (рис. 1.1).

Застосовуються в медичній практиці:



Проходять клінічні випробування як протипухлинні агенти:

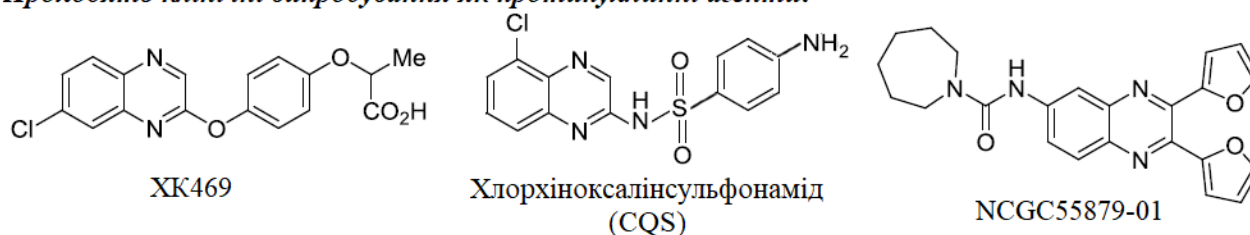


Рис. 1.1. Деякі приклади існуючих та потенційних лікарських препаратів на основі хіноксалінового ядра

Варто зазначити, що лише за останні п'ять років питанням щодо синтезу та різноманітних властивостей похідних хіноксаліну присвячено багато оглядових робіт [1,7-11], що беззаперечно вказує на важливість і актуальність даної тематики.

1.1. Будова та методи синтезу сполук з інденохіноксаліновим каркасом

Серед похідних хіноксалінів, особливу увагу привертають похідні інденохіноксалінового ряду, одним з представників яких є 11Н-індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-он (IQ-он) (рис. 1.2, А), який представляє собою кристалічний порошок жовтого кольору з $T_{\text{топ}}$, яка дещо відрізняється в роботах різних авторів (217-218 [12]; 222 [13]; 228-229 [14]), що вірогідно обумовлено різними способами вимірювання та точністю методу.

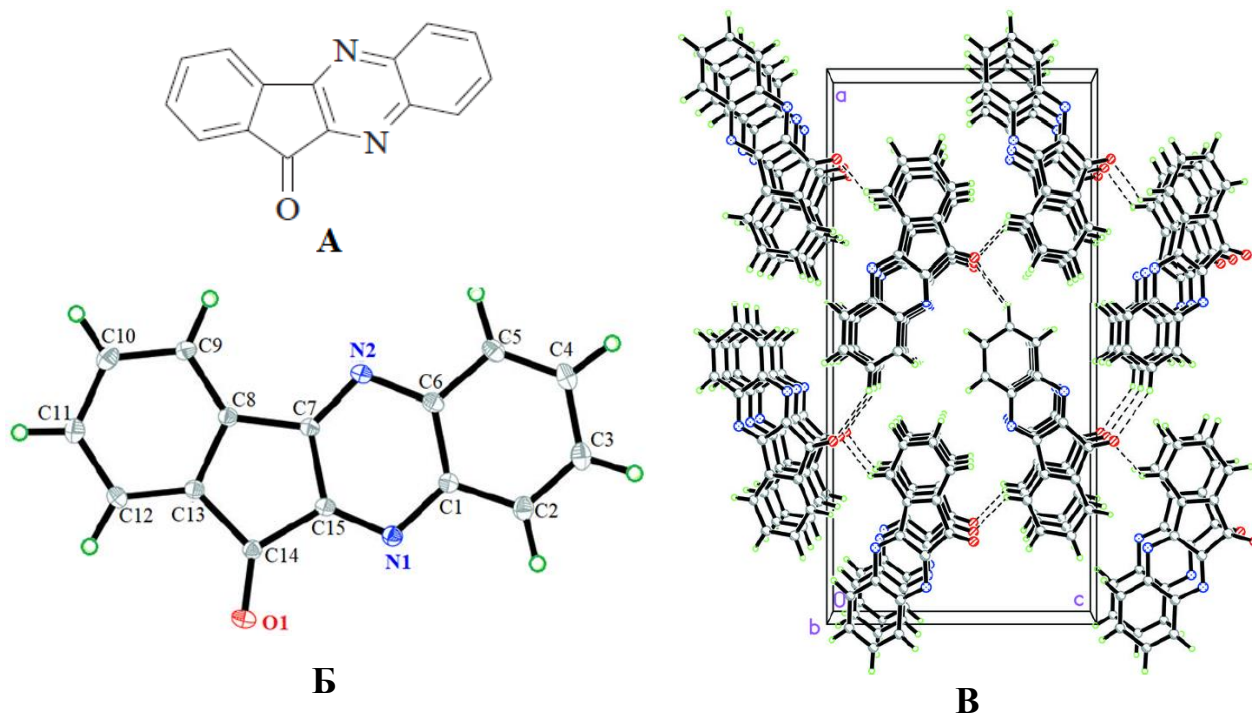


Рис. 1.2. Зображення 11Н-індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-ону: А, Б – структурна формула; В – міжмолекулярна взаємодія в кристалі

Молекула індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-ону приблизно плоска з максимальним відхиленням 0,039 Å для атома С14. Вона містить три кільцеві системи: інденову (С7–С15), піразинову (N1/N2/С6–С7/С1/С15) та бензенову (С1–С6) (рис. 1.2, Б). Піразинове кільце утворює двогранні кути 0,48° та 1,34° з інденовим кільцем та бензольним кільцем відповідно. Двогранний кут між інденовим та бензольним кільцем становить 0,88°. У кристалі молекули пов'язані слабкими міжмолекулярними водневими зв'язками С3-Н3...О1 і С9-Н9...О1 (рис. 1.2, В), які сприяють стабілізації кристалічної структури [15].

Наявність у структурі 11H-індено[1,2-b]хіноксаліну (IQ) плоского конденсованого тетрациклічного фрагменту, що є комплементарним за формою і зарядами до багатьох біомолекул, спричиняє їх підвищену спорідненість до останніх при зв'язуванні з ними (процес має назву «інтеркаляція»). Така взаємодія зазвичай впливає на процес реплікації генетичного матеріалу певних білків (протеази, полімерази, топоізомерази тощо), що приводить до їх інгібування і зрештою пригнічує їх репродукцію [16]. Внаслідок цього сполуки, що мають ароматичні або гетероароматичні системи з трьома- і більше конденсованими ядрами, зокрема й IQ-он, проявляють біологічну активність і потенційно можуть бути основою для створення лікарських препаратів широкого спектру дії, про що більш детально буде описано далі (див. розділ 1.3).

Розробка простих синтетичних шляхів з легкодоступних реагентів для органічних сполук, що плануються для промислового масштабування, є одним з основних завдань в органічному синтезі. IQ-он та його похідні в цьому сенсі представляють інтерес, оскільки процес їх одержання є доволі простим і має ознаки «зеленого» підходу в хімії.

Вперше синтез 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-она був описаний у роботі [12] (рис. 1.3). Сполука отримана конденсацією *o*-фенілендіаміну з нінгідрином (1:1) у розведеній оцтовій кислоті. Продукт реакції випадає в осад, який відфільтровують. Цей метод вважається найбільш зручним через його м'які умови, нетоксичність розчинника та через добрі виходи.

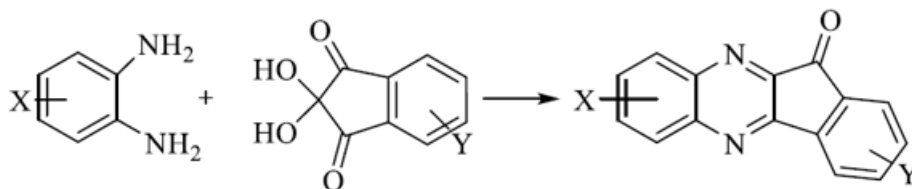


Рис. 1.3. Схема канонічного методу синтезу похідних 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону

У 1962 році був запропонований інший підхід до синтезу IQ-ону та його аналогів, шляхом окиснення 11H-індено[1,2-b]хіноксаліну [13]. Метод передбачає дві стадії: спочатку шляхом конденсації *o*-фенілендіаміну та 1,2-

індендіону отримують IQ, який далі окиснюють дихромовою кислотою (рис. 1.4). Другу стадію здійснюють протягом 2,5 годин.

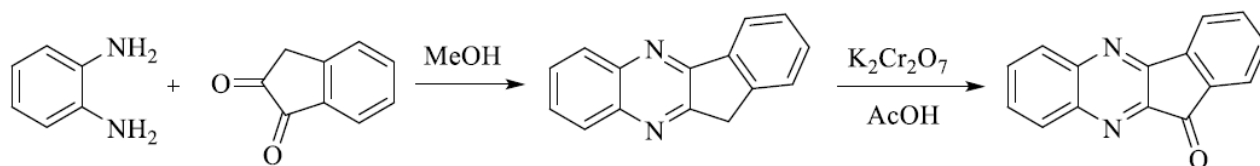


Рис.1.4. Схема синтезу 11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-ону шляхом окиснення 11Н-індено[1,2-б]хіноксаліну

Не дивлячись, що вихід цільового продукту є доволі добрим (85%) цей метод не набув широкого застосування, вочевидь в силу більшої трудомісткості.

У зв'язку з тим, що потенційне фармацевтичне застосування похідних інденохіноксаліну є доволі значущим, і потребуватиме промислового масштабування, останнім часом дослідниками приділяється велика увага розробці зелених методів синтезу IQ-ону та його похідних, а також методам, що мають значну економічну доцільність. І хоча класичний спосіб синтезу IQ-ону (рис. 1.3) теж можна вважати доволі екологічним, бо він відбувається за участі нетоксичних розчинників, тим не менш дослідники не припинили пошуків у цьому напрямку.

Мікрохвильовий підхід є екологічно чистим та зеленим методом синтезу через просту експериментальну процедуру, короткий час реакції, прискорену швидкість реакції, запобігання небезпечним хімічним викидам та покращеним виходам продукту, що є додатковими перевагами порівняно із звичайним методом нагрівання зі зворотним холодильником [17]. У 2007 автори роботи [18] виявили, що мікрохвильова конденсація нінгідрину з фенілендіаминами і малононітрилом в умовах відсутності розчинників призводить до швидкого утворення відповідних похідних 2-(інденохіноксалін-11-іліден)малононітрилу (рис. 1.5). Продукти були легко отримані додаванням води до реакційної суміші, з добрими результатами щодо виходу та чистоти за короткий термін. Найімовірніше, реакція протікає шляхом циклоконденсації нінгідрину та

фенілендіаміну з наступним утворенням відповідного IQ з малононітрилом за Кневенагелем (рис.1.5).

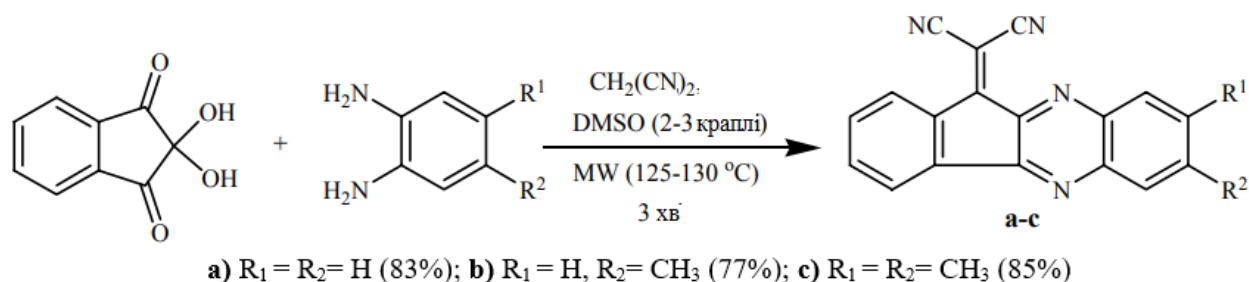


Рис. 1.5. Мікрохвильова конденсація нінгідрину з фенілендіамінами і малононітрилом

Etman зі співр. [14] запропонували цікавий нестандартний спосіб отримувати IQ-он класичною реакцією циклоконденсації шляхом твердофазного синтезу із використанням техніки кульового млина без участі будь-яких каталізаторів або розчинників. Суміш реагентів (1:1) подрібнювали в кульовому млині при кімнатній температурі протягом 1 год. Продукт, що утворився, висушували при температурі 8 °C у вакуумі, при цьому отримували IQ-он з виходом 100 %, який не потребував додаткового очищення.

Нещодавно китайськими вченими [19] було розроблено методику синтезу похідних IQ циклоконденсацією *o*-фенілендіаміну з 2-індолом із використанням як каталізатору β -циклодекстрину. Реакція здійснюється у водному розчині, а каталізатор може бути регенерований і використовуватись декілька циклів, при цьому виходи продуктів залишаються однаково високими (82-85%). Механізм, запропонований авторами, передбачає включення *o*-фенілендіаміну до порожнини β -CD, при цьому відбувається активація аміногруп із подальшою реакцією конденсації по одній аміногрупі. Отриманий при цьому проміжний продукт окиснюється киснем повітря. На останній стадії відбувається його конденсація з другою аміною групою, таким чином цикл замикається (рис. 1.6).

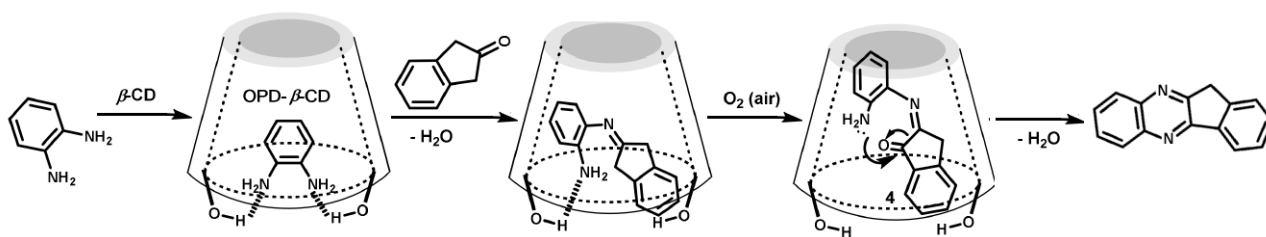


Рис. 1.6. Механізм реакції утворення IQ за участі β -циклодекстрану

У 2022 році іранським вченим [20] вдалося отримати похідні інденохіноксаліну шляхом однореакторної трикомпонентної реакції між нінгідрином, малононітрилом та різними діамінами у водному середовищі в умовах без каталізатора. Високі виходи (73–98%) цільових продуктів було досягнуто за короткого часу реакції при кімнатній температурі (рис. 1.7). Проста обробка, відсутність колонкової хроматографії, хороші або відмінні виходи, швидка реакція та зелений розчинник є визначними перевагами цього методу.

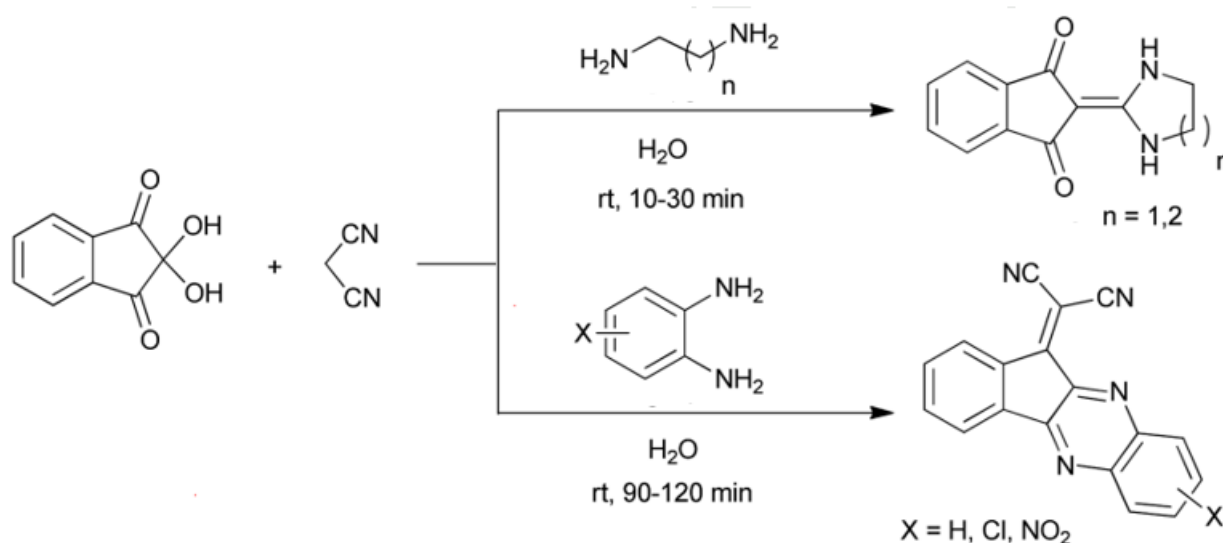


Рис. 1.7. Метод отримання похідних інденохіноксаліну шляхом однореакторної трикомпонентної реакції

Замісники, що містяться в інденохіноксаліновому каркасі, можуть суттєво впливати на стійкість комплексів з біологічними мішенями, а разом з тим на властивості потенційних ліків. Наприклад, в роботі [21] було показано, що введення замісника хлор в 3-положення 1,2-діамінобензолів суттєво збільшує селективність для JNK1/3 у порівнянні з JNK2. Тому дослідники постійно

розширюють коло похідних інденохіноксалінів, вводячи різні замісники в структури вихідних речовин, частіше за все в *o*-фенілендіамін.

Так, автори [22] отримували 6- та 7-метильні похідні IQ-ону, які потім перетворювали на відповідні амінометильні сполуки (рис. 1.8). Отримані продукти виявились низькотоксичними інтеркаляторами ДНК перспективними для подальших досліджень як потенційні противірусні агенти, що не поступалися аміксіну.

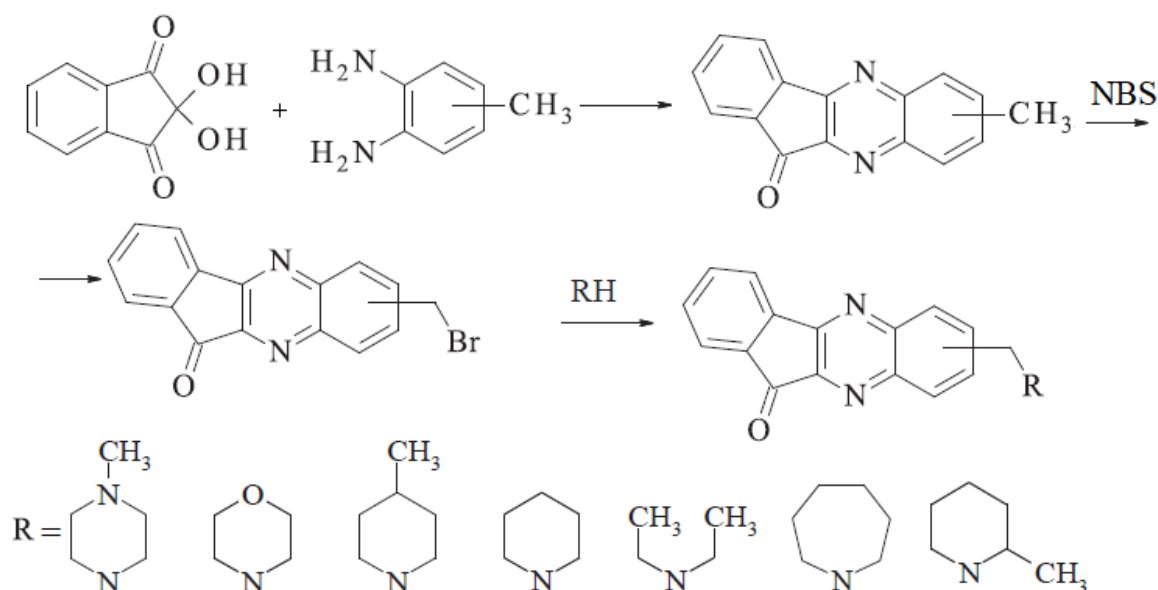


Рис. 1.8. Схема синтезу 6- та 7-амінометил-11Н-індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-онів

В роботі [23] класичною реакцією також було отримано низку заміщених похідних (рис. 1.9). Як вихідні реагенти брали не лише заміщені *o*-фенілендіаміни, а й вводили метильну групу до нінгідрину.

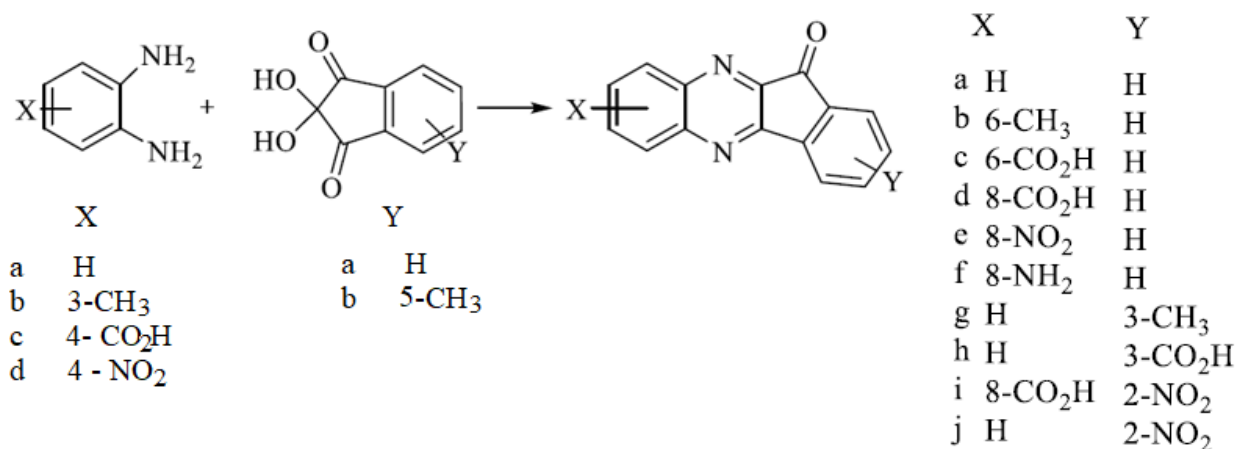


Рис. 1.9. Схема синтезу похідних IQ-ону в роботі [23]

Автори [24] синтезували 13 похідних IQ-ону реакцією циклоконденсації заміщених фенілендіамінів з нінгідрином в оцтовій кислоті та їх оксимів (рис. 1.10).

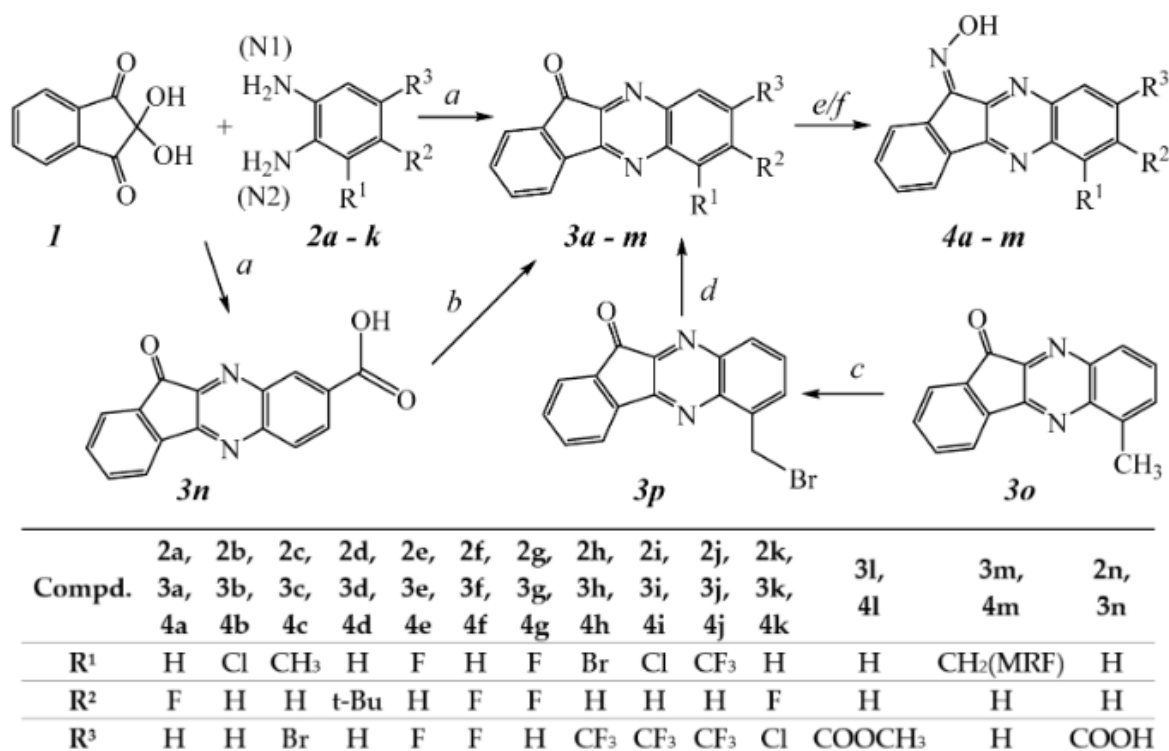
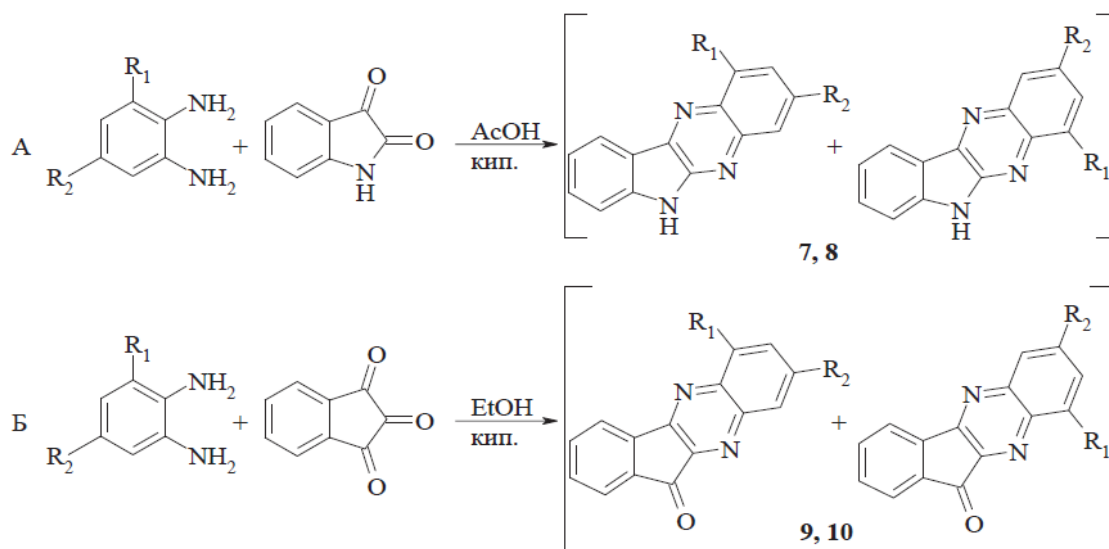


Рис. 1.10. Схема синтезу похідних IQ-ону та їх оксимів, описаних в роботі [24]

Проте у разі несиметрично заміщених фенілендіамінів можливе утворення двох ізомерів і часто розділити їх суміш неможливо, що вважається недоліком канонічного методу синтезу.

Бліненко зі співр. в роботі [25] провели синтез нітро- та дихлоро- похідних індола[2,3-*b*]хіноксаліну та IQ-ону (рис. 1.11), які з огляду на будову (тетрациклічні нітрогеновмісні ароматичні плоскі цикли) можна вважати структурними аналогами. Автори стверджують, що у випадку індохіноксалінових похідних (7,8 на рис. 1.11) методом препаративної тонкошарової хроматографії їм вдалося розділити ізомерну суміш, тоді як сполуки 9,10 на основі IQ-ону, не дивлячись на близьку структурну схожість із 7,8 розділити не виявилось можливим.



$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{NO}_2; R_1 = R_2 = \text{Cl}$

Рис.1.11. Схема синтезу похідних індолохіноксаліну (А) та інденохіноксалінону (Б)

Цікаво, що інші автори методом ^1H ЯМР спектроскопії [23] та рентгеноструктурним аналізом [24] доводять існування лише одного 6-заміщеного ізомеру у випадку, якщо за вихідну сполуку використано 3-заміщений *o*-фенілендіамін.

Поясненням цього факту є наявність стеричних перешкод для аміногрупи, що знаходиться в *орто*-положенні по відношенні до 3-замісника і відповідає за утворення 9-заміщеного ізомеру. Внаслідок цього більшу реакційну здатність матиме інша NH_2 -група, що сприяє утворенню саме 6-заміщеної похідної. Автори [23] підкреслюють, що саме стеричний фактор сприяє регіоселективності, оскільки введення в 3-положення двох різних за електронними ефектами замісників ($-\text{CH}_3$ та $-\text{NO}_2$) дає однаковий результат. В більш пізній роботі іншими авторами [24] це було показано за допомогою DFT розрахунків зарядів на обох атомах Нітрогену для 3-хлоро-1,2-діаміну, які мали практично однакове значення, рентгеноструктурним аналізом підтверджено структуру 6-хлорпохідної. Тож повертаючись до результатів [25] видається, що наявність двох ізомерів, ймовірно пов'язана з використанням несиметричних вихідних діамінів – 4-нітро-1,2-діаміну та 3,5-дихлоро-1,2-діаміну.

Незвичний спосіб утворення інденохіноксалінового каркасу описали автори [26]. Вихідною сполукою слугував 7-оксид бензо[а]феназин-5,6-діон. Його обробка лужним розчином метанолу приводила до звуження циклу і утворення IQ-ону. Реакція супроводжується виділенням CO_2 , скороченням в *орто*-хіноїдного кільця та деоксигенації N-оксидного фрагмента (рис. 1.12).

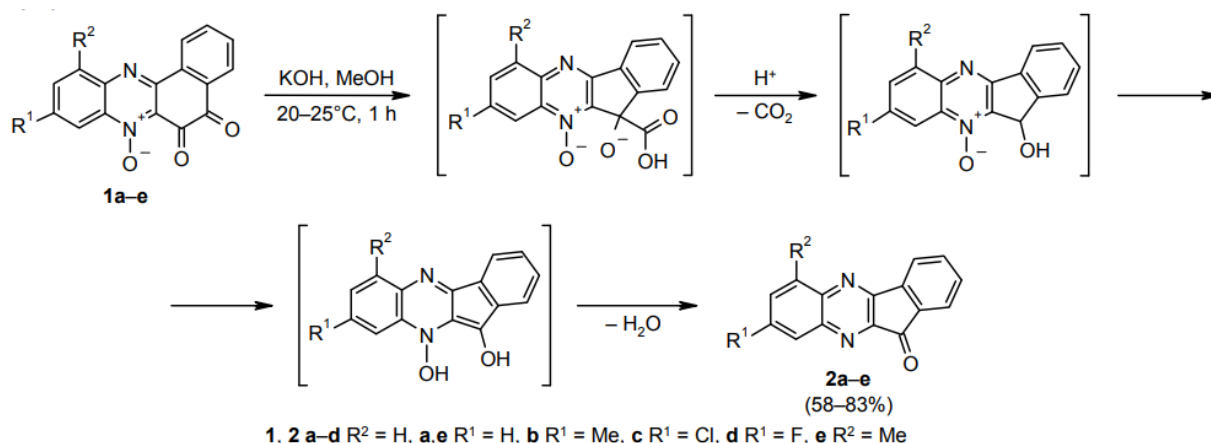


Рис. 1.12. Схема утворення інденохіноксалінового каркасу на основі 7-оксид бензо[а]феназин-5,6-діону

Варто зазначити, що 7-оксид бензо[а]феназин-5,6-діон може бути доволі легко отриманий на основі аніліну (рис. 1.13) і сам описаний в літературі, як сполука, що володіє неабиякою біологічною активністю [27].

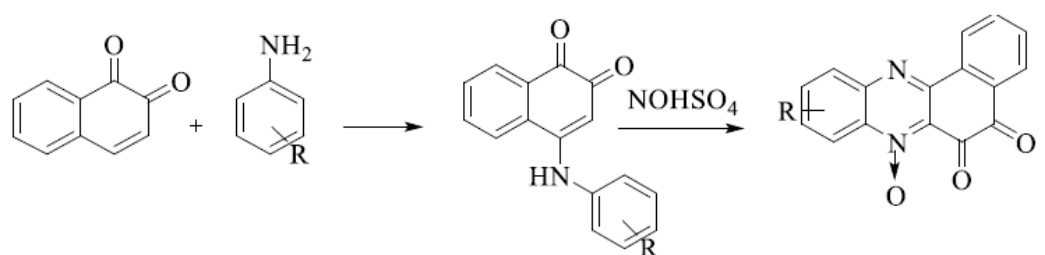


Рис. 1.13. Схема синтезу 7-оксид бензо[а]феназин-5,6-діону

Змінюючи природу вихідних компонентів в реакціях циклоконденсації можна отримувати тетрациклічні аналоги, що містять у складі інші гетероцикли замість інденового фрагменту. Найчастіше, це індолові похідні, які, як вже зазначалося, є структурними аналогами IQ зі схожими біологічними властивостями [28-31]. В таких синтезах як дикарбонільну компоненту беруть ізатин (див. рис. 1.11, А). Повідомляється про отримання аналогів IQ, в яких міститься тіофеновий, пірановий або пірольний цикли (рис. 1.14) [32]. Синтез

проводився в гарячій поліфосфорній кислоті, виходи складали 27-50%, що навряд чи робить його придатним для промислового масштабування. Проте ця робота цікава тим, що автори пропонують метод ЯМР-спектроскопії для розпізнання ізомерів, шляхом аналізу продуктів, окислених за атомом Нітрогену. У разі використання 2,3-діамінобензойної кислоти утворюється лише один ізомер – бензофуру[2,3-*b*]хіноксалін-7-карбонова кислота ($X=O$), що відповідає висновкам робіт [23, 24] про регіоселективність продуктів у випадку використання 3-заміщених діамінів.

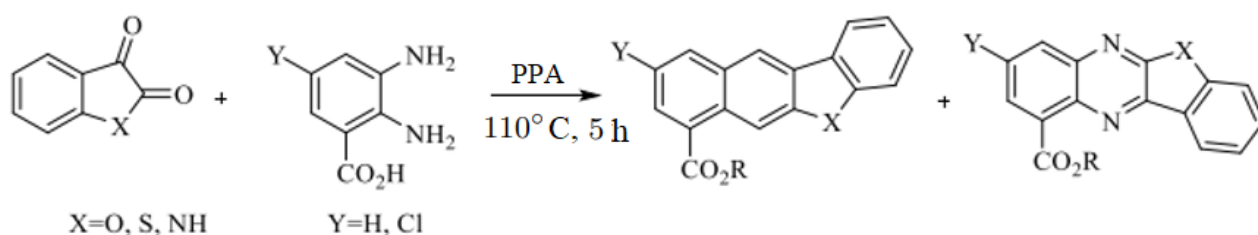


Рис. 1.14. Схема синтезу аналогів інденохіноксаліну, описаних в роботі [32]

Конденсацією 3H-бензо[*e*]індол-1,2-діону (I) з 1,2-діамінобензолом при кип'ятінні в оцтовій кислоті з виходом 80% було отримано 7H-бензо[4,5]індола[2,3-*b*]хіноксалін (II) [33] (рис.1.15).

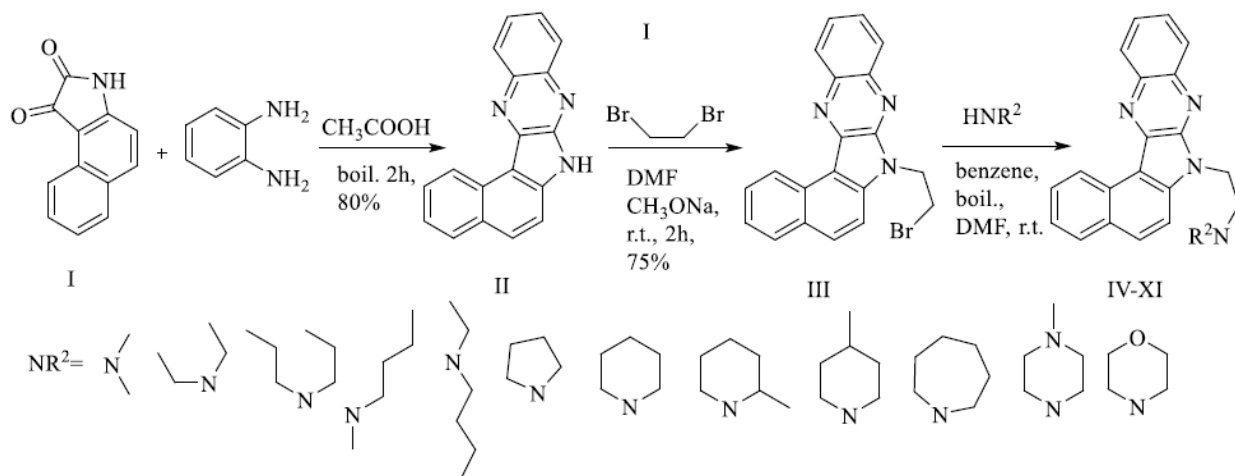


Рис. 1.15. Схема синтезу похідних 7H-бензо[4,5]індола[2,3-*b*]хіноксаліну

В подальшому його алкілували надлишком диброметану в ДМФА при кімнатній температурі в присутності еквімолярної кількості метилату натрію метанолі. На наступній стадії утворений продукт піддавали амінодебромуванню,

при цьому варіюючи будову амінів, отримали дванадцять похідних 7-(2-аміноетил)-7Н-бензо[4,5]індоло[2,3-*b*]хіноксаліну з виходами 80-90%.

Заміною бензенового циклу в діамінах на гетероцикл можна ввести останній до складу тетрациклічних аналогів IQ. Таким шляхом авторами [34] було отримано інденопіридопіразинони шляхом змішування теплих еквімолярних розчинів заміщених 2,3-діамінопіридинів і нінгідрину в 50% оцтовій кислоті (рис. 1.16).

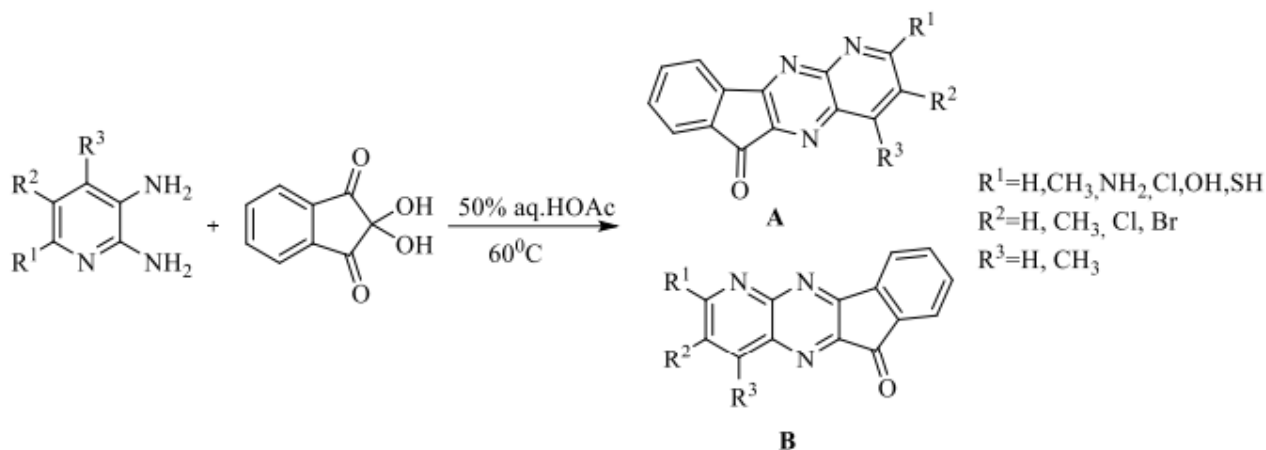


Рис. 1.16. Схема синтезу інденопіридопіразинонів

Як видно з наведених даних, незважаючи на спроби розробити нові методики синтезу, дослідники віддають перевагу класичному способу побудови інденохіноксалінового каркасу: циклоконденсації ди- або трикарбонільних сполук із *o*-діамінами. Він є найбільш зручним і економічним з точки зору комерційної доступності вихідних реагентів, простоти умов синтезу та виходу кінцевих продуктів. Коло сполук на основі IQ-циклу розширюється завдяки варіюванню природи карбонільної компоненти або замісників в бензеновому циклі діамінів.

1.2. Функціоналізація інденохіноксалінового хромофору, введення лінкерних груп

Наявність карбонільної групи в молекулі IQ-ону відкриває перспективи для подальшого синтезу функціональних похідних (гідразинів, оксимів, гідразидів та ін.), які іноді мають кращу біологічну активність за сам IQ-он.

Подекуди синтез родоначальної сполуки є проміжним етапом для отримання саме його похідних по карбонільній групі.

Значна частка наукових досліджень в цьому напрямку присвячена оксидам. Наприклад, в роботі [23] саме оксидами були кінцевою ціллю синтезу (див. рис.1.10). Оксимацію здійснювали змішуючи розчини відповідних IQ-онів в піридині з гідрохлорид гідроксиламіном у вигляді його розчину піридин-етанол (1:1). нагрівали при 100 °C протягом 6 год. Потім додавали 10% розчин оцтової кислоти і суміш залишали на ніч. Осад центрифугували, тричі промивали розчином оцтової кислоти до нейтральної реакції та висушували у вакуумі над NaOH. Виходи оксимів за цією методикою були невеликими і складали для більшості оксимів 35 %.

Введення бічних довгих данцюгів, які здатні протонуватися, відіграє важливу роль при інтеркаляції до ДНК, тому деякі дослідники сконцентрували свою увагу на синтезі оксимів, що мають довгі бічні ланцюги з різноманітними амінозамісниками. У 2013 р. група китайських дослідників [35] запатентувала методику багатостадійного синтезу ряду О-заміщених оксимів, що мають у своєму складі заміщені третинні аміногрупи. Метод включає стадію взаємодії оксиму з дибромалканом з подальшою взаємодією отриманого продукту із рядом амінів (рис.1.17).

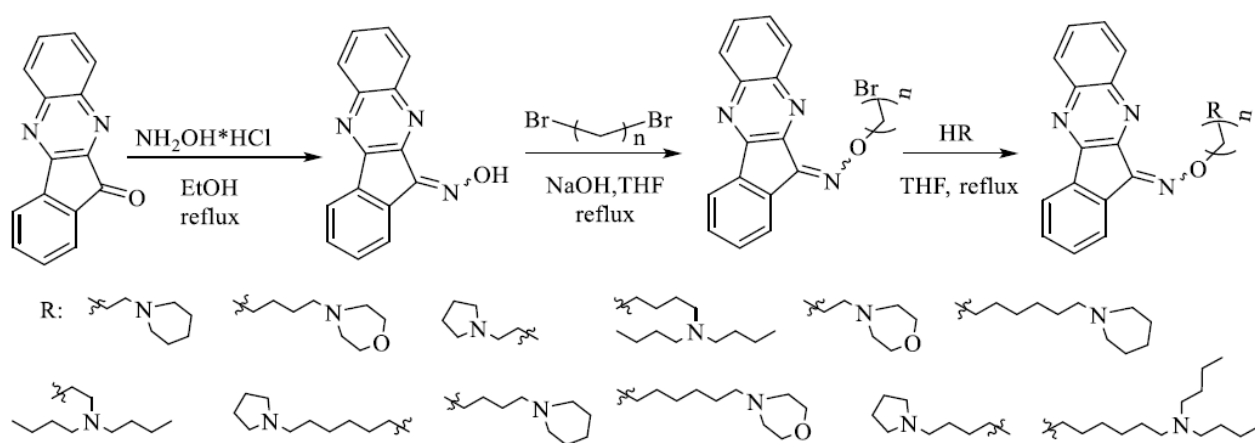


Рис. 1.17. Схема синтезу О-заміщених оксимів, описаних в роботі [35].

Заміщена аміногрупа (R-) є піперазиновою основою, піперидинілом, морфолінілом, піролілом, N-метилпіперазиніл, N,N-диметиламіно- та ін. Виходи отриманих цільових продуктів знаходяться в діапазоні від 80 до 82%. Проте

метод є доволі трудомістким і потребує застосування токсичного розчинника ТГФ, робота з яким вимагає особливої обережності.

Пізніше інші автори [36] синтезували оксим 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону та його похідні із $-\text{CH}_3$ та $-\text{COOH}$ замісниками в 6-положенні та ряд їх похідних, алкілованих амінами у вигляді гідрохлоридів (рис. 1.18).

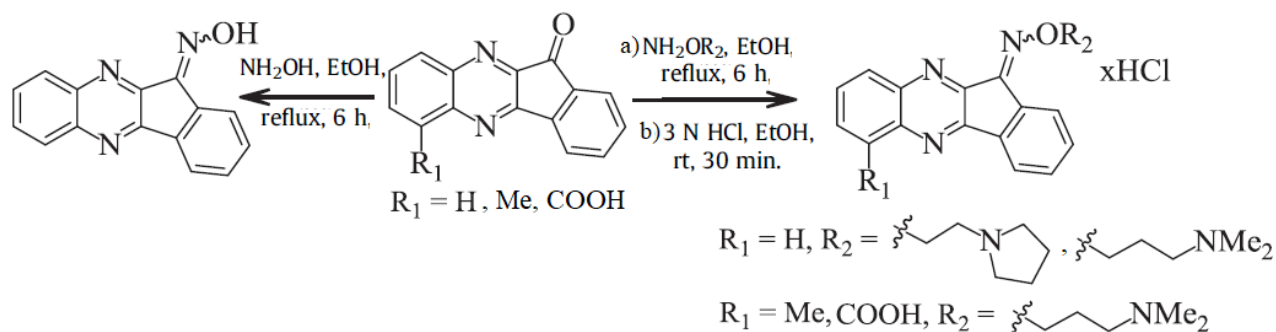


Рис. 1.18. Схема синтезу О-алкілованих оксимів

На відміну від попереднього способу, цей синтез не передбачав попередньої активації $-\text{OH}-$ групи введенням галогену, що значно спрощувало методику, а як розчинник було використано етанол. Вихід оксимів після очищення складав 93-96 %, а цільових продуктів – 82-87 %. Проте їх суттєвим недоліком є погана розчинність у воді та органічних розчинниках, а також висока токсичність.

Введення в 6-положення IQ-ону карбоксильної групи дозволило здійснити функціоналізацію самого хромофору за рахунок амідування тими ж самими гідроксилами перед стадією О-алкілування оксиму, тим самим подвоївши кількість бічних ланцюгів (рис.1.19).

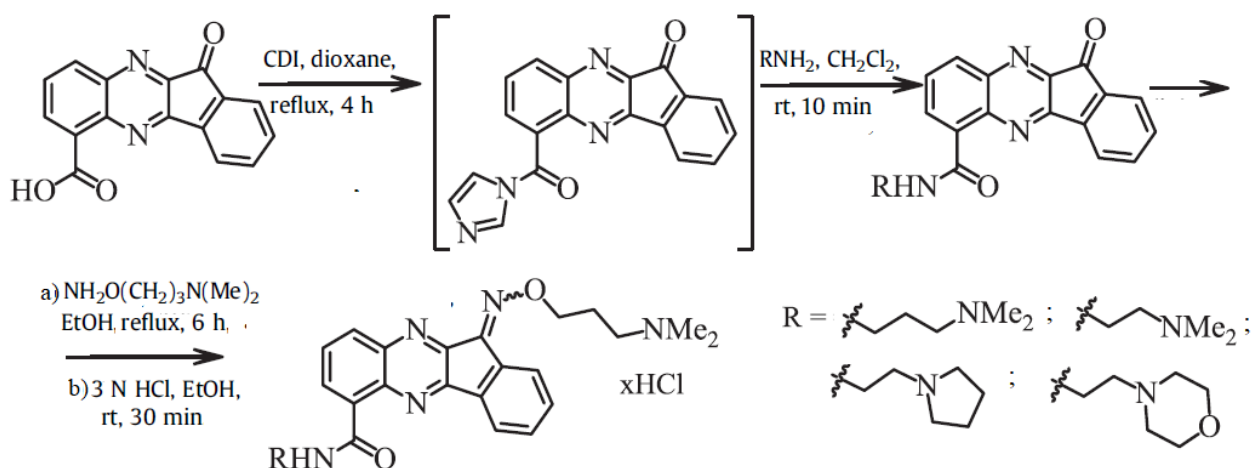


Рис. 1.19. Схема амідування 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-6-карбонової кислоти

Зауважимо, що реакцію амідування здійснювали за допомогою 1,10-карбонілдіімідазолу (CDI) за двостадійним процесом з відокремленням проміжного імідазол-заміщеного продукту за доволі трудомісткою методикою, яка полягала в наступному: суміш кислоти з CDI в 1,4-діоксані кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4 год з контролем ТШХ. Потім її охолоджували, концентрували і розтирали з водою. Проміжну сполуку, яка випадала в осад, збирали та сушили. Розчиняли її в CH_2Cl_2 , додавали заміщені аміни і реакційну суміш перемішували протягом 10 хвилин. Далі суміш тричі екстрагували водою, потім органічний шар випарювали у вакуумі та очищали колонковою хроматографією ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10/1), кристалізували з EtOH [36].

Можна припустити, що доволі трудомістка процедура отримання амідних похідних IQ-ону (не враховуючи ще й стадію синтезу самої кислоти) є причиною невеликої кількості публікацій, присвячених синтезу та дослідженню цих сполук, хоча відомо, що саме включення карбоксамідного зв'язку в різні положення хінолінового та хінолонового каркасів довело ефективну стратегію для посилення фармакологічних властивостей, зокрема протипухлинної активності [37, 38]. Тому створення більш простого і ефективного способу утворення амідного зв'язку у випадку хіноксалинових кислот є наразі актуальною задачею.

У роботі [39] було описано синтез ряду гідразонів ціано-заміщеного інденохіноксалинону (рис. 1.20). Метод синтезу зручний і відрізняється простотою виділення і високими виходами продуктів.

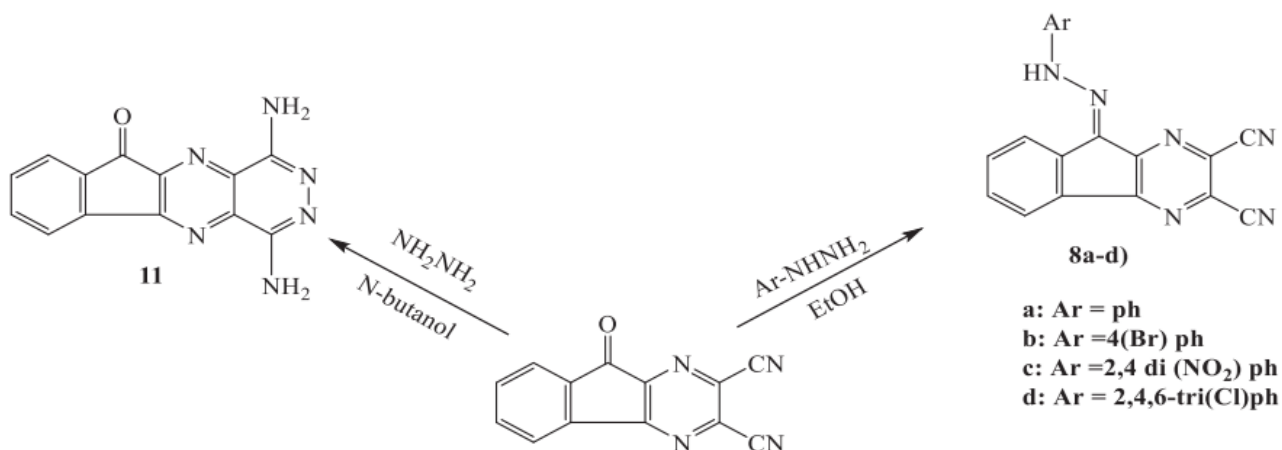


Рис. 1.20. Схема синтезу гідразонів інденохіноксалину

Здійснено синтез нової похідної 11H-індено[1,2-*b*]хіноксалін-2-она реакцією з подальшим тестуванням на антимікробну активність (рис. 1.21) [40]. Встановлено, що отриманий у ході кип'ятіння еквімолярних кількостей інденохіноксаліну з тіокарбогідразидом в етанолі 11H-індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-іліден тіокарбазон з виходом 80 % має виражену антимікробну активність.

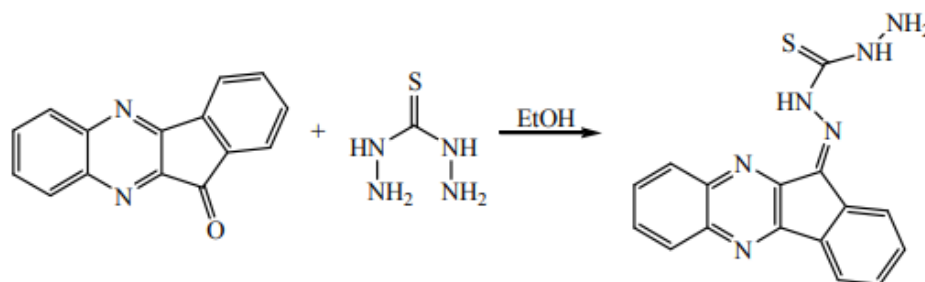


Рис. 1.21. Схема синтезу інденохіноксаліну з тіокарбогідразидом

Нещодавно авторами [41] було розроблено метод синтезу похідних азинів IQ-ону, який полягав у взаємодії амідразонів з інденохіноксаліноном при кімнатній температурі та з малонітрилом IQ-ону при кип'ятінні в дихлорметані (рис. 1.22).

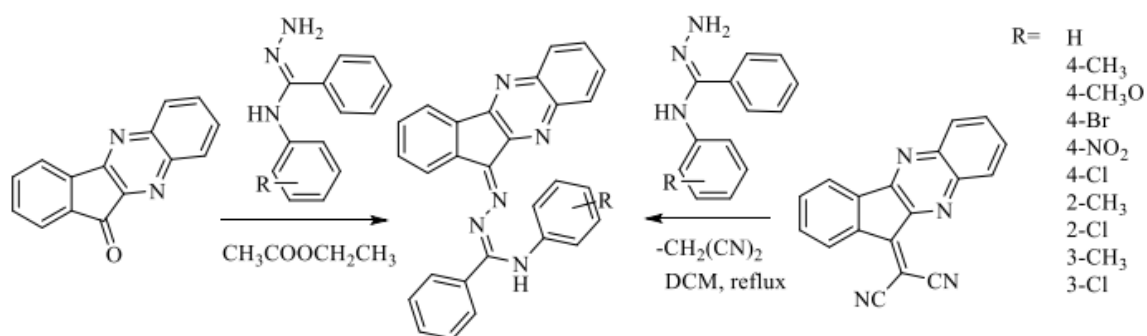


Рис. 1.22. Метод синтезу похідних азинів індохіноксалінону

Повідомляється про синтез двох азинів на основі інденохіноксаліну та дослідження їх рецепторів з різними катіонами та аніонами, які показали що вони можуть взаємодіяти з іонами металів з утворенням комплексів із сильною зміною забарвлення навіть за низької концентрації (рис. 1.23) [42]. Електронодефіцитна природа 16π-індено[1,2-*b*]хіноксалінового тетра-циклу обумовлює утворення пушпульної системи електронів у поєднанні з електронодонорною групою (N,N-діетиламіносаліциловий альдегід і ди-(*tert*бутил)саліциловий альдегід у даному випадку), тому такі сполуки можуть використовуватися як сенсорні

системи. Зокрема, в даній роботі показано, що утворені продукти показали високоселективну зміну кольору від помаранчевого/жовтого до фіолетового/синього відповідно для іонів міді.

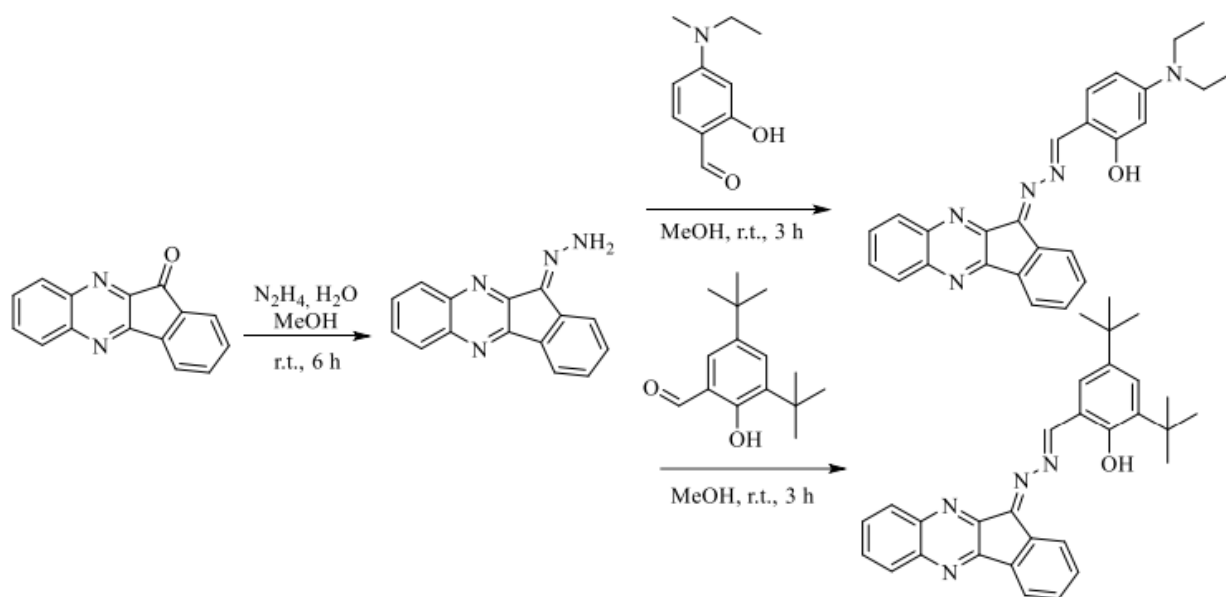


Рис. 1.23. Метод синтезу азинів на основі інденохіноксаліну

Для досягнення кращого фізіологічного ефекту інденохіноксаліни поєднують з іншими фармакоформними групами, наприклад, органофосфонатами, які здатні проявляти протизапальну і протипухлинну активність. Нещодавно вченими з Єгипту були отримані олефінові адукти [43], які були синтезовані реакцією Віттіга по карбонільній групі, досліджена стереоселективність реакції (рис. 1.24). Реакція IQ-ону з декількома стабілізованими фосфонілідами давала у кожному випадку комбінацію відповідних E- та Z-олефінів. З іншого боку, реакція IQ-ону з діалкілфосфітами давала споріднені фосфонати.

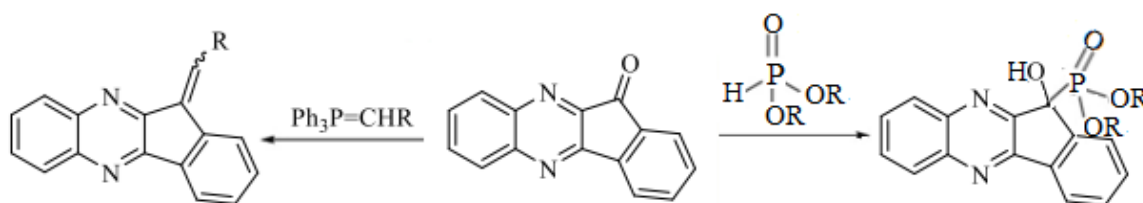


Рис. 1.24. Отримання олефінових фосфорильованих адуктів інденохіноксаліну

Характерними рисами цього способу є м'які умови реакції, короткий час реакції, високий вихід продукту, операційна простота, використання нетоксичного реагенту. Крім того, синтезовані фосфонати показали більш високу

цитотоксичність щодо клітинної лінії більшості ракових пухлин молочної залози (MCF7), ніж контрольний препарат доксорубіцин.

Групою дослідників з Іраку був описаний синтез похідних проліл-IQ. Вони були отримані шляхом сполучення 4-гідроксипроліну з IQ-оном, при каталізі сульфатною кислотою, нанесеною на кремнезем під 2-хв мікрохвильовим опроміненням (рис. 1.25) [44]. Згодом, спосіб був удосконалений шляхом використання більш екологічних, багаторазових, недорогих та ефективних каталізаторів – гетерополікіслот вольфраму Keggin ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) і Well–Dawson ($\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$) [45]. Вихідні речовини змішували з гетерополікіслотою (1–2 мол. %) в суміші етанол:вода (2:1), і розчин витримували при 80°C протягом певного часу. Обидва варіанти мають перевагу у часі реакції над запропонованим у 2007 р. варіантом каталізу цієї ж реакції трифторметансульфонатом диспрозію(III) в ацетонітрилі при 80° [46].

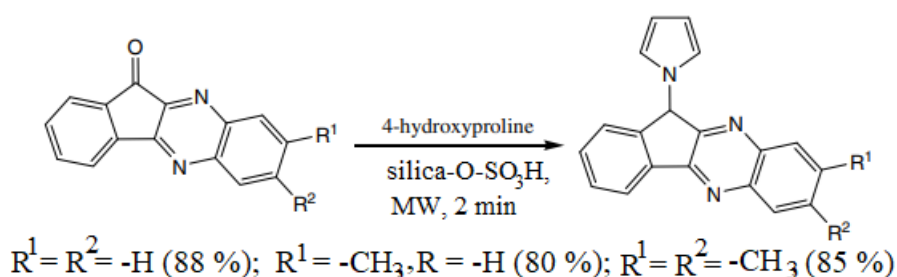


Рис. 1.25. Схема синтезу пірроліл-індено[1,2-*b*]хіноксалінів

Похідні IQ-ону, такі як халкони, карбазиди, азиди, тіосемікарбазиди та ін. можуть піддаватися подальшим реакціям гетероциклізації з утворенням спіроциклів сполучених з IQ-каркасом. При цьому можна отримувати цикли різної природи та розмірів, наприклад, циклопропановий [47], азетидиновий [48]. Спіроциклічні сполуки отримують також багатокомпонентними реакціями циклоприєднання за участю ненасичених сполук [49, 50], іноді це серія каскадних реакцій, в яких спочатку утворюється IQ-он, який відразу вступає в циклоприєднання [51, 52]. Описано спіропохідні IQ-ону з циклами: γ -лактону [49, 50], фурану [51], піролідину/піролізидину [52-54] та ін. Більш повний і детальний аналіз цих робіт за останній час наведено в оглядовій статті [55].

1.3. Біологічні властивості похідних інденохіноксаліну як потенційних лікарських засобів

Особливості будови сполук інденохіноксалінового ряду надають їм ряд специфічних властивостей, які дозволяють використовувати їх в певних галузях. В літературі мають місце повідомлення про те, що IQ-он може слугувати інгібітором кислотної корозії поверхонь з м'якої сталі [56], а спіро-похідні, що включають піролідиновий цикл, можуть використовуватися як фотонні датчики для виявлення флуоресцентних барвників у відходах текстилю, паперу та інших промислових продуктах [57]; пушпульні системи на основі азинів IQ-ону можуть селективного розпізнавати іони [42] тощо. Проте переважна більшість авторів, які здійснюють функціоналізацію інденохіноксалінових сполук мають на меті надати або поліпшити їх біологічні властивості для потенційного застосування при лікуванні різного роду патологій, в першу чергу як протипухлинних та противірусних засобів. Це пов'язано з можливістю цього класу взаємодіяти із ДНК патогенів, що порушує реплікацію та приводить до інгібування їх росту. Значна кількість публікацій присвячена дослідженням можливості похідних IQ-ону діяти за механізмом інтеркаляції до ДНК [22, 24, 28, 36], тому доцільним буде спочатку розглянути загальне визначення цього явища та принцип дії інтеркаляторів.

1.3.1. Загальні теоретичні відомості про інтеркаляцію та структурні особливості сполук-інтеркаляторів

Взаємодія малих органічних молекул (в даному контексті їх називають «лігандами») з ДНК відбувається різними способами. Існують три основні види такої взаємодії, що розрізняються за механізмами та міцністю зв'язування (афінністю) (рис.1.27).

1. *Інтеркаляція* – процес вбудовування плоского хромофора між двома сусідніми парами основ ДНК. Вона стабілізується гідрофобними, дисперсійними

та електростатичними взаємодіями, є низькоспецифічною, високоафінною; величини констант зв'язування (K_x) знаходяться в діапазоні $10^4 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ [58].

2. *Ковалентне зв'язування у малому жолобі ДНК.* Воно стабілізується електростатичними і ван-дер-ваальсовими взаємодіями та водневими зв'язками, є високо-специфічним і може бути високоафінним; $K_d = 10^5 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ [59].

3. *Електростатична взаємодія* обумовлена зв'язуванням за рахунок електростатичних сил між катіоном ліганда і негативно зарядженими фосфатами пар основ. Вона є високочутливою до іонних факторів, неспецифічною і низькоафінною [60].

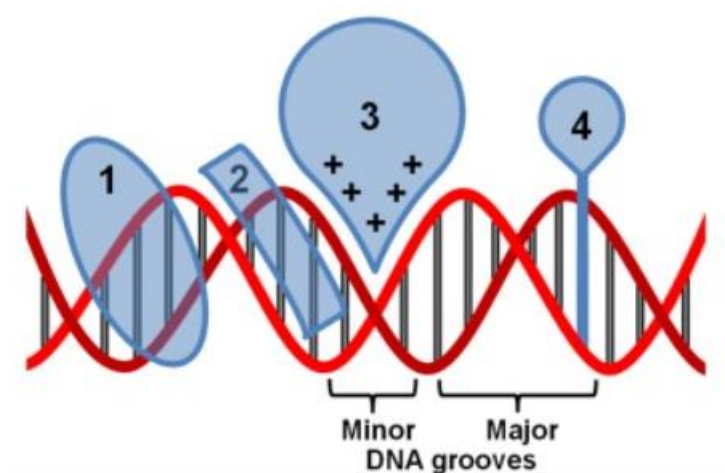


Рис. 1.27. Схематична діаграма різних способів зв'язування малих молекул з ДНК: 1 – ліганд великого жолобу, 2 – ліганд малого жолобу, 3 – електростатичне зв'язування, 4 – інтеркаляція [60]

Загальновідомо, що інтеркаляторами є конденсовані ароматичні або гетероароматичні системи, які містять три- і більше конденсованих ядер (хромофори). Часто такі ліганди з ДНК утворюють забарвлення (наприклад, етидію бромід, берберін) що використовується в практичних цілях для аналізу ДНК [61, 62]. Планарний ароматичний фрагмент нековалентно вбудовується між сусідніми парами основ (особливо G і C, 70%), порушуючи тим самим природну структуру та динаміку ДНК, і, як наслідок, її біологічні функцій. Зазвичай інтеркаляція може викликати: стабілізацію спіралі дволанцюгової ДНК; локальне розкручування, яке може перевищувати 50% природного скручування;

подовження спіралі, що майже подвоює природне розділення пар основ для розміщення інтеркалятору та деякі інші структурні зміни ДНК.

Тривалий час вважалося, що інтеркаляція підпорядковується принципу, згідно з яким ліганди не можуть розташовуватися в сусідніх проміжках між парами основ («принцип виключення найближчих місць зв'язування») [63]. Проте згодом було показано, що це правило не носить абсолютного характеру і може бути порушене. В роботі [64] встановлено антикооперативне зв'язування етидію броміду, яке допускає несприятливу, але, тим не менш, можливу інтеркаляцію в найближчі сусідні місця зв'язування. Цікаво, що деякі сполуки можуть змінювати місця зв'язування вздовж ланцюга ДНК у процесі внутрішньомолекулярного обміну, тобто спроможні мігрувати («повзати») по ланцюгу ДНК [65].

Як правило, інтеркалятори викликають інгібування ферменту шляхом конкурентного блокування сайтів ДНК, щоб фермент не міг з нею взаємодіяти, тим самим впливаючи на реплікацію та транскрипцію ДНК, що має потенційне застосування в терапії раку [66]. Так, антрациклінові антибіотики є інгібіторами топоізомерази II, тоді як еліптицин та його аналоги інгібують не лише топоізомеразу II, але також ДНК-полімеразу та РНК-метилазу. Профлавін і актиноміцин D є інгібіторами ДНК-полімерази, а етидію бромід, профлавін і актиноміцин D інгібують РНК-полімерази [58].

Велике значення для параметрів зв'язування інтеркалятору з ДНК мають спосіб і топологія приєднання бокового ланцюга поліциклічного хромофора (в англomовній літературі використовують термін «linker chains») [67]. Це обумовлено тим, що інтеркалятор, розташований в місці зв'язування з певною орієнтацією щодо пар основ, направляє в малий або великий жолоб ті або інші екзоциклічні фрагменти, і, в результаті цього, міцність утвореного комплексу значною мірою залежить від взаємного розташування бокового ланцюга і неіндиферентних фрагментів нуклеотиду. Найбільша щільність негативного заряду ДНК спостерігається в малому жолобі, тому в більшості випадків ліганд прагне розташуватися при зв'язуванні саме в ній [68]. Необхідною умовою

стабілізації комплексу інтеркалятор-ДНК є достатньо тісна взаємодія лінкерного фрагменту із дном малого жолобу, що обумовлено наявністю додаткових взаємодій гідрофобної, ван-дер-ваальсової, електростатичної природи, або водневих зв'язків [69]. Один з варіантів – взаємодія між негативно зарядженим фосфатом та позитивними зарядженими групами бічного ланцюга. Найбільш часто в молекулах інтеркаляторів як носій позитивного заряду використовують аміногрупи, наприклад, у аміксині (1.1), акрихіні (1.2), нітракрині (1.3), мітоксантроні (1.4) (рис. 1.28).

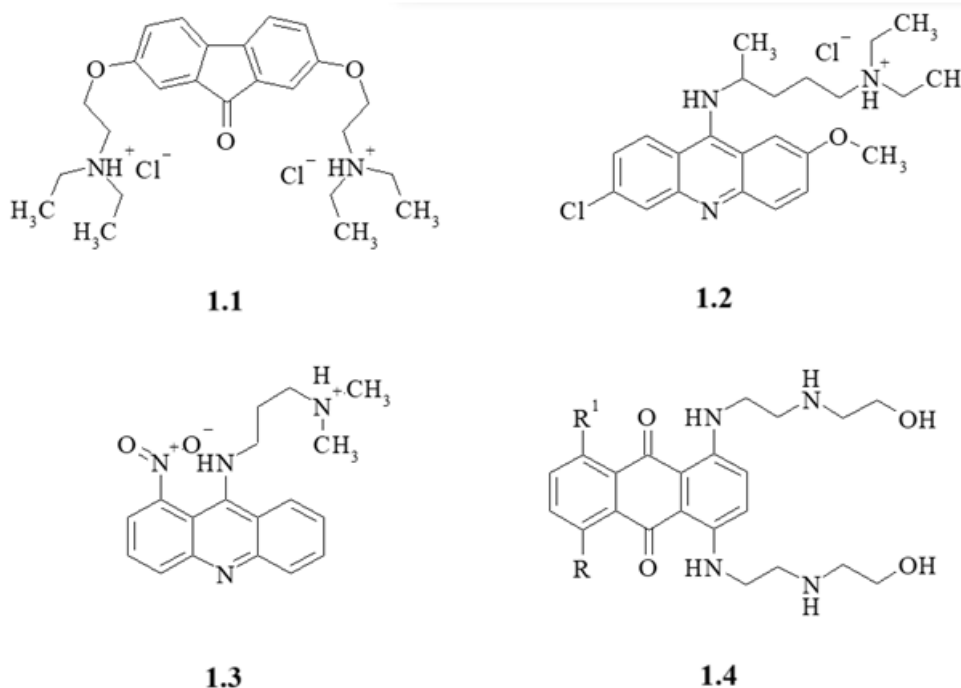


Рис.1.28. Інтеркалятори з позитивно зарядженими бічними ланцюгами

До найбільш відомих і добре вивчених інтеркаляторів ДНК належать сполуки, представлені на рис. 1.29. Як видно, це переважно сполуки акридинового та антациклінового ряду. Проте проблема стрімкого розвитку онкологічних захворювань спонукає дослідників знаходити все нових і нових кандидатів на роль інтеркаляторів, залучаючи сполуки на основі похідних фталазинів [70, 71], карбазолів [72], нафталімідів [73, 74], хіноксалінів [3, 6] та ін. Більшість дослідників сходяться на тому, що потенційні протиракові препарати характеризуються двома загальними ознаками, які й визначають їх протипухлинну активність: плоске поліциклічне ядро, здатне зв'язуватися з ДНК

шляхом інтеркаляції, і один або два катіонних бічних ланцюга, які мають функціональні групи, що додатково стабілізують комплекс потенційної лікарської речовини з ДНК.

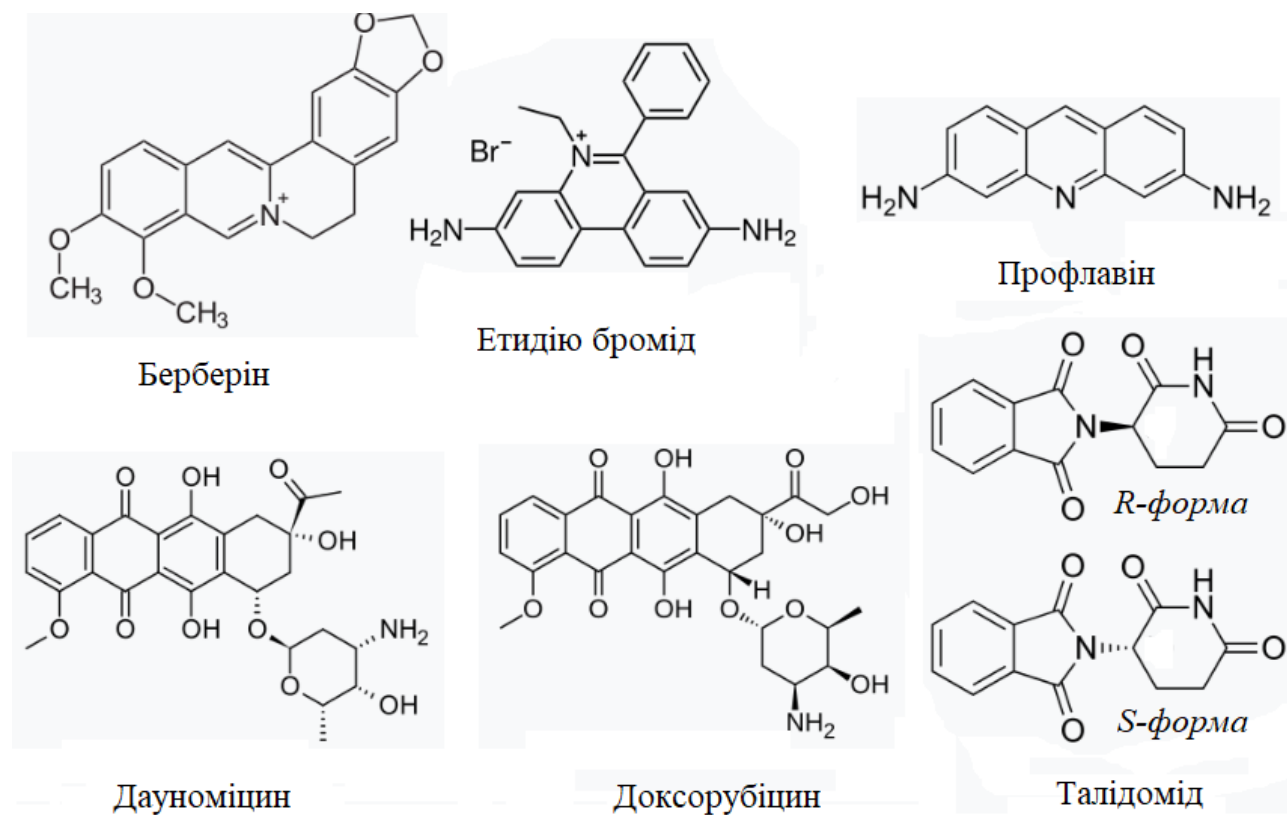


Рис.1.29. Найбільш вивчені сполуки – інтеркалятори ДНК

Не можна не згадати про те, що оскільки інтеркалятори, як зазначалося, приводять до інгібування транскрипції, реплікації та процесів відновлення ДНК це робить їх потужними мутагенами [75], вони часто мають великий канцерогенний потенціал [66]. Тому при дослідження біологічної активності обов'язково має бути оцінена їх різного роду токсичність та визначена максимально допустима концентрація препарату, яку слід вводити аби мінімізувати побічні дії. З іншого боку, висока цитотоксичність сама по собі є непрямым аргументом доказу взаємодії ліганду з ДНК.

Варто зазначити, що на сучасному етапі наукових публікацій, в яких висвітлюються принципово нові фармакофорні групи інтеркаляторів набагато менше, ніж тих, що присвячені їх модифікації, шляхом змінювання лінкерних

бічних ланцюгів. Дослідники намагаються урізноманітнити коло замісників: їх кількість та природу, щоб розширити спектр біологічної активності.

1.3.2. Відомості щодо біологічних властивостей інденохіноксалинових сполук

Інденохіноксалинові сполуки [22, 35-38] як і близькі до них індохінаксалинові аналоги [28, 29, 31], в силу своєї будови мають високий афінитет до ДНК, що вказує на їх здатність взаємодіяти з різними біологічними об'єктами, у тому числі й шляхом інтеркаляції в ДНК. Тому варто очікувати від них широкого спектру біологічних активностей і, в першу чергу, в царині протипухлинної та антипроліферативної дії.

Нещодавно Eldeken зі співр. показали, що деякі фосфонати похідні інденохіноксалину (див. рис. 1.24) виявляють високу протиракову активність щодо клітинної лінії гепатоцелюлярної карциноми людини (HePG2) та аденокарциноми молочної залози людини (MCF7), значення дуже близькі до еталонної сполуки доксорубіцину [43]. Запатентована китайськими вченими серія похідних оксимів IQ-ону (див. рис.1.17), які можуть бути використані для приготування протипухлинних препаратів особливо для приготування ліків проти гострого промієлоцитарного лейкозу, аденокарциноми легенів і раку молочної залози [35]. Протипухлинну активність щодо клітин проти MCF-7 і A549 виявили гідразони, описані в роботі [39]. Сполука 11 (див. рис. 1.20) виявила найкращу цитотоксичність по відношенню до цих клітин.

Групою дослідників з Тайваню під керівництвом Tseng C.H. [76] здійснено антипроліферативну оцінку певних похідних індено[1,2-с]хіноліну проти росту шести ліній ракових клітин, включаючи епітеліоїдну карциному шийки матки (HeLa), плоскоклітинну карциному ротової порожнини (SAS), гепатоцелюлярну карциному (SKHep), аденокарциному шлунка людини (AGS), рак простати (PC-3) і недрібноклітинний рак легенів (A549). Результати показали, що в залежності від введеного нітрогеновмісного замісника ряд антипроліферативної активності виглядає наступним чином: 17b > 17a > 17c > 17d (рис.1.30). В ряду О-алкільних піперазинзаміщених сполук антипроліферативна активність знижувалася в

порядку: аміноалкоксиіміно 22a–d > гідроксиіміно- 20 > алкоксиіміно 21, 22e > карбоніл 17b. Серед них 22b був найпотужнішим із значеннями GI 50 0,52, 0,74, 6,76 і 0,64 мкМ проти росту клітин HeLa, SKНер, AGS і A549 відповідно. Флуоцитометричний аналіз показав, що 22c може індукувати зупинку клітинного циклу в S-фазі та поліплоїдію ДНК (>4 n) з наступним апоптозом.

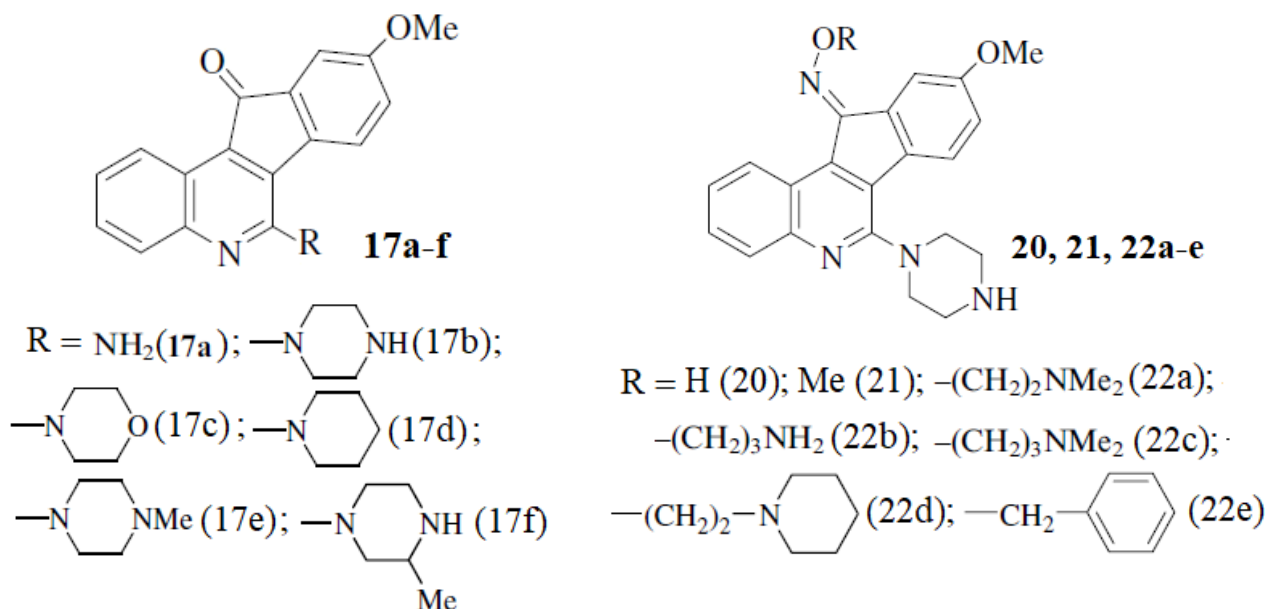


Рис. 1.30. Похідні інденохіноліну, які досліджували на антипроліферативну активність в роботі [76].

Ця ж група науковців досліджувала й антипроліферативну дію похідних 6-ариліндено[1,2-с]хіноліну [77, 78] проти росту п'яти ліній ракових клітин, включаючи гепатоцелюлярну карциному людини (Нер G2, Нер 3В і Нер2.2.1), невеликий клітинний рак легенів (A549 і H1299). Найкращі результати тут виявила сполука, що містила флуор — 9-(3-(диметиламіно)пропокси)-6-(4-(3-(диметиламіно)пропокси)феніл)-2-флуор-11Н-індено[1,2-с]хінолін-11-он. Згодом, охопивши широке коло похідних IQ-ону, які вони синтезували на той час, Tseng С.Н. зі співр. поєднали оцінку їх антипроліфераційної дії, афінності зв'язування з ДНК та інгібіторної активності топоізомераз (топо I та топо II) і зробили ряд узагальнюючих висновків, щодо зв'язку структура-властивості [79]:

- замісник бічного ланцюга аміноалкоксиіміно в С11 є важливим для антипроліферативної активності, у якій кінцевий амін переважно є третинним або циклічним п'ятичленним піролідиновим кільцем;

- замісник у С6 є вирішальним для селективної цитотоксичності, у якій група ОН є найбільш переважною, тоді як водень або піперазин виявляють цитотоксичність для ракових клітин;
- для похідних індено[1,2-с]хіноліну спостерігається позитивна кореляція антипроліферативної активності, спорідненості зв'язування з ДНК та інгібуючої активності топо I та топо II, тому вони мають потенціал для розробки як подвійні інгібітори топо I та топо II.

В роботах Deady зі співр. [37, 38, 80, 81] було показано, що наявність лінкерних ланцюгів амідної природи в хіноліновому та хінолоновому каркасах приводять до протипухлинної активності сполук, в основі якого лежать механізми інгібування топоізомерази. Найбільш потужну дію чинили сполуки, що містили 4-метил-замісник, як для моно-, так і для біс-амідів(рис. 1.31):

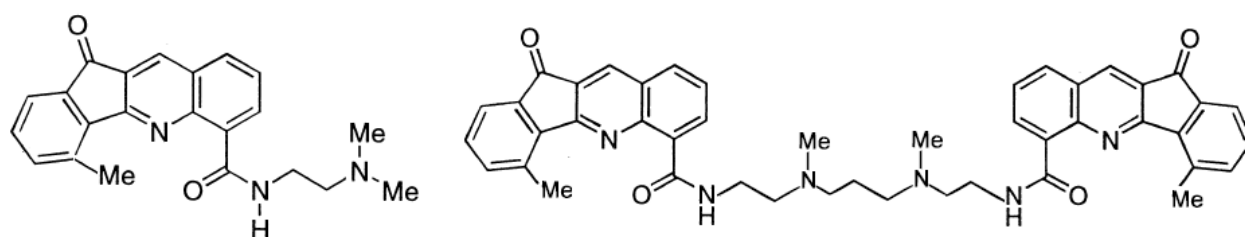


Рис. 1.31. Найефективніші протиракові агенти згідно результатів [37, 38]

В роботі [81] встановлено взаємозв'язок між положенням амідного ланцюга і цитотоксичністю. Показано, що 4- та 6-карбоксаміди (з бічним ланцюгом на кінцевому кільці, поза короткою віссю хромофора) були ефективними цитотоксинами. Димерні 4- та 6-зв'язані аналоги були значно більш цитотоксичними, ніж вихідні мономери, але мали загалом подібну активність. Навпаки, аналоги з бічними ланцюгами у 8-му положенні (на кінцевому кільці, але поза довгою віссю хромофора) або 10-положенні (поза короткою віссю хромофора, але в центральному кільці) мали меншу ефективність.

Варто зазначити, що в медичній практиці наразі проходять клінічні випробування декілька протипухлинних препаратів, що містять індено- та індоліві хромофорні групи, наприклад, (6-[[2-(диметиламіно)етил]аміно]-3-гідроксидено[2,1-с]хінолін-7-он дигідрохлорид (TAS-103); 2,3-Диметокси-6-

метил-5H-(1,3)діоксо(4',5':5,6)індено(1,2-с)ізохінолін-5,12(6H)-діон (NSC 314622); 8-аміноізоіндо(1,2-b)хіназолін-12(10H)-он (батрацилін). Їх структури наведено на рис. 1.32.

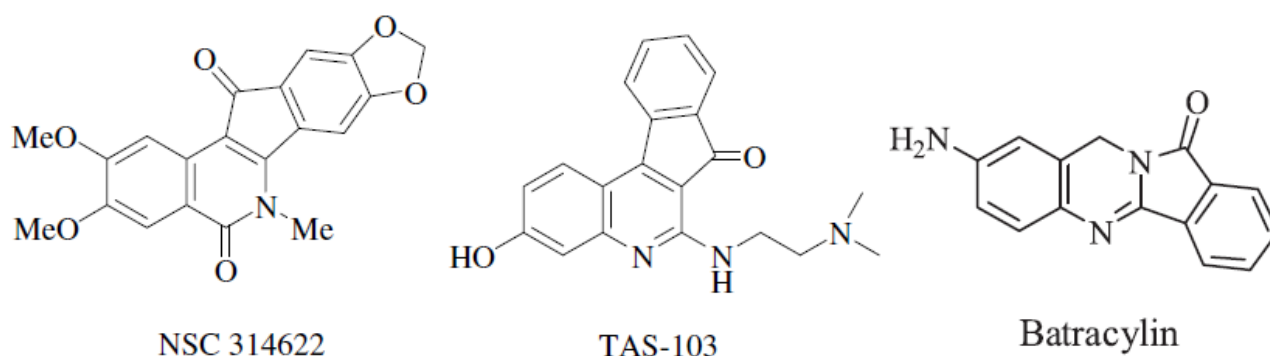


Рис. 1.32. Сполуки з інденохіноксаліновим каркасом, які клінічно досліджуються як протиракові засоби

Серія робіт [21, 24, 82, 83] присвячена дослідженню оксимних похідних IQ-ону (див. рис. 1.10) та їх солей з лужними металами, як інгібіторів c-Jun N-terminal kinase (JNK). Останні є важливими мітоген-активованими протеїнкіназами, які активуються у відповідь на різні стресові стимули і відіграють центральну роль у багатьох фізіологічних та патологічних процесах включаючи запальні реакції, морфогенез, клітинну проліферацію, диференціювання, виживання та загибель клітин. Існує декілька видів JNK (JNK 1-3), кожен із яких має по декілька ізоформ. Показано, що оксим IQ-ону та кілька його аналогів виявляють високу спорідненість до JNK3 порівняно з їхньою спорідненістю до JNK1/ JNK2. На підставі результатів, автори роблять висновок, що інденохіноксалінові сполуки можуть слугувати основою для розробки протизапальних засобів. Натрієва сіль оксиму IQ-ону проявила імуномодулюючу та протизапальну дію в клітинній культурі та тваринних моделях запалення [82, 83]. Вона виявляє також нейропротекторну активність [84] і противірусну дію проти SARS- CoV-2 [85].

В літературі також є відомості, що сполуки з інденохіноксаліновим каркасом інгібують дію acetylcholinesterase (AChE) [86], α -glucosidase [87, 88], α -amilase [54, 88], tryptophan-tRNA synthase (TrpRS) [89].

Існують повідомлення про наявність у похідних інденохіноксалінів антибактеріальної та антифунгальної дії [40, 41, 54]. Серед синтезованих азинів, зображених на рис. 1.22, більшість сполук мали явну протигрибкову активність проти грибів *Fusarium oxysporum*. Серед усіх синтезованих сполук дві виявилися перспективними кандидатами як антибактеріальні засоби проти *Serratia marcescens* [41].

Цікаві результати отримали автори [40], які вивчали дію самого IQ-ону та ряду його тіокарбазонів як на грам+, так і на грам- мікроорганізми, а також на дріжджеподібний грибок *Candida albicans* (*C. albicans*). За еталонний зразок використовували стрептоміцину сульфат. За їхніми даними можна прослідкувати, що саме сприяє бактеріцидній та фунгіцидній дії: каркас або тіокарбазольна група. Виявилось, що IQ-он у кількості 420 μg по відношенню до *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) та *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) проявляє таке саме інгібування, як і антибіотик, взятий за еталон. Введення тіокарбазидного фрагменту (див. рис. 1.21) не змінює активності по відношенню до цих бактерій, отже ймовірно бактеріостатичну дію спричиняє саме хромофорна група. У випадку *Bacillus cereus* (*B.cereus*), на який взагалі не діє контрольний антибіотик, обидві сполуки виявились однаково ефективними. Така ж картина спостерігається і для грибка *C. albicans*, ефективність обох зразків є однаковою і дещо більшою за контроль. Вплив тіокарбазидної групи проявився для *Escherichia coli* (*E. coli*), на яку IQ-он не чинить ніякої дії, а тіокарбазон проявляє таку ж активність, що й еталонний зразок. Також з цієї роботи видно, як сильно впливає бічний ланцюг на біологічні властивості: заміна Гідрогенів в тіокарбазидній групі на інші замісники алкільні, амідні ароматичні позбавляє продукти будь-якої антимікробної дії, яку мав родоначальний тіокарбазон.

До аналогічного висновку про вплив замісників дійшли й в роботі [54]. Проте основною ідеєю цієї роботи є те, що інденохіноксаліновий каркас сполучений зі спіропіролідиновим циклом забезпечує мультифункціональність біологічної активності: продукти володіли потужною

антимікробною дією, мали чудовий антиоксидантний потенціал та характеризувались інгібіторними властивостями щодо α -амілази.

1.4. *In silico* методи прогнозування біологічної активності

Методи *in silico* в сучасній хімії лікарських препаратів відіграють дуже важливу роль, оскільки дозволяють спрогнозувати ті чи інші біологічні властивості ще до процесу синтезу, який, як відомо, є одним із самих дорогих та енергозатратних процесів на шляху розробки ліків. Серед багатьох сполук-кандидатів комп'ютерні методи допомагають обрати найбільш перспективні зразки на основі структури сполуки ще до того, як вона була синтезована. В останнє десятиріччя переважна більшість наукових статей, що присвячені розробці потенційних лікарських сполук, у тому числі і наведені у цьому огляді, містять результати розрахунків, які зроблені за допомогою комп'ютерних технологій, переважно це дані молекулярного докінгу.

ADMET. Небажана фармакокінетика та токсичність сполук-кандидатів є основними причинами невдач при розробці ліків, тому попередня оцінка властивостей ADMET до яких входять: абсорбція (**absorption**), розподіл (**distribution**), метаболізм (**metabolism**), виведення (**excretion**), токсичність (**toxicity**) є важливими для оцінки фармакокінетики і фармакодинаміки сполуки-кандидата. Вони допомагають дослідникам виявляти потенційні проблеми на ранніх стадіях розробки ліків, що зрештою призводить до кращого прийняття рішень і зниження ризиків невдачі. Високоякісний препарат-кандидат повинен не тільки мати достатню ефективність проти терапевтичної мішені, але й демонструвати належні властивості ADMET у терапевтичній дозі. Тому розроблено багато моделей *in silico* для прогнозування хімічних властивостей ADMET. Одним з таких он-сервісів є програма ADMETLAB 3.0 [90]. Програма виконує аналіз структури хімічної сполуки та оцінює ряд показників, в тому числі фізико-хімічні властивості, показники ліпофільності (коефіцієнт розподілу октанол-вода), розчинність у воді та деякі фармакокінетичні параметри (зв'язування з ферментами печінки та ін.) (рис. 1.33). Програма також перевіряє

сполуку на відповідність критеріям біодоступності, включаючи правила Ліпінського [91].

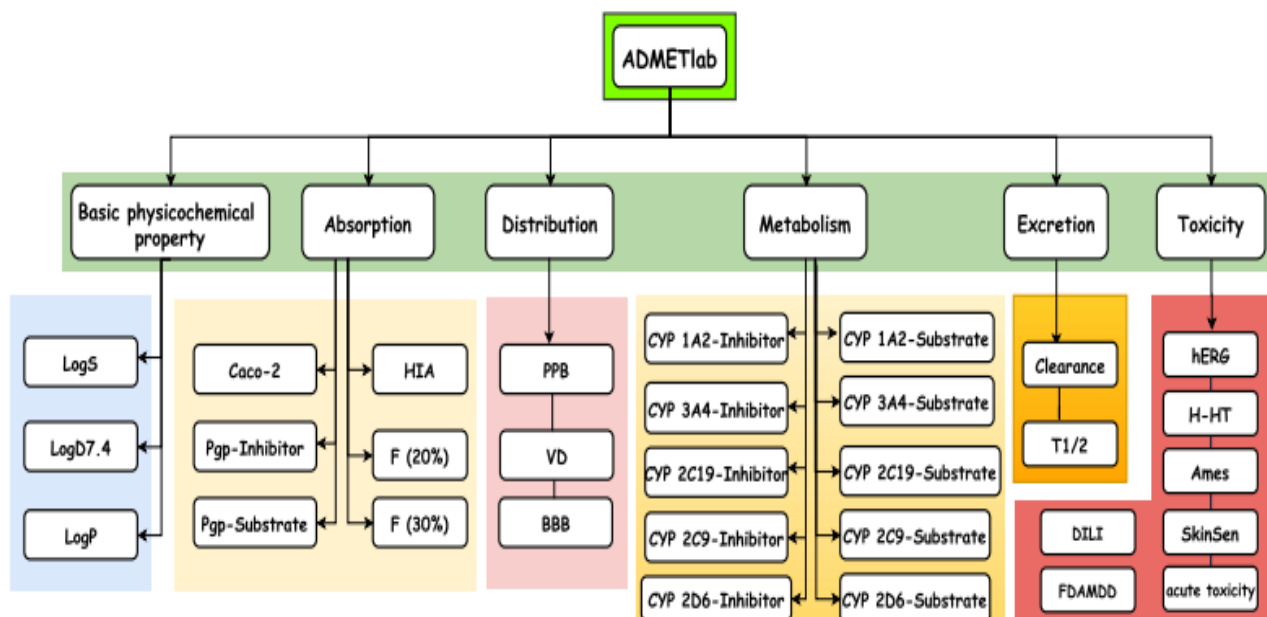


Рис. 1.33. Властивості ADMET, які можуть бути оцінені за допомогою сервісу ADMETlab [92]

Розраховані фізико-хімічні параметри сполук представляються у вигляді радару і таблиць, де кожне значення позначається своїм кольором в залежності від отриманих результатів (зелений – добрий; жовтий – середній; червоний – поганий), а також вказуються числові значення спрогнозованих фізико-хімічних параметрів.

Молекулярний докінг включає прогнозування взаємодії між лігандом і білком на атомному рівні [93]. Це дозволяє дослідникам вивчати поведінку малих молекул, у місці зв'язування цільового білка та зрозуміти фундаментальний біохімічний процес, що лежить в основі цієї взаємодії [94]. Правильна оцінка спорідненості зв'язування має вирішальне значення для таких завдань як віртуальний скринінг, або визначення того, чи варто сполуку надалі піддавати експериментальним методам аналізу. Метод заснований на структурі і вимагає високороздільного тривимірного представлення цільового білка, отриманого за допомогою таких методів, як рентгенівська кристалографія, ядерно-магнітна спектроскопія резонансна або кріоелектронна мікроскопія [95-97].

Методи стикування призначені для оцінки двох атрибутів взаємодії між хімічною сполукою та біологічною мішенню. По-перше, стикування передбачає спосіб взаємодії, тобто найбільш енергетично вигідну геометрію стикування при зв'язуванні з мішенню, задану тривимірними (3D) координатами кожного атома в ліганді щодо мішені (рис. 1.34). По-друге, стикування оцінює енергію зв'язування (або, що еквівалентно, спорідненість зв'язування), яка кількісно визначає ступінь взаємодії з мішенню або, навпаки, вказує, що сполука залишається у розчиннику в вільному стані. Бали стикування обчислюються за допомогою відповідних математичних чи прогностичних моделей, відомих як функції підрахунку балів (SF).

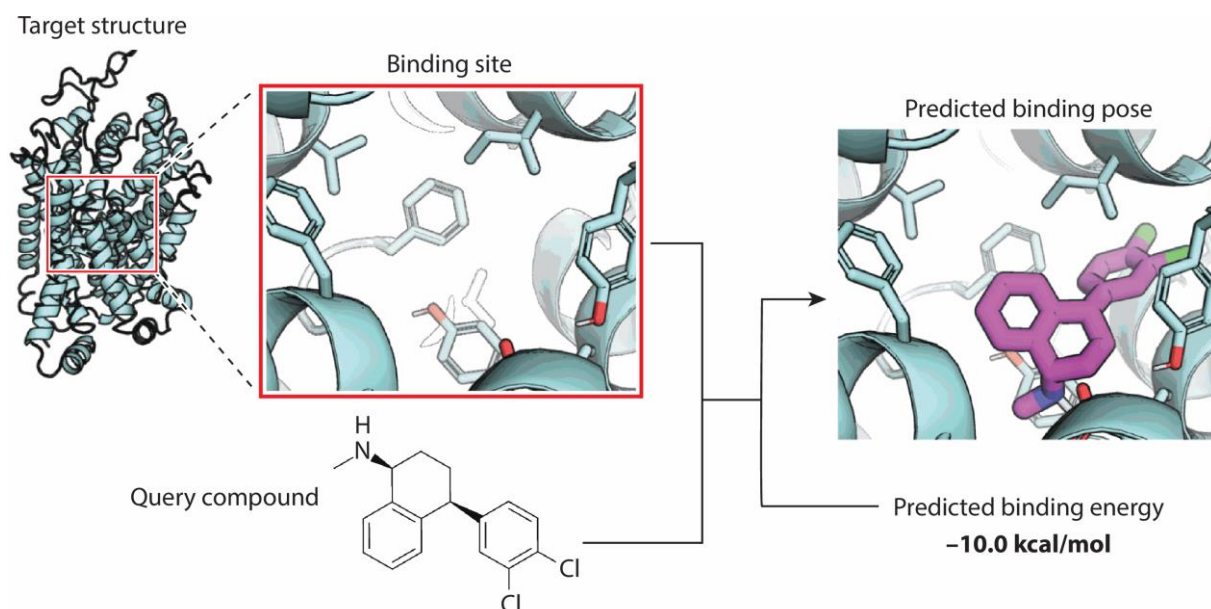


Рис. 1.34. Зображення способу з'єднання між лігандом та рецептором та розрахунок енергії зв'язку за допомогою молекулярного докінгу [98]

Докінг може бути досягнутий двома взаємозалежними кроками: спочатку шляхом вибірки конформацій ліганду в активному центрі білка; потім ранжирування цих конформацій за допомогою SF. В ідеалі алгоритми вибірки повинні бути здатні відтворювати експериментальний режим зв'язування, а функція підрахунку також повинна визначати його як найвищу серед усіх конформацій, що згенерували.

Методи стикування розробляються таким чином, щоб в ідеалі передбачений спосіб зв'язування відповідав структурі, яку визначили

експериментально за допомогою кристалографії або кріо-електронної мікроскопії, а спрогнозована енергія зв'язування повторювала аналітичні результати зв'язування, наприклад, радіолігандного зміщення. Стикування менш точне, ніж ці експериментальні методи, але воно набагато швидше і дешевше, і не вимагає фізичного синтезу кожної сполуки, що розглядається.

Найбільш надійними прогнозами способу та пози зв'язування ліганду з рецептором є ті, в яких експериментально визначено позицію зв'язування ліганду, подібного до дослідженої сполуки. Ліганди, які мають спільний каркас, зазвичай розміщуються в кишені зв'язування аналогічно. Також для більш надійних результатів треба декілька разів проводити редокінг (повторне стикування). Повторне стикування відноситься до здатності відтворювати геометрію співкристалізованого зв'язування та орієнтацію пов'язаного ліганду з урахуванням жорсткого стану макромолекули. Після проведення редокінгу з усіх отриманих значень енергії зв'язування треба обирати середнє арифметичне.

PharmMapper [99] – це веб-сервер для ідентифікації потенційної мішені лікарського засобу за допомогою зворотного фармакофора, який зіставляє запитувану сполуку з внутрішньою базою даних моделей фармакофорів. Завдяки високоефективному та надійному методу картування PharmMapper має високу пропускну здатність і може ідентифікувати потенційних кандидатів на цільові об'єкти з бази даних з часом виконання за кілька годин.

PharmMapper зберігає та використовує понад 7000 моделей фармакофорів на основі рецепторів (що охоплюють інформацію про 1627 цільових препаратів, 459 з яких є цільовими білками людини). PharmMapper знаходить найкращі варіанти зв'язування завантажених користувачем молекул по відношенню до всіх цілей PharmTargetDB, і виводить N кращих потенційних цільових мішеней.

Оскільки інденохіноксаліни, які вивчатимуться в представленій роботі, є потенційними інтеркаляторами, використання молекулярного докінгу є доцільним для перевірки можливості їх зв'язування з ДНК ще до початку етапу синтезу, а за допомогою PharmMapper можна спрогнозувати найбільш ймовірні біологічні мішені для такого зв'язування.

Висновки до розділу 1

На підставі аналізу літературних джерел можна констатувати:

1. Для синтезу сполук з інденохіноксаліновим каркасом дослідники віддають перевагу класичному методу синтезу: циклоконденсації ди- або трикарбонільних сполук із *o*-діамінами. Він є зручним і надійним з точки зору комерційної доступності вихідних реагентів, простоти умов синтезу та виходу кінцевих продуктів.
2. Коло похідних інденохіноксалінового ряду розширюється завдяки варіюванню природи карбонільної компоненти або замісників в бензеновому циклі діамінів при класичному способі їх отримання. Другим способом є функціоналізація сполук по карбонільній групі в інденовому циклі.
3. Похідні інденохіноксалінового ряду здатні до взаємодії з ДНК, у тому числі шляхом інтеркаляції в неї, що відкриває можливості для прояву широкого спектру біологічної активності: протипухлинної, протівірусної, протизапальної, антиоксидантної, протидіабетичної, антимікробної, антигрибкової тощо.
4. Для прогнозування можливостей застосування сполук-кандидатів як потенційних лікарських засобів широко застосовуються *in silico* методи.
5. В межах магістерської роботи автор мав напрацювання [22], щодо синтезу та досліджень афінитету 6- та 7-амінозаміщених IQ-ону, які виявили, що ці об'єкти мають високу афіність до ДНК і потенційно можуть застосовуватися для створення протипухлинних та/або протівірусних лікарських препаратів. Представлена робота є логічним продовженням цих досліджень на моделях амідів інденохіноксалінової кислоти. Вибір об'єктів обумовлений біодеградабельною природою амідних зв'язків, а також малочисельними літературними даними, які свідчили про те, що IQ-сполуки з довгими лінкерними ланцюгами амідної природи мають покращені біологічні властивості порівняно з іншими аналогами.

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИХІДНИХ РЕЧОВИНИ, ОПИС МЕТОДИК ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі комерційно доступні реактиви були кваліфікації «for synthesis» фірми Merck Millipore і використовувались без додаткового очищення. Контроль реакцій здійснювали методом тонкошарової хроматографії на платівках «Silufol» та «Silufol UV-254».

2.1. Вихідні сполуки для одержання 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти та методика її синтезу

2.1.1. Методика синтезу 2-карбамоїл-3-нітробензойної кислоти

3-нітрофталевий ангідрид (50,0 г, 250 ммоль) додавали порціями протягом 20 хвилин до концентрованого водного розчину (75 мл), і суміш перемішували при 30°C протягом 30 хвилин. При охолодженні з розчину починає випадати кристалічна маса фталамату амонію блідо-жовтого кольору. Розчин збирали і повторно розчиняли та додавали до нього мінімальну кількість теплої води. По краплях при перемішуванні додавали концентровану соляну кислоту (22,5 мл) і отриману пасту промивали водою і сушили у вакуумі з отриманням 3-нітрофталаманої кислоти у вигляді дрібного білого порошку з виходом 80% (42,2 г) [100]. Температура плавлення відповідала літературним даним та становила 217 °C.

2.1.2. Методика синтезу 2-аміно-3-нітробензойної кислоти

До розчину гідроксиду калію (101,70 г) в воді (465 мл) при перемішуванні (0°C) додавали бром (10,38 мл), потім 2-карбамоїл-3-нітробензойну кислоту 42,2 г (200 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 3 годин при 60°C, охолоджували до кімнатної температури та перемішували протягом наступних 12 годин. Помаранчевий осад збирають та повторно розчиняють у мінімальній кількості води, яку підкислюють додаванням по краплях концентрованої соляної кислоти. Перекристалізацією з гарячої води отримана 2-аміно-3-нітробензойна

кислота у вигляді жовтих мікрокристалів з виходом 71% (25,84 г) [100]. Температура плавлення відповідала літературним даним та становила 208-209 °С.

2.1.3. Методика синтезу 2,3-діамінобензойної кислоти

До розчину 10% соляної кислоти (140 мл) додають 25,84 г (20 ммоль) 2-аміно-3-нітробензойної кислоти та перемішують при нагріванні до 90-100°C, після чого до розчину починають частинами додавати 4,75 г (40 ммоль) олова. Реакцію проводять доки розчин не стане прозорим, зеленуватого відтінку, після чого в розчин додають Na_2CO_3 до припинення виділення CO_2 . Розчин фільтрують, маточний розчин підкислюють оцтовою кислотою, після чого висалюють NaCl . Осад, що випав, фільтрують, промивають водою, сушать та отримують 2,3-діамінобензойну кислоту у вигляді блідо-коричневих голок з виходом 67% (17,3 г). Температура плавлення відповідала літературним даним та становила 298-200 °С.

*2.1.4. Методика синтезу 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти*

За основу було взяту методику, наведену в роботі [12]. Розчин 19,59 г (0,1 моль) нінгідрину в 30 мл крижаної оцтової кислоти нагрівали до 70°C та при постійному перемішуванні додавали до нагрітого до 70°C розчину 17,2 г (0,1 моль) 2,3-діамінобензойної кислоти у 35 мл крижаної оцтової кислоти. Реакційну суміш перемішували 1 год, осад, що випав відфільтровували, промивали спочатку 50 мл суміші оцтова кислота вода, (1:1), потім 100 мл гарячої (80°C) води та сушили на повітрі, перекристалізували із 200 мл етанолу. Вихід – 19,3 г (70 %). $T_{\text{пл}} > 320$ °С; 276 [M+]. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 7,76 т (1H), 7,93 м (3H), 8,12 д (1H), 8,25 д (1H), 8,35 д (1H) ($J=8$ Гц, аром.); 13,75 уш. с. (1H, COOH).

2.2. Методики синтезу естерів амінокислот та амідів 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти

2.2.1. Загальна методика синтезу естерів амінокислот

Амінокислоту (0,1 моль) поміщали у круглодонну колбу та при перемішуванні повільно додавали свіжоперегнаний хлортриметилсилан (0,2 моль). Потім додавали метанол або етанол (100 мл) та отриманий розчин або суспензію перемішували при кімнатній температурі. Після завершення реакції (за даними ТШХ) реакційну суміш концентрували на роторному випарнику, при цьому отримували відповідний гідрохлорид естеру амінокислоти [101]. Чистоту продукту контролювали за температурою плавлення, яка відповідала літературним значенням. Вихід; $T_{пл}$, °C: етил 2-аміноацетат (96%, 145-148°C); метил 2-аміноацетат (95%, 175-176°C); метил 3-амінопропаноат (89%, 102-104°C); етил 2-[(2-аміноацетил)аміно]ацетат (92%, 183-184°C); метил 2-аміно-3-фенілпропаноат (95%, 158-160°C).

2.2.2. Загальна методика синтезу амідів 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти

До 1 г (3,5 ммоль) 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти 1 додавали 30 мл хлороформу та охолоджували до 0°C. До охолодженої суміші додавали 0,97 мл (0,07 моль) триетиламіну та 0,34 мл (0,0035 моль) етилового естеру монохлорвугільної кислоти. Суміш перемішували приблизно 1 год до повного розчинення речовини, потім додавали відповідну кількість аміновмісного компонента та перемішували 1 добу при кімнатній температурі.

*Етил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат (2)*

Додавали 0,49 г (3,5 ммоль) гідрохлориду етилового естеру гліцину. Після завершення реакції суміш фільтрували, фільтрат екстрагували водою (3 рази по 50 мл), органічну фазу упарювали до сухого залишку. Залишок розчиняли в 20 мл суміші хлороформ-ацетон, 20:1 та вносили в колонку з силікагелем (25x3,5 см), елюент хлороформ-ацетон, 20:1. Елюат, що містив продукт, упарювали до об'єму 15 мл та додавали 40 мл теплого етанолу. Після охолодження продукт,

що випадав в осад, відфільтровували, промивали етанолом (25 мл) та сушили на повітрі. Вихід – 0,76 г (60%). $T_{пл.} = 247-249\text{ }^{\circ}\text{C}$; 361 $[\text{M}^+]$. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 1,4 т (3Н, CH_3); 4,4 м (4Н, CH_2); 7,68 т (1Н), 7,87 к (2Н), 7,97 д (1Н), 8,40 д (1Н), 8,51 д (1Н), 8,91 д (1Н) ($J=8$ Гц, аром.); 11,17 уш. с (1Н, NH). Розраховано $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$: С 66,5, Н 4,20, N 11,60. Знайдено: С 66,51, Н 4,21, N 11,63.

*Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат (3)*

Додавали 0,44 г (3,5 ммоль) гідрохлориду метилового естеру гліцину. Вихід – 0,57 г (47%). $T_{пл.} = 222-224\text{ }^{\circ}\text{C}$; 347 $[\text{M}^+]$. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 3,77 с (3Н, CH_3); 4,39 д (2Н, CH_2); 7,78 т (1Н), 7,95 м (3Н), 8,38 д (1Н), 8,44 д (1Н), 8,64 д (1Н) ($J=8$ Гц, аром.); 10,64 уш. с (1Н, NH). Розраховано $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$: С 65,70, Н 3,80, N 12,10. Знайдено: С 65,74, Н 3,82, N 12,12.

*Метил 3-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]пропаноат (4)*

Додавали 0,49 г (3,5 ммоль) гідрохлориду метилового естеру β -аланіну. Елюент – хлороформ. Вихід – 0,53 г (42 %). $T_{пл.} = 160-162\text{ }^{\circ}\text{C}$; 361 $[\text{M}^+]$. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 3,33 с (3Н, CH_3); 2,75 т, 3,75 м (4Н, CH_2); 7,76 т (1Н), 8,24 м (3Н), 8,32 т (2Н), 8,55 д (1Н) ($J=8$ Гц, аром.); 10,17 уш. с (1Н, NH). Розраховано $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$: С 66,50, Н 4,20, N 11,60. Знайдено: С 66,52, Н 4,25, N 11,61.

*Етил 2-[[2-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетил]аміно]ацетат (5)*

Додавали 0,69 г (3,5 ммоль) гідрохлориду етилового естеру дигліцину. Продукт випадав із реакційної маси, його відфільтровували, розчиняли в 1 л киплячого хлороформу, пропускали крізь шар Al_2O_3 (2 см). 500 мл хлороформу відганяли, додавали 300 мл горячого етанолу та розчинник відганяли до об'єму 40 мл. Продукт, що випадав, фільтрували, промивали етанолом (40 мл) та сушили на повітрі. Вихід – 0,8 г (55 %). $T_{пл.} = 264-266\text{ }^{\circ}\text{C}$; 418 $[\text{M}^+]$. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 1,21 т, 4,13 к (5Н, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 4,01 д, 4,26 д (4Н, $\text{CH}_2\text{-N}$); 7,95 уш. с (1Н, NH); 7,75 т (1Н), 7,9 м (2Н), 8,33 д (1Н), 8,51 д (1Н), 8,63 д (1Н), 8,71 д (1Н) ($J=8$ Гц, аром.); 10,89 уш. с (1Н, NH). Розраховано $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$: С 63,20, Н 4,30, N 13,40. Знайдено: С 63,24, Н 4,34, N 13,44.

*Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3-фенілпропаноат (6)*

Додавали 0,75 г (3,5 ммоль) гідрохлориду метилового естеру β-феніл-α-аланіну. Елюент – суміш бензен-ацетон (20:1). Елюат упарювали до 10 мл та додавали 30 мл теплої суміші метанол-вода (9:1). Продукт, що осаджувався, відфільтровували, промивали водним метанолом та сушили на повітрі. Вихід – 0,61 г (40%). $T_{пл.}=142-145\text{ }^{\circ}\text{C}$; 437 $[M^+]$. ^1H ЯМР спектр δ , м.д., МГц: 3,28 д (2H, Ar-CH₂); 3,73 с (3H, CH₃); 5,11 м (1H, CH); 7,28 м (5H), 7,69 д (1H), 7,73 т (1H), 7,84 т (1H), 7,91 д (1H), 7,97 т (1H), 8,35 д (1H), 8,61 д (1H) ($J=8\text{ Гц}$, аром.); 10,29 уш. с. (1H, NH). Розраховано C₂₆H₁₉N₃O₄: С 71,40, Н 4,40, N 9,60. Знайдено: С 71,42, Н 4,43, N 9,62.

*N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (7)*

Додавали 0,36 г (3,5 ммоль) N,N-диметилпропан-1,3-діаміну. Після завершення реакції суміш фільтрували, фільтрат тричі екстрагували водою (50 мл), органічну фазу упарювали досуха. Залишок розчиняли в 20 мл суміші хлороформ-ацетон (20:1) та вносили до колонки з силікагелем (розміром 25 x 3,5 см). Елюат, що містив продукт упарювали до об'єму 15 мл та додавали 40 мл теплового етанолу. Після охолодження продукт, що випадав, відфільтровували, промивали етанолом (25 мл) та сушили на повітрі. Вихід 1 г (79%), $T_{пл.}=207-210\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР спектр (300 MHz, DMSO-d₆), δ , ppm: 2,51 (6H, с, CH₃); 1,97 (2H, м, CH₂), 2,82 (2H, м, CH₂), 3,57 (2H, м, CH₂); 7,77 (1H, т), 7,92 (3H, м), 8,23 (1H, д), 8,31 (1H, д), 8,43 (1H, д) ($J=8\text{ Гц}$, аром.); 9,73 (1H, м, NH). MS (EI), m/z : 360 $[M]^+$. Розраховано C₂₁H₂₀N₄O₂: С 70,00, Н 5,60, N 15,50. Знайдено: С 70,1, Н 5,66, N 15,59.

*2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоат (8)*

Додавали 1,73 г (3,5 ммоль) новокаїну. Продукт, що випадав в осад фільтрували. Перекристалізовували із води, а потім декілька разів з ізопропілового спирту та сушили на повітрі. Вихід 1,3 г (75%), $T_{пл.}=199-202\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР спектр (300 MHz, DMSO-d₆), δ , ppm: 0,99 (6H, т, CH₃); 2,57 (4H, к, CH₂),

2,79 (2H, т, N-CH₂), 4,32 (2H, т, O-CH₃); 7,77 (2H, м), 7,91 (2H, д), 7,93 (1H, д), 7,99 (2H, м), 8,04 (2H, м), 8,39 (1H, д), 8,43 (1H, д) (J=8 Гц, аром.); 11,78 (1H, роз. с, NH). MS (EI), *m/z*: 494 [M]⁺. Розраховано C₂₉H₂₆N₄O₄: С 70,40, Н 5,30, N 11,30. Знайдено: С 70,80, Н 5,60, N 12,70.

N-(2,6-диметилпіримідин-4-іл)-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (**9**)

Додавали 1,33 г (3,5 ммоль) 2,6-диметилпіримідин-4-аміну. Виділяли та очищували аналогічно продукту **7**. Вихід 0,93 г (70%), T_{пл.}>300°C. ¹H ЯМР спектр (300 MHz, DMSO-d₆), δ, ppm: 2,41 (3H, с, CH₃); 2,54 (3H, с, CH₃), 7,73 (2H, м), 7,95 (1H, д), 8,06 (1H, т), 8,12 (1H, д), 8,25 (1H, д), 8,49 (1H, д) (J=8 Гц, аром.); 13,20 (1H, роз. с, NH). MS (EI), *m/z*: 381 [M]⁺. Розраховано C₂₂H₁₅N₅O₂: С 69,30, Н 4,00, N 18,40. Знайдено: С 69,41, Н 4,08, N 18,47.

N-(2-гідроксіетил)-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (**10**)

Додавали 0,22 г (3,5 ммоль) 2-аміноетанолу. Продукт, що випадав в осад фільтрували. Отриману суху речовину розчиняли в суміші хлороформ-ацетон-метанол (100:5:1) та вносили до колонки з силікагелем (розміром 25 x 3,5 см). Елюат, що містив продукт упарювали до об'єму 15 мл та додавали 40 мл теплового етанолу. Після охолодження продукт, що випадав, відфільтровували, промивали етанолом (25 мл) та сушили на повітрі. Вихід 1,1 г (57%), T_{пл.}=256-259 °C. ¹H ЯМР спектр (300 MHz, DMSO-d₆), δ, ppm: 3,59 (2H, CH₂); 3,72 (2H, CH₂), 5,16 (1H, OH); 7,75 м, 7,92 м (3H); 8,30 м (2H), 8,61 д (J=8 Гц, аром.); 10,52 (1H, NH). MS (EI), *m/z*: 319 [M]⁺. Розраховано C₁₈H₁₃N₃O₃: С 67,7, Н 4,10, N 13,20. Знайдено: С 67,8, Н 4,12, N 13,24.

6-(Морфолін-4-карбоніл)індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-он (**11**)

Додавали 0,30 г (3,5 ммоль) морфоліну. Продукт, що випадав в осад фільтрували. Отриману суху речовину розчиняли в суміші хлороформ-ацетон (20:1) та вносили до колонки з силікагелем (розміром 25 x 3,5 см). Елюат, що містив продукт упарювали до об'єму 15 мл та додавали 40 мл теплового етанолу. Після охолодження продукт, що випадав, відфільтровували, промивали

етанолом (25 мл) та сушили на повітрі. Вихід 1,3 г (63%), $T_{пл.}=257-260\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР спектр (300 MHz, DMSO- d_6), δ , ppm: 3,23 (2H); 3,57 м, 3,67 м, 3,84 м, 3,93 д (2H), 4,19 м; 7,64 м, 7,81 м (3H), 7,95 д, 8,06 д, 8,28 д ($J=8$ Гц, аром). MS (EI), m/z : 345 $[M]^+$. Розраховано $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$: С 69,6, Н 4,40, N 12,20. Знайдено: С 70,0, Н 4,45, N 12,26.

2.3. Методика визначення pK_{BH^+} амідних похідних з аміногрупами

Визначення pK_{BH^+} похідних 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти здійснювали спектрофотометричним методом.

Для приготування універсального буферного розчину (УБР) змішували 2,3 мл крижаної оцтової кислоти, 2,1 мл концентрованої фосфорної кислоти, 2,4732 г борної кислоти у колбі на 1000 мл. Для приготування одинадцяти розчинів в широкому діапазоні рН (1,81-11,98) аліквоту 0,2н NaOH доповнювали до позначки УБР (табл. 2.1).

Буферні розчини з рН 1 та 1.5 готували з рівних об'ємів 0,2М HCl та 0,2М KCl, а також 0,1М HCl та 0,2М KCl відповідно. Перевірка та коригування рН розчинів проводилася за допомогою рН-метру.

Таблиця 2.1

Об'єм 0,2 н NaOH, який необхідно додати до УБР для отримання певної рН

V, мл	pH	V, мл	pH	V, мл	pH	V, мл	pH
0	1,81	25,00	4,10	50,00	6,80	75,00	9,62
2,50	1,89	27,50	4,35	52,50	7,00	77,50	9,91
5,00	1,98	30,00	4,56	55,00	7,24	80,00	10,38
7,50	2,09	32,50	4,78	57,50	7,54	82,50	10,88
10,00	2,21	35,00	5,02	60,00	7,96	85,00	11,20
12,50	2,36	37,50	5,33	62,50	8,36	87,50	11,40
15,00	2,56	40,00	5,72	65,00	8,69	90,00	11,58
17,50	2,87	42,50	6,09	67,50	8,95	92,50	11,70
20,00	3,29	45,00	6,37	70,00	9,15	95,00	11,82
22,50	3,78	47,50	6,59	72,50	9,37	100	11,98

У кожній суміші з різним рН розчиняли сполуки **7 – 11** з концентраціями: 30,5, 5,0; 11,2; 67,0; 44 мкМ, відповідно. Реєстрували електронні спектри поглинання у діапазоні 210–340 нм, при цьому як розчин порівняння використовували відповідний буферний розчин. Отримані спектри обробляли за допомогою програми SpectroCalc-H5A. Алгоритм розрахунку pK_{BH^+} заснований на методах ітерації і множинного лінійного регресійного аналізу за методом найменших квадратів і придатний для дослідження речовин навіть у разі значного перекривання смуг в спектрах поглинання окремих форм [103].

2.4. Методики визначення афінитету до ДНК

Перевірку здатності досліджених сполук до зв'язування з ДНК було виконано методом конкуренції з етидієм бромідом [104] з використанням водних розчинів: ДНК великої рогатої худоби (ВРХ) ($2,12 \cdot 10^{-4}$ М); ЕБ ($2,54 \cdot 10^{-4}$ М); NaCl ($3,73 \cdot 10^{-1}$ М); ацетату натрію ($2,00 \cdot 10^{-2}$ М), доведених до рН = 5,5 додаванням оцтової кислоти (контролюють за допомогою повіреного й відкаліброваного рН-метра); ЕДТА ($4,93 \cdot 10^{-3}$ М). Суміш цих розчинів є вихідним, концентрованим розчином (познач. «200 К»). З нього готують розчин, розведений у 2 рази (познач. «100 К»): ДНК ($1,06 \cdot 10^{-5}$ М); ЕБ ($1,27 \cdot 10^{-5}$ М); NaCl ($1,87 \cdot 10^{-2}$ М); ацетату натрію ($4,00 \cdot 10^{-3}$ М), ЕДТА ($2,46 \cdot 10^{-4}$ М). Для контролю використовували розчин «100 К», але без ЕБ (познач. «0 К»).

Розчин сполук **2-6** (познач. X2-X6) з концентрацією 60 мкМ готували шляхом їх розчинення у 10 % водному розчині Твіну-80.

Досліджування афінитету здійснювали двома способами. Сполуки **2-6** проаналізовано планшетним способом, **7-11** – за допомогою флуоресцентної спектроскопії. В кожному випадку готували однакові вихідні і робочі розчини, перед цим здійснювали калібрування піпеточних дозаторів.

Калібрування піпеточних дозаторів

На аналітичних електронних вагах зважують хімічний стакан. Піпеточним дозатором десять разів додають номінальну кількість дистильованої води,

зважуючи стакан після кожного додавання. Отриманні результати – пари значень кількість доданих порцій води та вага – вносять в таблицю даних програми Origin та проводять лінійну апроксимацію. За середнє значення маси води в одній порції приймають нахил прямої. За фактичний об'єм заданого номіналу приймають результат ділення середньої маси однієї порції доданої води на щільність води при температурі калібрування.

2.4.1. Визначення афінитету планшетним способом

Спочатку проводять *якісну* оцінку на принципову можливість взаємодії сполуки з ДНК.

Дослідження проводять в чорному 96-лунковому планшеті. На кожну досліджувану сполуку використовують 3 лунки, додатково – три лунки із розчином 100 К та три лунки з розчином 0 К.

Схему заповнення планшету представлено на рис. 2.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X2	X2	X2	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
B	X3	X3	X3	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
C	X4	X4	X4	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
D	X4	X4	X4	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
E	X5	X5	X5	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
F	X6	X6	X6	100K	100K	100K	0K	0K	0K			
G												
H												

Рис. 2.1. Схема заповнення планшету при якісному дослідженні взаємодії сполук із ДНК

Дослідження проводять послідовним виконанням кроків 1 – 8:

1. В лунки планшету A1 – H6 додають по 100 мкл розчину «200 К».

2. В лунки планшету A7 – H9 додають по 100 мкл розчину «0 К».
3. В лунки планшету A1 – H3 додають по 100 мкл розчинів сполук 2-6.
4. В лунки планшету A4 – H9 додають по 100 мкл води дистильованої.
5. Вміст лунок перемішують орбітальним струшуванням планшету та залишають на 10 – 15 хвилин.
6. Планшет з розчинами розміщують на світофільтрі транс-ілюмінатору ($\lambda=365$ нм) та фотографують цифровою фотокамерою в режимі кольорової нічної зйомки, зберігаючи фотографії в форматі *.tiff без стискання.
7. Отриману фотографію розділяють на кольорові канали засобами програми ImageJ 1,48, образ червоного каналу оцифровують засобами програми Array Analysis пакету TotalLab. Отримані значення флуоресценції (для $\lambda>600$ нм) переносять в Excel для розрахунку середніх за трьома паралелями для розчинів кожної сполуки та відповідних їм «100 К» та «0 К». З отриманих значень розраховують ступінь інгібування (S_x) флуоресценції ЕБ кожною сполукою (ступінь його витиснення з комплексу з ДНК) за рівнянням:

$$S_x = \frac{I_{100K} - I_x}{I_{100K} - I_{0K}} \times 100\% \quad (2.1)$$

де, I_{100K} – інтенсивність флуоресценції розчину 100К;

I_x – інтенсивність флуоресценції досліджуваної сполуки;

I_{0K} – інтенсивність флуоресценції розчину 0К.

8. Якщо S_x виявляється меншим за 10% або більшим за 90%, експеримент повторюють зі збільшеною або зменшеною (в 10–100 разів) концентрацією досліджуваної сполуки.

За відсутності взаємодії між лігандом та ДНК, в лунках 1-3 буде спостерігатися флуоресценція. В іншому випадку, за відсутності флуоресценції, дослідження проводять кількісно, при цьому визначають значення константи асоціації (K_x).

Схема заповнення планшету в цьому випадку виглядає наступним чином (рис. 2.2):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	100K	0K
B	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	100K	0K
C	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	100K	0K
D												
E	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	100K	0K
F	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	100K	0K
G	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	100K	0K
H												

Рис. 2.2. Схема заповнення планшету при кількісному дослідженні взаємодії сполук із ДНК

Поетапне дослідження полягає в наступних діях:

1. В лунки планшету A1 – C1 та E1 – G1 додають по 100 мкл розчину "200 K".
2. В лунки планшету A2 – C11 та E2 – G11 додають по 100 мкл розчину "100 K".
3. В лунки планшету A12 – C12 та E12 – G12 додають по 100 мкл розчину "0 K".
4. В лунки планшету A1 – C1 та E1 – G1 додають по 100 мкл розчинів двох досліджуваних сполук X2 та X3 концентрацією, яка забезпечує більш, ніж 90 %-ве пригнічення флуоресценції в попередньому експерименті. Якщо така концентрація не була досягнута, то використовують концентрацію в 16 – 64 рази більшу за ту, що приводила до приблизно 50 %-го інгібування флуоресценції.
5. Вміст лунок A1 – C1 та E1 – G1 перемішують багаторазовим пипетуванням багатоканальним дозатором, відбирають 100 мкл, які переносять в лунки стовпчику 2. Піпетування та перенос повторюють до лунок стовпчику 10, з яких надлишкові 100 мкл видаляють.

Подальші кроки 6 та 7 здійснюють так само, як і в методиці для якісної оцінки та розраховують значення S_x для кожної сполуки.

Результати у вигляді пар значень "логарифм концентрації – інтенсивність" переносять в програму Origin (окремо для кожного з паралельних експериментів для кожної сполуки) та проводять її засобами нелінійну апроксимацію функцією "Доза-ефект". Із значень $\lg C_{50}$ отриманих таким чином розраховують величини констант асоціації за рівнянням 2.2 відповідно до [104]:

$$\lg K_x = 7 - \lg C_{50} + \lg C_E, \quad (2.2)$$

де $\lg K_x$ – логарифм константи асоціації сполуки з ДНК;

7 – логарифм константи асоціації з ДНК етидію броміду;

$\lg C_{50}$ – логарифм концентрації сполуки, що забезпечує 50 %-ве витиснення етидію броміду;

$\lg C_E$ – логарифм концентрації етидію броміду в експерименті

2.4.2. Визначення афінітету методом флуоресцентної спектроскопії

Цей метод був застосований для дослідження сполук **7-11**.

Приготування розчинів здійснювали аналогічно п. 2.4.1, але визначення залежності ступеню пригнічення інтенсивності флуоресценції інтеркальованого ЕБ від логарифму концентрації лігандів проводилося реєстрацією спектрів флуоресценції при λ збудження 365 нм. Розчинами **X7-X11** з різними концентраціями заповнювали кювети флуориметра, як розчин порівняння використовували розчин 0 К.

На підставі спектрів флуоресценції отримують значення оптичної густини розчинів, з яких за рівнянням (2.1) розраховують значення S_x та відповідно до п. 2.4.1 розраховують K_x .

2.4.3. Методика спектрофотометричного визначення здатності сполук до інтеркаляції

Готують розчини сполук **7-11** в присутності ДНК з концентраціями 106 , 79,5, 53, 35,4, 11,8, 0 мкМ в буферному розчині складу: CH_3COONa (5 мМ, pH = 5.5) та NaCl (37,3 мМ). Спектри розчинів реєструють в діапазоні 250–350 нм, використовуючи як розчин порівняння буферний розчин того ж складу, але він

не містить ані ДНК, ані досліджуваної сполуки. Визначають довжину хвилі, при якій спостерігається максимум у вказаному діапазоні для кожної концентрації.

2.5. In silico методи для прогнозування ADMET властивостей та взаємодії з біологічними об'єктами

Хіміко-фізичні та фармакологічні параметри одержаних сполук спрогнозовано за допомогою он-лайн сервісу ADMETlab 2.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>).

Скрінінг щодо можливості зв'язування з потенційними біологічними мішенями здійснено за допомогою бази даних PharmMapper – інтегрованого веб-серверу фармакофорів (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>).

Молекулярний докінг був проведений за допомогою програми MOE 2014.09.01. (<https://www.chemcomp.com/en/Products.htm>). Комплекс ДНК з профлавіном був завантажений з бази даних з вільним доступом Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/3ft6>) та використовувався як мішень для докінгу. Мішень підготовлена протонуванням, видаленням води, яка не зв'язана з комплексом, та мінімізацією енергії. Мінімізація енергії виконувалась за допомогою силового поля Amber99. Для оцінки коректності підготовки мішені був проведений редокінг, результати якого свідчать про адекватність умов докінгу та припустимість використання обраної мішені для докінгу цільових сполук. Докінг сполук виконували за допомогою скорінг-функції London dG та Triangle Matcher Placement [105]. Для оцінки якості зв'язування оцінювали позицію з найменшою енергією та позицію з найкращим накладанням на профлавін.

2.6. Методики дослідження біологічної активності

2.6.1. Методика антимікробного скринінгу

Сполуки **7**, **8**, **10**, **11** були протестовані проти таких патогенів: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 29213, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *Candida albicans* (*C.*

albicans) ATCC18804. Тестові диски (діаметр 6 мм) просочували розчинами сполук шляхом перенесення 50 мкл розчинів концентрацією 16, 16, 8, 8 мг/мл, відповідно. Тестові диски витримували в термостаті протягом 24 годин, щоб дозволити розчинникам випаруватися. Інокулят патогенів суспендували в теплому агарі Мюллера-Хінтона-II і 20 мл агару розподіляли в чашки Петрі. Після охолодження диски наносили на агар. Після 24 годин інкубації при 37 °С тестові диски видаляли. Через 30 хв. вимірювали діаметр зон інгібування. Як позитивний контроль для бактерій використовували Гентаміцин (10 мкг), для *C. albicans* – Флуконазол (40 мкг).

2.6.2. Методика дослідження антифунгальної активності методом резазуринової проби

Дослідження проводили у 96-лункових плоскодонних полістиролових планшетах (Orange Scientific). Культуру тест-штаму висівали виснажливим штрихом на поверхню середовища МПА в чашках Петрі, інкубували при 37 °С протягом 24 год.

В день постановки досліду ізольовану колонію знімали з середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі та ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині. Щільність суспензії доводили до стандарту МакФарланда 0,5 од. Отриманий інокулят використовували для подальшого засіву планшету.

У перший вертикальний ряд планшету вносили 320 мкл середовища LB, 40 мкл вихідних розчинів досліджуваних сполук та ретельно перемішували піпетуванням. У всі лунки наступних рядів вносили по 180 мкл середовища. З лунок першого ряду відбирали по 180 мкл та переносили в наступний ряд, отримуючи двократне розведення. Таким чином готували розведення у всіх наступних рядах, з лунок останнього ряду видаляли по 180 мкл. Для кожної концентрації сполуки робили три повтори.

Для визначення впливу розчинника на ріст культури готували його аналогічні розведення за схемою, описаною вище.

У контрольні лунки вносили 180 мкл середовища. Для контролю сполук в лунки вносили 180 мкл середовища та 20 мкл розчинів досліджуванх речовин. У лунки для контролю барвника вносили 200 мкл середовища.

У всі лунки, крім контролю сполук і барвника, вносили по 20 мкл суспензії клітин *C. albicans* та інкубували при 37 °С протягом 24 год.

Для оцінки життєздатності клітин готували розчин резазурину (337,5 мг порошку резазурину (Sigma-Aldrich) розчиняли в 50 мл стерильної дистильованої води [106]. Стерилізували фільтруванням за допомогою бактеріального фільтра NEST (Syringe Filter) та розводили стерильною дистильованою водою в 5 разів. Розчин зберігали в морозильній камері при – 20 °С. У день постановки досліду розчин розморожували без доступу світла та додавали по 5 мкл до кожної лунки [107]. Результат оцінювали візуально через 4 години. Планшети інкубували при 37 °С протягом 18 год та вимірювали оптичну щільність на планшетному рідері μ Quant (BioTek, США) при λ -570 нм, що відповідає максимуму поглинання резорурфіну, який утворюється при відновленні резазурину живими клітинами [108].

За результатами експерименту, з отриманих значень оптичної густини було розраховано ріст клітин у кожній лунці, і відповідно ступінь пригнічення для цих лунок за наступною формулою:

$$\text{Ріст клітин (\%)} = \frac{A_d}{A_k} * 100\%,$$

де A_d – оптична густина досліджуваної лунки;

A_k – оптична густина лунок з резазуріном та клітинами без досліджуваної речовини.

2.7. Методи дослідження аналгетичної активності

2.7.1. Дослідження аналгетичної активності на моделі термічного подразнення хвоста у щурів

Дослідження впливу синтезованого зразку – сполуки **8** на центральний компонент ноцицептивної реакції проводили на моделі термічного подразнення

хвоста у щурів. Для дослідження аналгетичної активності були виготовленні мазі різних концентрацій (1 %, 3 %, 5 %) для трансдермального нанесення.

Для виготовлення мазі було підібрано оптимальну мазеву основу до складу якої входили поліетиленгліколь 1500, поліетиленоксид 400, 1,2-пропіленгліколь у співвідношенні 4:2:3, відповідно.

Експерименти проводили з використанням статевозрілих щурів, які були розділені на групи по 10 особин, які утримувались в стандартних умовах віварію.

Визначення здійснювали за часом латентного періоду початкового порогу больової чутливості у тварин під впливом ноцицептивного подразника: гарячої води ($t=50^{\circ}\text{C}$) з урахуванням латентного періоду відповідної реакції в секундах (витягування хвоста з гарячої води). Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою. Як препарат порівняння використовували 2% мазь анестезину [109].

2.7.2. Дослідження аналгетичної активності при термічному подразненні у тесті «гаряча пластина»

Для визначення аналгетичної активності на моделі термічного подразнення експериментальним тваринам наносили мазі на основі сполуки **8** за 15 хв до початку експерименту і по черзі поміщали їх на пластину, нагріту до 55°C (Hot plate-метр, Columbus Instruments, США).

Показником аналгетичної активності вважали латентний час – тобто час в секундах до початку оборонного рефлексу тварин – облизування кінцівок. Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою. Дослід проводили протягом 1 хвилини. Як препарат порівняння використовували 2 % мазь анестезину [110].

2.7.3. Дослідження аналгетичної активності при хімічному подразненні у «формаліновому» тесті

При дослідженні аналгетичної активності досліджуваних мазей у «формаліновому тесті» біль у експериментальних тварин індукували

субплантарним введенням 20 мкл 2%-ого розчину формаліну у 0,9%-ому розчині NaCl. Одразу після ін'єкції розчину формаліну кожну тварину поміщали у прозорий бокс. За піддослідними тваринами спостерігали протягом першої фази больової реакції, яка характеризує гострий біль (0-5 хвилин після ін'єкції формаліну) та другої фази (15-20 хвилин після введення формаліну), яка пов'язана із розвитком запалення. В продовж першої та другої фази фіксували час, витрачений тваринами на облизування уражених кінцівок та інтенсивність больової реакції оцінювали за тривалістю патернів облизування (в секундах).

Аналгетичну активність визначали за здатністю досліджуваних мазей змінювати поріг больової чутливості експериментальних тварин у порівнянні із контрольною групою [111].

2.7.4. Дослідження аналгетичної активності на моделі алілізотіоціанат-індукованого болю

При дослідженні аналгетичної активності досліджуваних мазей на моделі алілізотіоціанат-індукованого болю експериментальним тваринам субплантарно вводили 20 мкл 0,5%-ого розчину алілізотіоціанату (АІТЦ) у 1,2-пропіленгліколі. Одразу після ін'єкції розчину АІТЦ кожну тварину поміщали у прозорий бокс. За піддослідною твариною спостерігали протягом 10 хвилин після введення АІТЦ та фіксували час, витрачений твариною на облизування ураженої кінцівки. Інтенсивність больової реакції оцінювали за тривалістю патернів облизування (в секундах) [112].

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми STATISTICA 8. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовували параметричний критерій Ст'юденту. Довірчий інтервал у всіх дослідах розраховувався при рівні значимості $P \leq 0,05$, що гарантує вірогідність результатів з імовірністю 95 %.

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані вимоги нормативних документів з до клінічного вивчення потенційних лікарських засобів, біоетики відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001

р.), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), Закону України від 21.02.2006 №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження»[113-114].

2.8. Апаратурне оформлення експериментальної частини

Хроматомас-спектри високої роздільної здатності (HRMS) сполук **1-6** були отримані на приладі Agilent 1260 Infinity UHPLC у поєднанні з мас-спектрометром Agilent 6224 Accurate Mass TOF. Мас-спектри сполук **7-11** реєстрували на спектрометрі VG 70-70 EQ (VG Instruments Inc., Danvers, MA). Іонізація здійснювалася пучком атомів Аргону з енергією 10 кV (речовини розчиняли у 3-нітробензиловому спирті). Спектри ^1H ЯМР реєстрували в розчинах CDCl_3 або DMSO-d_6 відносно TMC на спектрометрі Varian VXR-300 (Varian, USA). Елементний аналіз проводили на аналізаторі PerkinElmer 2400 CHN (PerkinElmer Inc., USA). Температуру плавлення сполук вимірювали у запаяному капілярі.

Спектри світлопоглинання записували в діапазоні довжини хвиль 210-340 нм в кюветах із товщиною поглинаючого шару 1 см, на спектрофотометрі «Specord 250+» (Analytic Jena, Germany). Спектри флуоресценції реєстрували на флуориметрі FL (Zagorsk Optical-Mechanical Plant, Russia) при довжині хвилі 365 нм. Цифровий фотоапарат Olympus Camedia C760 UZ з параметрами: CCD (ПЗС-матриця), 3,2 млн. пікселів, Об'єктив – 10х зум, $f / 2,8-3,7$ (42 - 420 мм на 35-мм еквіваленті).

Для досліджень афінітету використовували наступне приладдя:

- планшет для мікротитрування, чорний, 96 – лунковий;
- дозатор піпеточний Labsystems 4500 (20 – 200 μL);
- рН – метр Seven Compact S230 (Mettler Toledo, USA);
- ваги лабораторні електронні (Axis, Poland);
- мірний посуд різного номіналу II класу точності: колби мірні 25, 50, 500, 1000 мл; піпетки Мора 25, 50, 100 мл.

Висновки до розділу 2

1. Для синтезу 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти за двостадійною методикою потрібно отримати 2,3-діамінобензойну кислоту, після чого провести її циклоконденсацію з нінгідрином в оцтовій кислоті. Відповідні методики підібрано з літературних джерел.
2. Методику утворення амідних зв'язків активацією карбоксильної групи було адаптовано під предмет даного дослідження та визначений спосіб дослідження кислотно-основних властивостей продуктів амідування.
3. Афінітет до ДНК запропоновано визначати двома методами: із використанням планшетів та флуоресцентної спектроскопії.
4. Визначено *in silico* методи прогнозування фармакокінетичних показників абсорбції, розподілення, метаболізму і виведення з організму синтезованих продуктів та визначенню їх потенційних біологічних мішеней.
5. Антимікробний скринінг амідних похідних здійснюється *in vitro* згідно методу дискової дифузії, антигрибкова активність – планшетним методом за допомогою резазуринової проби. Аналгетичну активність визначали на моделях термічного та хімічно-індукованого болю.

РОЗДІЛ 3. ПРОГНОЗУВАННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ АМІДНИХ ПОХІДНИХ ІНДЕНОХІНОКСАЛІНУ МЕТОДАМИ *IN SILICO*

3.1. Визначення і аналіз ADMET-показників

Оскільки синтез нових молекул – це складний, дорогий та тривалий процес, методи *in silico* відіграють важливу роль на ранніх стадіях розробки нових речовин та застосовуються до їх лабораторного синтезу. Ретельний скринінг дозволяє скоротити кількість досліджень на тваринах, переходячи лише до перспективних сполук. Для того щоб зекономити час, ресурси та мінімізувати ймовірність невдач було проведено аналіз *in silico* сполук **1-11** ще до їх синтезу.

Скринінг ADMET є ключовим та одним із перших етапів у процесі розробки лікарських засобів. Одними з найважливіших характеристик є фізико-хімічні параметри сполук, оскільки вони повинні відповідати правилу Ліпінського [91]. Воно використовується з метою оцінки «лікарської придатності» малих молекул, тобто їх здатність стати ліками. Якщо фізико-хімічні показники сполук не відповідають цьому правилу, синтез проаналізованих сполук не проводять. Шляхом комп'ютерного моделювання за допомогою сервісу ADMETlab 2.0 [90] синтезовані сполуки пройшли оцінку ADMET-властивостей. Візуалізація результатів представлена у вигляді «веб»-графів на прикладі сполуки **7** (рис. 3.1), а числові значення наведені в таблиці 3.1.

Фізико-хімічні властивості отриманих речовин вкладаються в діапазон нижньої (зелена зона) та верхньої (блакитна зона) меж графіків, тобто в оранжеву зону (рис. 3.1), що вказує на їх перспективність як лікарських речовин.

Представлені дані засвідчують, що всі сполуки за параметрами MW, Log P, nHA, nHD, nRot відповідають правилу Ліпінського, а отже є перспективними з точки зору застосування їх як лікарських субстанцій (“drug-like”) [115].

Фізико-хімічні параметри сполук **1-11**

Сполука	MW	Log P	nHA	nHD	TPSA	nRot	Log D
Нормальні показники	<500	<5	<10	<5	<140	<11	<3
1	276,05	2,26	5,0	1,0	80,15	1,0	1,437
2	361,11	2,376	7,0	1,0	98,25	6,0	2,581
3	347,09	1,924	7,0	1,0	98,25	5,0	2,223
4	361,11	2,568	7,0	1,0	98,25	6,0	2,671
5	418,13	1,839	9,0	2,0	127,35	9,0	2,221
6	437,14	3,408	7,0	1,0	98,25	7,0	3,351
7	360,16	2,311	6,0	1,0	75,19	6,0	2,436
8	494,20	4,821	8,0	1,0	101,49	10,0	3,724
9	381,12	2,935	7,0	1,0	97,73	3,0	2,923
10	319,1	1,586	6,0	2,0	92,18	4,0	1,961
11	345,11	1,598	6,0	0,0	72,39	2,0	1,981

MW – молекулярна маса;

Log P – логарифм коефіцієнту розподілення в системі *n*-октанол/вода при pH=7,4;

Log D – логарифм коефіцієнту розподілення в системі *n*-октанол/вода;

nHA, nHD – кількість акцепторів і донорів водневого зв'язку, відповідно;

nRot – кількість поворотних зв'язків;

TPSA – топологічна полярна площа поверхні.

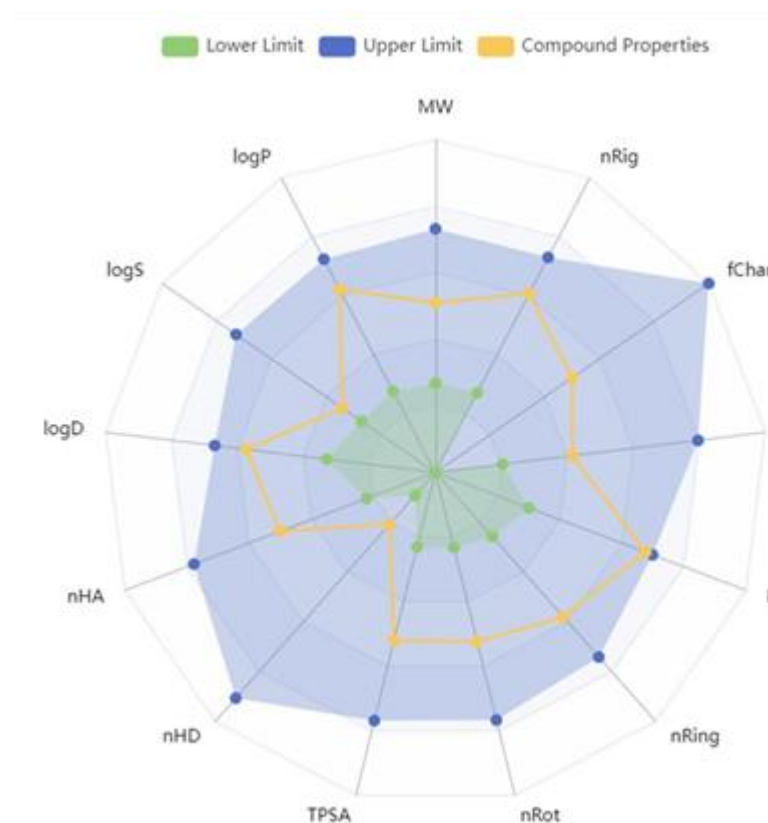


Рис. 3.1. Графічне зображення аналізу фізико-хімічних на прикладі сполуки 7.

Якщо досліджувані сполуки пройшли тест на відповідність до основних фармакологічних правил за фізико-хімічними показниками, далі проводять аналіз їх фармакокінетичних характеристик. На цьому етапі досліджується абсорбція сполук в організмі, розподіл речовини за різними тканинами та органами, здатність організму метаболізувати речовину та як речовина виводиться з організму. Якщо речовина погано всмоктується, виводиться або накопичується у токсичних концентраціях в інших тканинах, вона не може бути якісною лікарською сполукою.

Оцінка фармакокінетичних характеристик (таблиця 3.2) отриманих сполук показала, що сполуки **5**, **7**, **11** з високою ймовірністю здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр (BBB), проте для сполуки **7** таке високе значення є більше негативним, оскільки може вказувати на її токсичність. Усі сполуки з невеликою долею ймовірності здатні абсорбуватися у кишечнику людини. Такі невеликі значення абсорбції можуть мати і позитивний характер, наприклад частина речовини, яка не всмоктується, може діяти локально у кишечнику.

Також для речовини, яка володіє високою біологічною активністю навіть мінімальної кількості буде достатньо для терапевтичного ефекту. Для усіх сполук, були отримані низькі значення кліренсу (CL), тоді як сполука **7** має його помірне значення. За періодом напіввиведення ($T_{1/2}$) речовини **7, 9, 10** відносять до препаратів з коротким періодом напіввиведення та надкоротким у випадку усіх інших сполук.

Таблиця 3.2

Фармакокінетичні параметри сполук **1-11**

Сполука	НІА*	ВВВ*	CL, ml/min/kg	$T_{1/2}$, h
Нормальні показники	НІА+ НІА–	ВВВ+ ВВВ–	>15 - високий 5-15 - середній < 5 - низький	<1 – дуже короткий 1-4 – короткий 4-8 – середній >8 – довгий
1	+(0,006)	+(0,128)	1,14	0,295
2	+(0,006)	+(0,216)	3,294	0,687
3	+(0,017)	+(0,248)	2,485	0,954
4	+(0,014)	+(0,002)	4,731	0,696
5	+(0,003)	+(0,415)	3,447	0,558
6	+(0,002)	+(0,077)	3,271	0,76
7	+(0)	-(0,866)	7,834	3,108
8	+(0,006)	+(0)	3,092	0,978
9	+(0,003)	+(0,011)	0,818	1,356
10	+(0,007)	+(0,11)	3,527	1,327
11	+(0,004)	+(0,396)	3,678	0,991

* Вихідним значенням є ймовірність існування ВВВ, НІА

Дуже швидке виведення з організму більшості сполук може бути як позитивним, так і негативним фактором. Якщо сполука буде викликати побічні дії, її швидке виведення дозволяє швидше припинити небажаний вплив. Також, речовини, що швидко виводяться, мають низький ризик накопичення в організмі. Це важливо при тривалому застосуванні, для того щоб уникнути токсичності. Окрім того, сполуки, які швидко виводяться, підходять для лікування гострих

станів, де потрібна короткочасна дія. Недоліком швидкого виведення є необхідність підтримувати терапевтичний ефект, для якого потрібний частий прийом препарату. Такі сполуки не підходять для лікування захворювань, які потребують постійної підтримки рівня препарату. Також коливання концентрації препарату в крові може призводити до недостатньої ефективності. Негативним фактором є й те, що речовина, яка швидко метаболізується та виводиться може перевантажувати печінку чи нирки, особливо при частому застосуванні.

Отже, з огляду на низькі показники кліренсу та короткий період напіввиведення більшості сполук, їх можна розглядати як перспективні кандидати для терапії гострих станів, коли необхідна швидка, але нетривала дія.

Наступними отриманими даними були параметри токсичності сполук **1-11**. Дані щодо прогнозованої токсичності наведено в таблиці 3.3. Враховувалися такі параметри, як DILI (потенціал пошкодження печінки), AMES (мутагенний потенціал), генотоксичність та CARC (канцерогенний потенціал).

Таблиця 3.3

Параметри токсичності для сполук **1-11**

Compound	DILI	AMES	Genotoxicity	CARC
Normative indicators	0-0,7			
1	0,986	0,082	-	0,228
2	0,988	0,788	0,999	0,593
3	0,990	0,861	0,998	0,662
4	0,950	0,798	0,998	0,679
5	0,954	0,721	1,0	0,481
6	0,992	0,642	1,0	0,525
7	0,966	0,925	0,894	0,706
8	0,995	0,921	0,999	0,522
9	0,998	0,850	0,861	0,703
10	0,974	0,920	0,997	0,748

11	0,993	0,817	0,971	0,857
-----------	-------	-------	-------	-------

Прогноз *in silico* показав, що усі синтезовані речовини мають високу вірогідність бути токсичними для печінки (DILI), що може бути пов'язано з попередньо отриманими даними щодо швидкого метаболізму цих речовин та виведення з організму людини.

Отримані високі показники щодо генотоксичності та мутагенного потенціалу для усіх сполук, окрім **1**. Треба зазначити, що високі значення генотоксичності та мутагенності є характерними для інтеркаляторів ДНК та опосередковано підтверджують здатність сполук зв'язуватись з ДНК. Низькі значення параметру AMES для **1** можуть бути пов'язані з тим, що без замісників молекула може погано розчинятися, що обмежить доступність для зв'язування, а також не мати специфічних взаємодій із канавками ДНК, що знижує стабільність взаємодії сполуки із ДНК.

Високі значення параметру CARC були отримані для сполук **7** та **9-11**. Для усіх інших сполук (найменше значення для **1**) ці значення лежать в нормальному діапазоні. Водночас негативний фактор високої токсичності речовин **7** та **9-11** може спричиняти позитивний ефект у випадку їх застосування для лікування пухлин.

Отже, за результатами аналізу ADMET усі речовини за фізико-хімічними показниками можуть бути віднесені до “drug-like”. Усі сполуки швидко виводяться з організму, що дозволяє розглядати їх як потенційні препарати для лікування гострих станів, де потрібна короткочасна дія. Усі сполуки можуть бути токсичними, що звужує поле їх використання, проте високі значення параметрів AMES та генотоксичності можуть вказувати на інтеркаляцію цих речовин до ДНК.

3.2. Ідентифікація потенційних біологічних мішеней за допомогою бази даних PharmMapper

Наступним кроком розробки лікарських препаратів є визначення потенційних біологічних мішеней для досліджуваних речовин. Пошук мішеней експериментальними методами займає багато часу і є дороговартісним. В той час як комп'ютерне моделювання дозволяє провести віртуальний скринінг сотень мішеней за короткий час, що дозволяє звужити їх коло, і які в подальшому можна детально дослідити за допомогою методів молекулярного докінгу або безпосередньо експериментальним шляхом.

Всі синтезовані речовини було проаналізовано на можливість зв'язуватись з потенційними мішенями за допомогою бази даних PharmMapper [116] – інтегрованим веб-сервером фармакофорів, який заснований на зворотному молекулярному докінгу для ідентифікації потенційних мішеней малих молекул. Як потенційні мішені обиралися насамперед ті, які приймають участь у реплікації та поділі клітин. Програмою визначено близько 300 потенційних цілей для зв'язування. В таблиці 4.4 представлено найкращі мішені для зв'язування за нормалізованим показником відповідності (Z_{ab}). Цей показник поєднує оцінку відповідності та притаманний їй вектор у матриці оцінок і нормалізує їх до вектору із середнім значенням, рівним нулю, та стандартним відхиленням, рівним одиниці. Його розрахунок здійснюється за формулою 3.1:

$$Z_{ab} = \frac{F_{ab} - F_a}{SD_{Fa}}, \quad (3.1)$$

де F_{ab} - вихідна оцінка відповідності ліганда «а» до фармакофорної мішені «b»;
 F_a - середнє значення показників відповідності ліганду «а» до всіх мішеней;
 SD_{Fa} - стандартне відхилення розподілу F_{ab} .

Значення вихідної оцінки (F_{ab}) та нормалізованого показника (Z_{ab}) відповідності синтезованих сполук до деяких фармакофорних мішеней

Сполука	Біологічна мішень	PDB-ідентифікатор	F_{ab}	Z_{ab}
1	Інтерферон-індукована, дволанцюгова РНК-активована протеїнкіназа	1QU6	2,40	0,80
	Рецептор тирозин-протеїнкінази erbB-2	1H83	2,64	0,66
2	Регулятор транскрипції, сімейство IclR	1MKM	3,02	0,76
	Білок 1C40, який контролює поділ клітин	1C40	3,82	0,64
3	Рецептор тирозин-протеїнкінази erbB-2	1H83	3,00	0,75
	Компонент процесивності ДНК-полімерази	1DML	2,94	0,73
	РНК-зв'язуючий білок	2DGR	2,93	0,73
4	РНК-зв'язуючий білок	2DGR	2,98	0,74
	Тирозин-протеїнкіназа	2ECD	2,97	0,74
5	Білок 1C40, який контролює поділ клітин	1C40	3,95	0,66
6	Основний ДНК-зв'язуючий білок	1URJ	3,63	0,73
	Тирозил-тРНК-синтетаза	1TYB	3,00	0,75
	Глюкозамін-фруктозо-6-фосфатамінотрансфераза	2POC	3,55	0,51
7	Інтерферон-індукована, дволанцюгова РНК-активована протеїнкіназа	1QU6	2,50	0,83
	РНК-лігаза	1C68	2,40	0,80
	Протеїнкіназа клітинного поділу	1YKR	2,40	0,80
	ДНК-топоізомераза, 4 субодиниця	2INR	2,46	0,62
8	Рецептор тирозин-протеїнкінази erbB-2	1H83	2,88	0,73
	Регулятор транскрипції, сімейство IclR	1MKM	2,83	0,71
9	Регулятор транскрипції, сімейство IclR	1MKM	3,00	0,74
	ДНК топоізомераза (II тип)	2Q2E	3,00	0,74
	Тирозин-протеїнкіназа	2ECD	3,00	0,74

10	Інтерферон-індукована, дволанцюгова РНК-активована протеїнкіназа	1QU6	2,40	0,80
	білок I, що індукується ушкодженням ДНК	1GHH	2,20	0,73
	Білок-ініціатор хромосомної реплікації ДНК	2E0G	2,93	0,73
11	РНК-зв'язуючий білок	2DGR	2,47	0,82
	Інтерферон-індукована, дволанцюгова РНК-активована протеїнкіназа	1QU6	2,40	0,80

*PDB ідентифікатор - унікальний код, який присвоюється кожному кристалографічно визначеному білку, комплексу або малій молекулі, що зберігається в Protein Data Bank.

За результатами аналізу [127] всі сполуки здатні зв'язуватись з біологічними мішенями, які приймають участь у реплікації та поділі клітин. Окремо можна виділити той факт, що майже всі сполуки з високою ймовірністю можуть бути інгібіторами протеїнкіназ, які каталізують перенесення фосфатної групи від АТФ на амінокислоти у складі білків, що є ключовим механізмом передачі сигналів у клітині, що регулює зростання та поділ клітин. Крім того, сполуки **1, 7, 10, 11** потенційно можуть пригнічувати дію інтерферон-індукованої протеїнкінази, надмірна активність якої призводить до значного запалення та пошкодження тканин. При аналізі мішеней була визначена можливість сполуки **7** пригнічувати дію ДНК-топоізомерази *S. aureus* ([2INR](#)), сполуки **6** пригнічувати дію ферменту *C. albicans* ([2POC](#)), а також сполуки **10** пригнічувати білки, які приймають участь в реплікації ДНК *E. coli* ([1GHH](#), [2E0G](#)).

Отже, аналіз синтезованих речовин показав, що вказані сполуки можуть зв'язуватись з великою кількістю потенційних біологічних цілей, які насамперед беруть участь у реплікації та поділі клітин з досить великим нормалізованим показником відповідності, а отже, з великим ступенем вірогідності можуть бути інтеркаляторами ДНК. В свою чергу, наявність у сполуки здатності до інтеркаляції є достатньою умовою для очікування у неї противірусної та інтерфероніндукуючої активності.

3.3. Молекулярний докінг

З отриманих даних бази даних PharmMapper не можливо остаточно зробити висновки щодо механізму дії досліджуваних сполук на біологічну мішень. Наприклад, вона може пригнічувати дію ферменту тому, що може зв'язувати його активний центр, а може блокувати його сайт зв'язування безпосередньо у ДНК. Первинну оцінку принципової можливості амідів **2-11** взаємодіяти ДНК шляхом інтеркаляції вирішено провести за допомогою молекулярного докінгу.

Для того щоб перевірка інтеркаляції була достовірною, бажано брати вже існуючий комплекс сполука-ДНК, дані якого є в PDB (<https://www.rcsb.org/>). У якості такої еталонної сполуки-інтеркалятора була обрана молекула профлавіну (див. рис. 1.29), механізм її інтеркаляції до ДНК вже підтверджений в літературі, внаслідок чого відомо про його сильні антибактеріальні, протигрибкові, протипаразитарні, противірусні властивості. Профлавін використовується у розвинених країнах в різних формах як антимікробний засіб [117].

Моделювання взаємодії сполук **1 – 11** із ДНК проводили ще до їх синтезу – на стадії планування. Вибір саме цього комплексу профлавіну з дволанцюговим гексануклеотидом 5'-D(CGATCG)-3' (3ft6) обумовлений високою якістю моделі (висока роздільна здатність – 1.12 Å), низьким відсотком оутлаєрів (окремі результати, які значно відрізняються від основної маси даних) або їх відсутністю за найважливішими параметрами (довжини зв'язків, торсіонні кути, перекриття атомів) та низьким значенням RMSE (середньоквадратична похибка) для координат атомів (розрахункова модель/координати з рентгенограми). Для перевірки точності докінгу необхідно виконати процедуру ре-докінгу, як для досліджуваних сполук, так і для молекули профлавіну, для того щоб перевірити чи здатний алгоритм відтворити експериментальну (профлавін) чи розраховану (досліджувана сполука) позу ліганду. Ця процедура була проведена із задовільними результатами.

Для прикладу на рис. 3.2. наведено результати докінгу сполуки **7**.

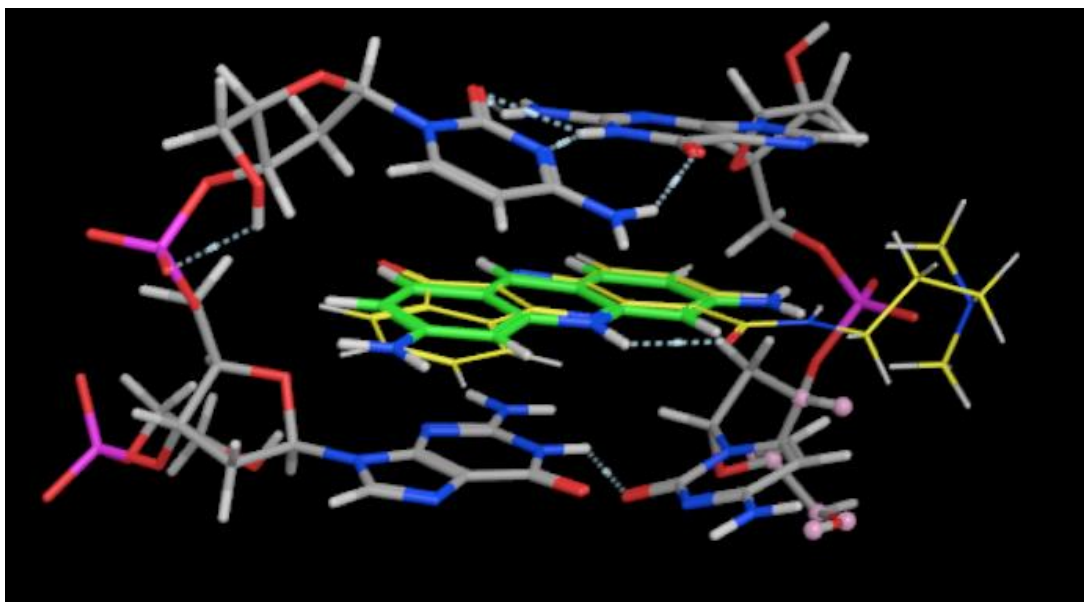


Рис. 3.2. Розташування сполуки **7** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)

З даних молекулярного докінгу випливає, що всі сполуки можуть утворювати комплекси включення із двоспіральними полінуклеотидами, розміщуючись в кармані зв'язування аналогічно профлавіну. При цьому, як і у випадку з останнім, довга вісь ліганду паралельна (чи близька до паралельності) довгій вісі пари основ. Виключення становлять сполуки **8** та **9**, ароматичні замісники яких вносять свій вклад в π - π -стекінг взаємодію, розміщуючись між парами основ ДНК, і тим самим повертають інденохіноксалиновий каркас (рис. 3.3).

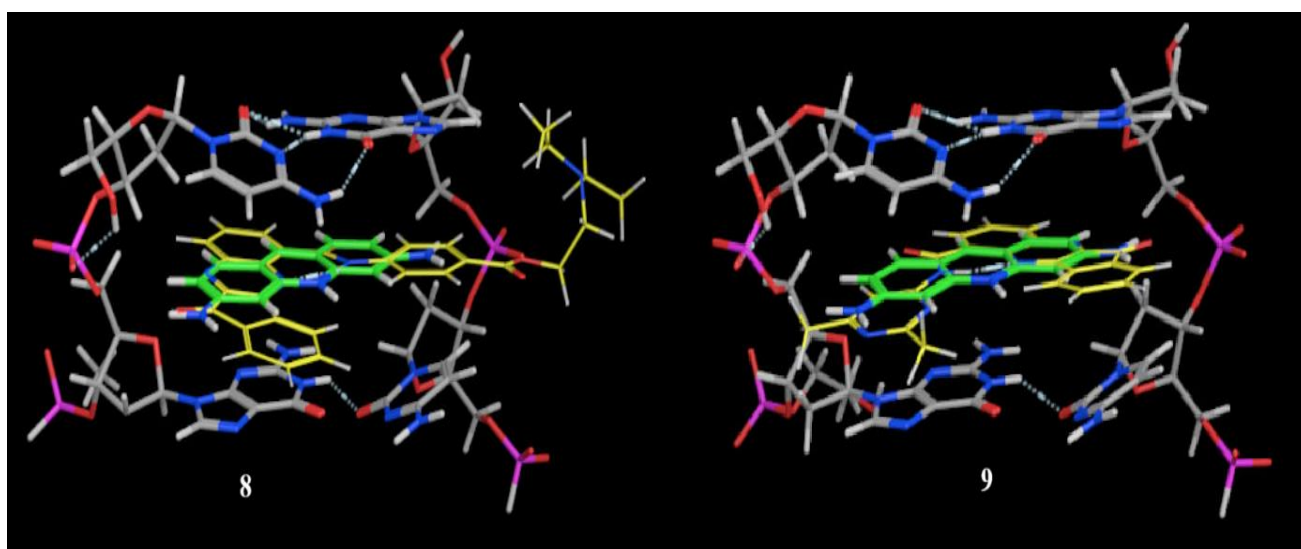


Рис. 3.3. Розташування сполук **8** та **9** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)

Замісники в положенні 6 інденохіноксалинової системи майже для всіх сполук спрямовано у великий жолоб, і тільки замісник сполуки **5** – у малий жолоб (рис. 3.4).

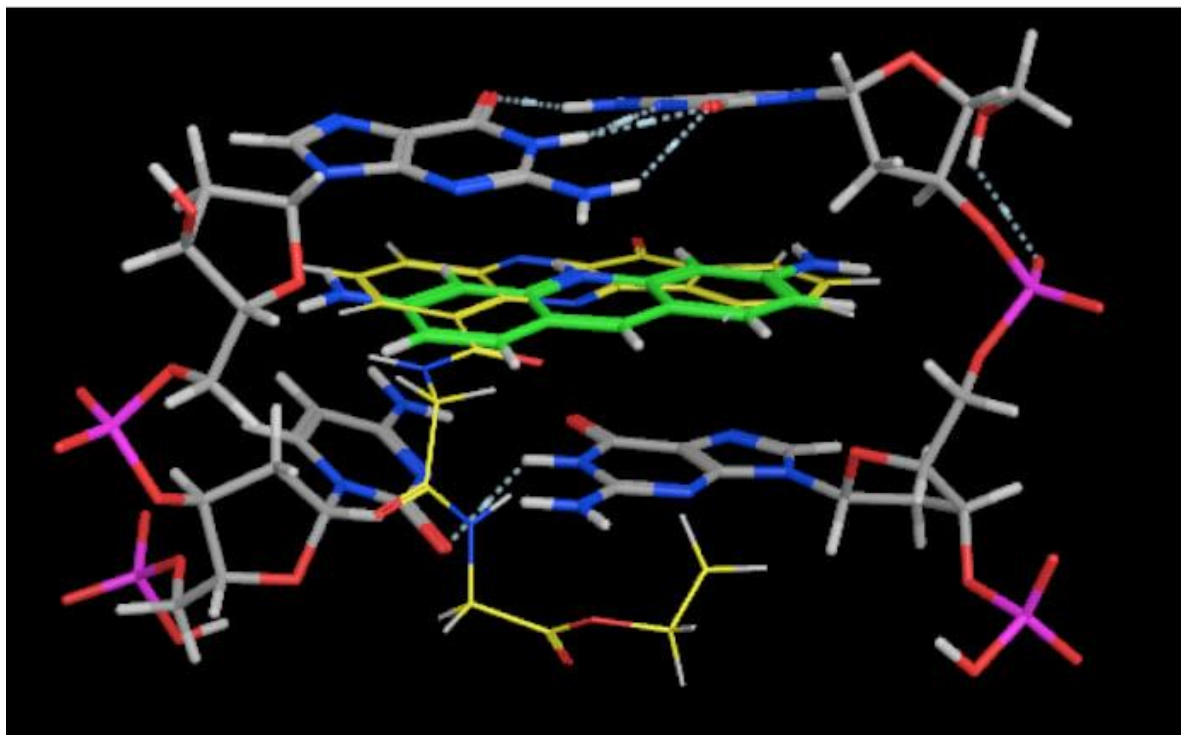


Рис. 3.4. Розташування сполуки **5** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)

Разом з візуалізацією результатів програма визначає скорінг функцію (SF) та її середньоквадратичну похибку (RMSE). Основне призначення SF – передбачити енергію зв'язування (ккал/моль) або відносну афінність зв'язування ліганду з мішенню. Чим нижчим є значення SF, тим сильніше зв'язується той чи інший ліганд з ДНК. Стикування вважається допустимим, якщо значення $RMSE < 2$. Значення SF та RMSE сполук **1-11** наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Отриманні значення SF та RMSE за результатами молекулярного докінгу

Сполука	SF, ккал/моль	RMSE
1	-6,65	1,85
2	-7,67	0,94
3	-7,47	1,28
4	-7,33	1,46
5	-8,13	1,51
6	-7,64	1,61
7	-7,32	1,51
8	-7,90	1,36
9	-7,50	1,33
10	-7,18	1,07
11	-7,08	0,78

З таблиці 3.5 видно, що вихідна сполука – 11Н-оксоінденохіноксалін-6-карбонова кислота **1** значно поступається за виграшем в енергії зв'язування з ДНК амідним похідним **2-11**, що робить доцільним подальший їх синтез та експериментальне дослідження.

Візуалізацію молекулярного докінгу сполук **1-4, 6, 10, 11** наведено на рисунках 1-3 додатку В.

Висновки до розділу 3

1. Показано, що всі речовини за фізико-хімічними показниками відповідають правилу Ліпінського, а отже можуть бути віднесені до “drug-like”.
2. З’ясовано, що всі сполуки мають значну токсичність, проте швидко виводяться з організму, що дозволяє розглядати їх як потенційні препарати для лікування гострих станів, де потрібна короткочасна дія.
3. Серед потенційних біологічних мішеней, визначених програмою PharmMapper переважають ті, що відповідальні за поділ та реплікацію клітин, що вказує на можливість прояву амідних сполук протизапальних, протипухлинних та протиінфекційних властивостей.
4. Знайдено, що сполуки **6**, **7** та **10** потенційно можуть пригнічувати білки та ферменти, які приймають участь у реплікації ДНК патогенних мікроорганізмів *S. aureus*, *C. albicans* та *E.coli*, що робить доцільним подальше експериментальне дослідження їх антибактеріальних та антифунгальних властивостей.
5. За результатами молекулярного докінгу виявлено, що всі сполуки можуть утворювати комплекси включення із двоспиральними полінуклеотидами. Сполука **1** значно поступається своїм амідним похідним вирашем в енергії зв’язування із ДНК, що робить доцільним їх подальший синтез та дослідження.

РОЗДІЛ 4. СИНТЕЗ ТА КИСЛОТНО-ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІДНИХ ПОХІДНИХ 11-ОКСОІНДЕНО-[1,2-*b*]ІНДЕНОХІНОКСАЛІН- 6-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

Як було показано у розділі 1, інденохіноксалиновий каркас слугує основою для синтезу багатьох похідних, що проявляють біологічну активність і потенційно можуть бути основою для створення лікарських препаратів. У той же час будова і довжина лінкерного фрагменту, зв'язаного з фармакофорним циклом, відіграє значну роль і може суттєво підвищувати афінітет до ДНК.

В нашій попередній роботі [22] був синтезований ряд метиламінних похідних в шостому положенні ІQ-ону (рис.4.1). Третинна аміногрупа була представлена замісниками: 4-метилпіперазин-1-іл (а), морфолін-4-іл (b), 4-метилпіперазин-1-іл (с), піперідин-1-іл (d), діетиламіно- (е), азепам-1-іл (f), 2-метилпіперідин-1-іл (g).

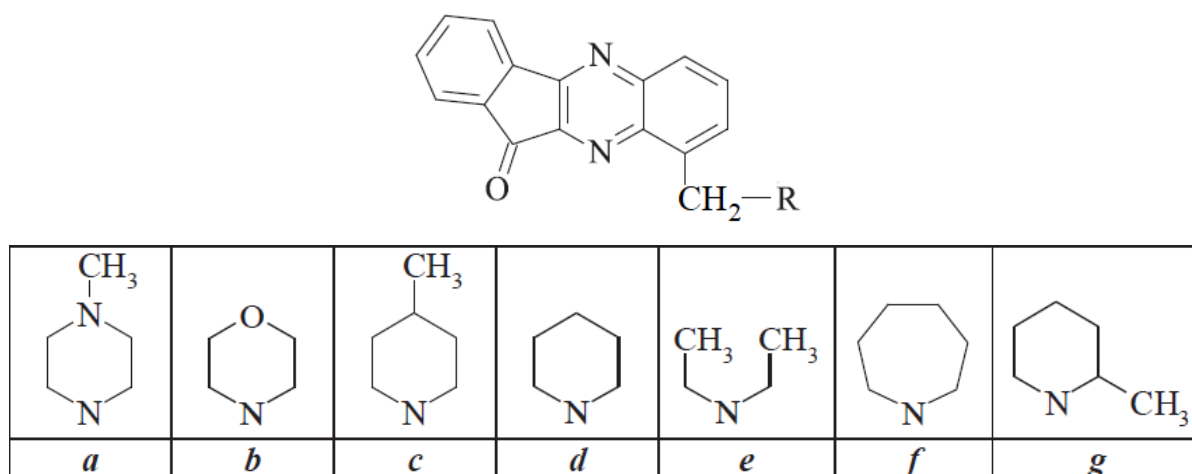


Рис. 4.1. Сполуки, що досліджувались в роботі [22]

Результати досліджень афінітету показали, що ці сполуки за своєю афіністю є близькими до відомого лікарського препарату – аміксину.

Представлена робота є продовженням цих досліджень, але амінін фрагменти була вирішено вводити до складу амідних груп. Як було зазначено в розділі 1, в літературних джерелах переважно ми знайшли дані відносно введення карбоксамідного зв'язку в різні положення хінолінового та хінолонового каркасів [37, 80, 81]. Натомість інформація щодо досліджень

впливу амідних лінкерних фрагментів на біологічну активність сполук інденохіноксалінового ряду практично відсутня. Лише в одній роботі вчених з Тайваню [36] серед ряду інших сполук вивчались деякі інденохіноксалінові похідні з амідним бічним ланцюгом у вигляді N-заміщених оксимів. У висновках роботи автори зазначають, що сполука 11-{[3-диметиламіно)пропокси]іміно}-N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11H-індено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоксамід (Рис. 4.2) мала найкращу інгібіторну активність проти *topo I* та *topo II* і була активною проти росту деяких ракових клітин.

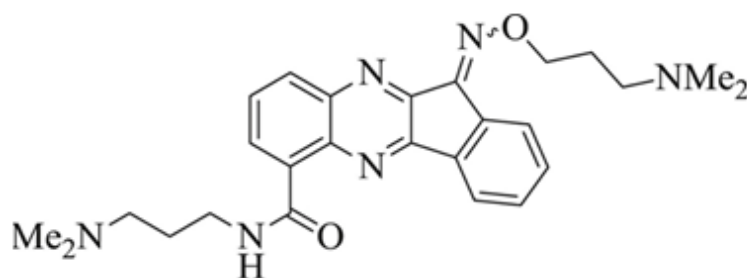


Рис. 4.2. 11-{[3-диметиламіно)пропокси]іміно}-N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11H-індено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоксамід

Отже, з урахуванням вищевикладеного, а також даних, отриманих *in silico* дослідженнями, інденохіноксалінові сполуки з амідними бічними ланцюгами видаються привабливими об'єктами, як з точки зору синтезу, так і подальших досліджень їх афінитету до ДНК, а також проявів різного роду біологічної активності.

4.1. Синтез 11-оксоіндено[1,2-b]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти

Відправною точкою в цьому дослідженні був синтез інденохіноксалінового каркасу з подальшим додаванням лінкерного ланцюга. За основу було обрано 11-оксоіндено[1,2-b]інденохіноксалін-6-карбонову кислоту.

Як слідує з аналізу літератури, найбільш поширеним і зручним методом є конденсація *o*-фенілендіамінів з нінгідрином (1:1) у розведеній оцтовій кислоті через м'які умови та добрі виходи. Проте реакція може ускладнюватися наявністю регіоізомерів, якщо в бензеновому циклі діаміну є інші замісники.

Дослідження інших авторів [23, 24] показали, що наявність замісника у 3-му положенні по відношенню до аміногруп приводить до утворення лише одного кінцевого продукту, у якого замісник опиняється в положенні 6 інденохіноксалинового циклу. Результати цих робіт детально проаналізовано в літературному огляді (див. розділ 1.1). Проте зауважимо, що цей висновок в жодному джерелі не узагальнений, як спосіб синтезу, що дозволяє запобігти утворенню ізомерів.

На підставі аналізу літературних джерел ми припустили, що цей спосіб може бути універсальним для будь-яких 6-заміщених інденохіноксалинових сполук. Тому для перевірки цієї гіпотези і накопичення додаткових даних, які б підтвердили це припущення, синтез 11-оксоіндено[1,2-b]інденохіноксалин-6-карбонової кислоти було вирішено здійснювати не шляхом окиснення 6-метильної похідної, як це описано в роботі [23], а конденсацію нінгідрину з 2,3-діамінобензойною кислотою. Нінгідрин є комерційно доступною сполукою, тоді як 2,3-діамінобензойну кислоту було одержано тристадійним синтезом, виходячи з ангідриду 2-нітрофталевої кислоти (рис. 3.3).

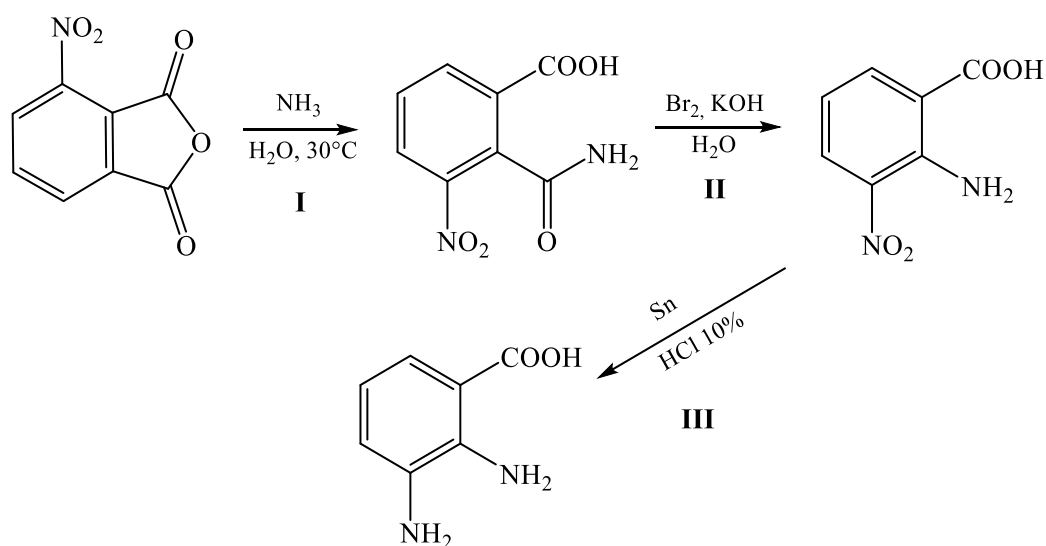


Рис. 4.3. Схема синтезу 2,3-діамінобензойної кислоти

На першій стадії ангідрид 2-нітрофталевої кислоти обробляли концентрованим розчином амоніаку з утворенням 2-карбамоїл-3-нітробензойної кислоти з виходом 80% [100]. Для здійснення подальших стадій за основу було взято методику з роботи [100]. 2-Карбамоїл-3-нітробензойну кислоту піддавали

перегрупуванню Гофмана дією бромів та калію гідроксиду, при цьому отримували 2-аміно-3-нітробензойну кислоту (стадія II, рис. 4.3). На заключній, третій стадії, остання була відновлена воднем, згенерованим із системи Sn + 10 % HCl за кімнатної температури. При цьому отримали 2,3-діамінобензойну кислоту з виходом 67 %. Ідентифікацію та чистоту продукту підтверджували вимірюваннями температури плавлення, яка відповідала літературному значенню.

На наступному етапі отриману 2,3-діамінобензойну кислоту піддавали реакції циклоконденсації з нінгідрином в оцтовій кислоті за класичною схемою синтезу інденохіноксалінових сполук (рис. 4.4):

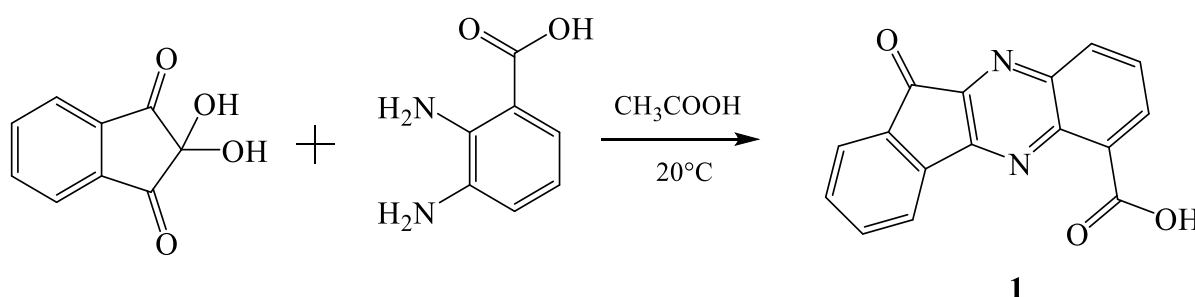


Рис. 4.4. Схема синтезу 11-оксоіндено[1,2-б]хіноксалін-6-карбонової кислоти

В результаті реакції було виділено продукт, який дослідили методом хромато-мас-спектрометрії. На хроматограмі він проявлявся у вигляді лише одного піку (рис.4.5 А), а сигнал його молекулярного йону відповідав $[M^+] = 275 \text{ m/z}$ (рис.4.5 Б), що дійсно підтвердило утворення лише одного ізомеру. Виділений продукт було ідентифіковано як 11-оксоіндено[1,2-б]хіноксалін-6-карбонову кислоту (сполука **1**, рис.4.4), на підставі аналізу ^1H ЯМР-спектру (рис. 4.6) та його повної ідентичності відповідному ізомеру, який в роботі [23] отримували альтернативним шляхом – окисненням 6-метил-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-ону CrO_3 в конц. сульфатній кислоті. Подібною була і визначена температура плавлення.

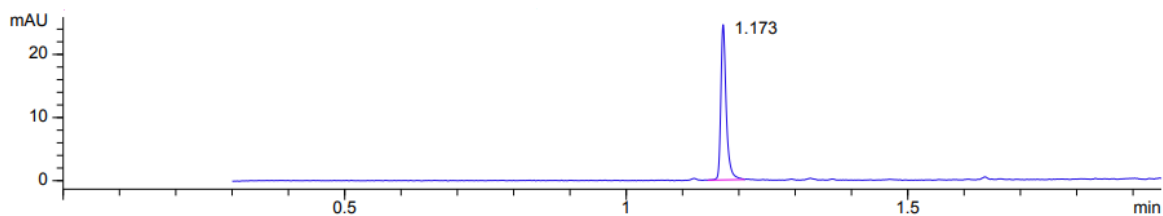
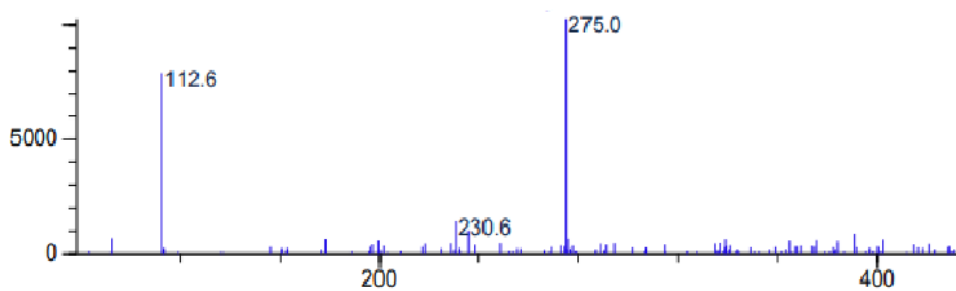
**A****Б**

Рис. 4.5. Хроматограма (А) та мас-спектр (Б)
11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти

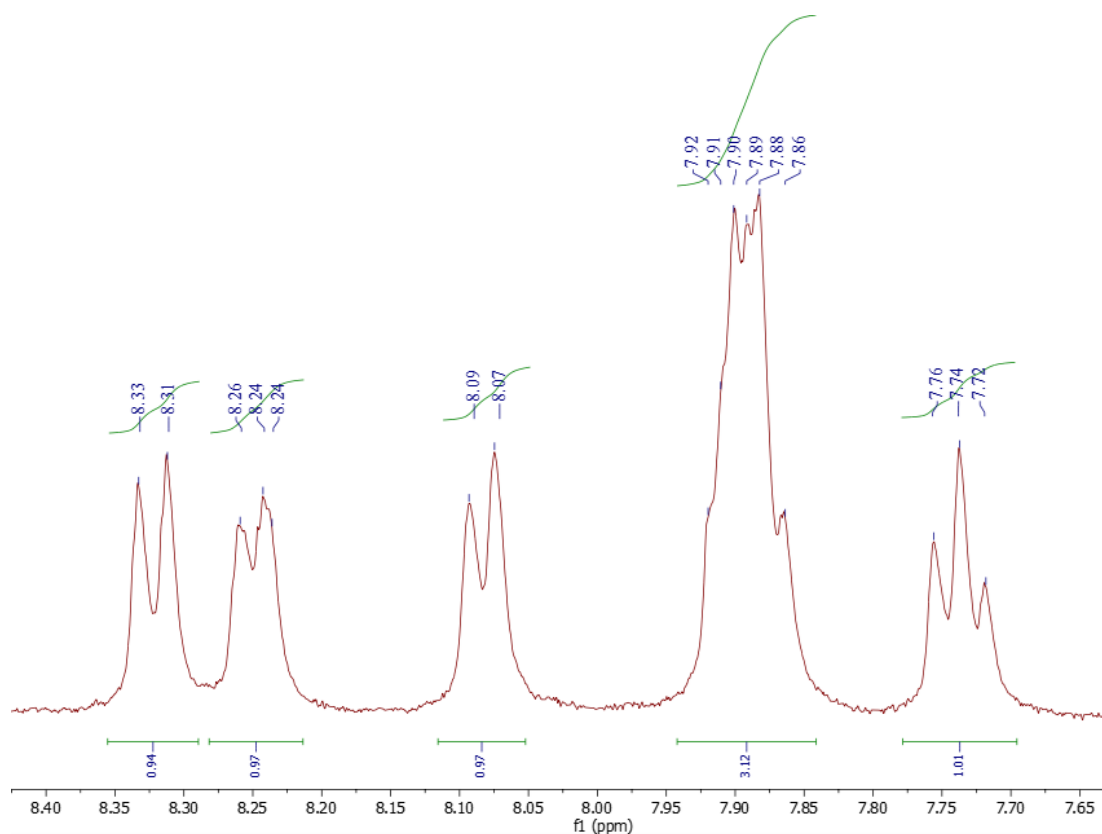


Рис. 4.6. ^1H ЯМР спектр 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбонової
кислоти. Розчинник – DMSO.

Таким чином, в результаті циклоконденсації 2,3-діамінобензойної кислоти з нінгідрином було отримано лише один регіоізомер – інденохіноксалінкарбонову кислоту з карбоксильною групою у 6-положенні. Це підтверджує висновок інших авторів про наявність *орто*-ефекту замісника у 3-му положенні в діамінах незалежно від його природи, який приводить до регіоселективності з утворенням лише одної сполуки із відповідним замісником в 6-положенні IQ-циклу. Тому цей прийом можна вважати універсальним для цілеспрямованого синтезу 6-заміщених IQ-онів.

Зауважимо, що зазначений принцип працює виключно за умови відсутності інших замісників в бензеновому кільці *о*-фенілендіамінів. Окрім того, варто зазначити, що непрямим доказом цього твердження є відсутність в літературних джерелах інформації щодо іншого ізомеру – 11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-9-карбонової кислоти, як і інших 9-монозаміщених похідних IQ-ону.

4.2. Синтез амідних похідних 11-оксоіндено[1,2-*b*]інденохіноксалін-6-карбонової кислоти

Для покращення біодоступності інденохіноксалінової кислоти вважалося доцільним сполучити її з амінокислотами, які є не токсичними, легко метаболізуються та являють собою споріднені до біологічних об'єктів фрагменти в організмі людини. Тому однією із задач роботи був синтез похідних інденохіноксалінових кислот, що містять амінокислотні залишки.

Загально відомо, що при утворенні пептидного зв'язку, аби запобігти побічним реакціям, в яких приймає участь карбоксильна група (утворення гомопептидів або змішаних ангідридів) необхідно її захистити реакцією естерифікації. Тому першою стадією був синтез метилового або етилового естерів амінокислот: гліцину, β -аланіну, дигліцину та β -феніл- α -аланіну.

Естери у формі гідрохлоридів були синтезовані шляхом реакції вказаних амінокислот з метанолом або етанолом за кімнатної температури в присутності

триметилхлорсилану відповідно до методики [102] з високими виходами (рис. 4.7, R₁ та R₂ наведено в таблиці 4.1.).

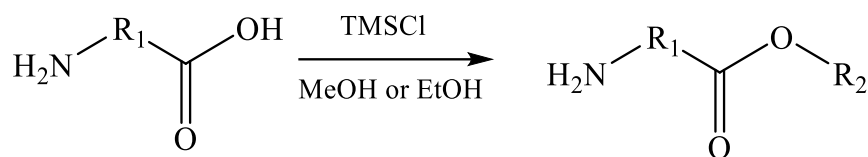


Рис. 4.7. Схема синтезу естерів амінокислот.

Таблиця 4.1

Виходи та температури плавлення гідрохлоридів естерів амінокислот

Назва естеру	R ₁	R ₂	Вихід, %	T _{пл} , °C
етил 2-аміноацетат	–CH ₂ –	–Et	96	145-148
метил 2-аміноацетат	–CH ₂ –	–Me	95	175-176
метил 3-амінопропаноат	–CH ₂ –CH ₂ –	–Me	89	102-104
етил 2-[(2-аміноацетил)аміно]ацетат	–CH ₂ –C(O)NH–CH ₂ –	–Et	92	183-184
метил 2-аміно-3-фенілпропаноат	–CH(CH ₃)–CH ₂ –Ph	–Me	95	158-160

Як відомо, утворення амідного зв'язку має супроводжуватися стадією активації карбоксильної групи, яка може здійснюватися різними способами [118]. Огляд літератури щодо синтезу амідних похідних саме з інденохіноксаліновим каркасом, засвідчив, що серед тих нечисленних випадків, де згадуються подібні об'єкти, найчастіше автори користуються методикою, де як активатор застосовують CDI. В розділі 1, було зазначено, що ця методика є доволі трудомісткою (двостадійний синтез з вилученням та очисткою проміжного карбонілімідазольного інтермедіату), та й сам активатор є відносно недешевим реагентом. Методика, яка б ефективно сполучала інденохіноксалінкарбонові кислоти з естерами амінокислот, в літературі відсутня і для цих об'єктів не визначено, який спосіб активації карбоксильної групи є найбільш ефективним. У зв'язку з цим, перед нами стояла задача підібрати спосіб амідкування, який був би максимально зручним: простим в

препаративному оформленні, дешевим в економічному сенсі та забезпечував би добрі виходи цільових продуктів.

Дициклогексилкарбодіімід (DCC), як і CDI є також одним з широко вживаних зв'язуючих агентів для утворення пептидних зв'язків. Амідний зв'язок утворюється через активний проміжний продукт – ацилізосечовину. Зазвичай він енергійно реагує з нуклеофілами, такими як аміни, з утворенням амідного зв'язку. Типова методика полягає у додаванні реагенту (1,1 екв.) до концентрованого (0,1-1,0 М) розчину карбонової кислоти (1 екв.), аміну (1 екв.) і каталізатора в хлористому метилені або ацетонітрилі при 0 °С. У ході реакції утворюється осад дициклогексилсечовини (продукту гідратації DCC) [119].

Спроби застосувати цей реагент для нашої системи приводили до утворення цільових продуктів з дуже низькими виходами – 5-10 %, а основним (>90%) продуктом даної реакції виявилась інденохіноксалінова ацил-заміщена дициклогексилсечовина (рис. 4.8), що було показано, шляхом визначення її молекулярної маси методом мас-спектрометрії (рис. 4.9).

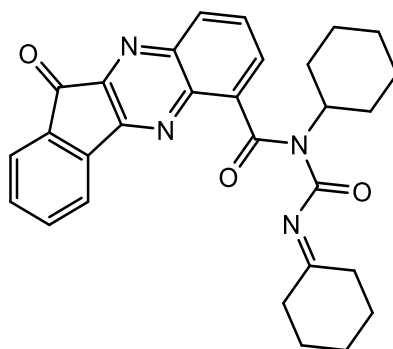


Рис. 4.8. N-циклогексил-N-(циклогексиліденкарбамоїл)-11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоксамід, отриманий в синтезі з DCC

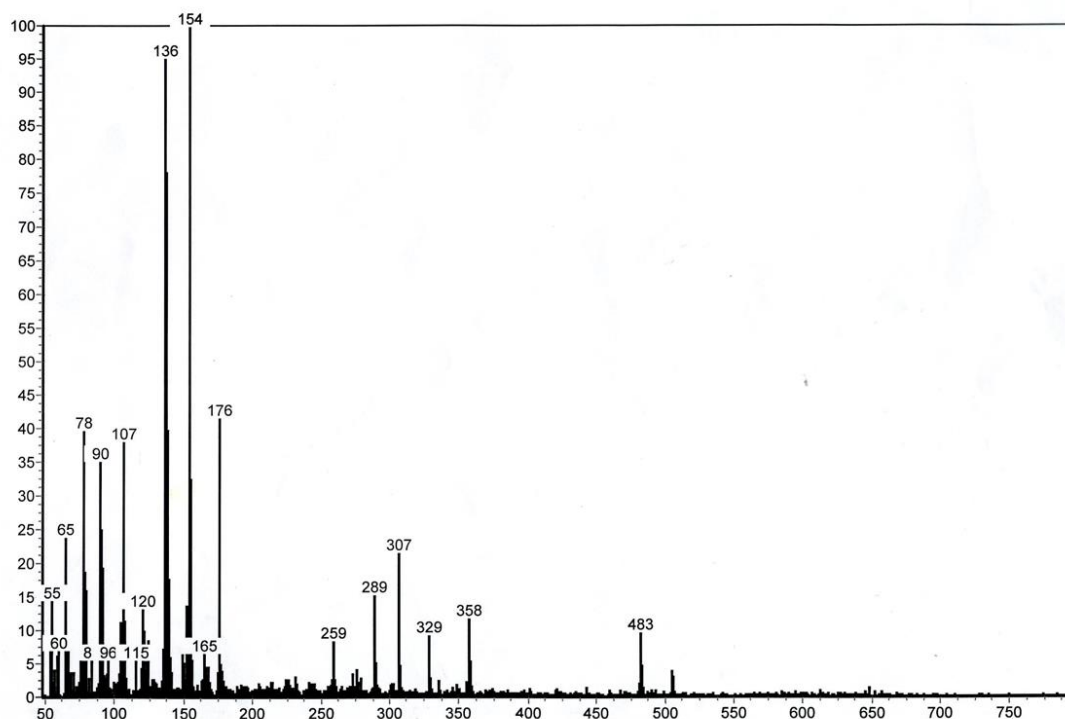


Рис. 4.9. Мас-спектр N-циклогексил-N-(циклогексиліденкарбамоїл)-11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоксаміду

Отже, активація DCC виявилась неефективною у випадку амідування інденохіноксалінової кислоти.

На наступному етапі здійснили спробу активувати карбоксильну групу інденохіноксалінової кислоти шляхом перетворення її на хлорангідрид. Обробка естерів амінокислот хлорангідридом інденохіноксалінкарбонової кислоти також виявилась неефективною, бо взагалі практично не приводила до утворення цільових продуктів. Багаточисельні спроби додавання третинного аміну до суміші гідрохлориду естеру амінокислоти та хлорангідриду інденохіноксалінкарбонової кислоти приводили до осмолення реакційної маси, що вірогідно пов'язано з руйнуванням гетероциклічної системи.

Ще одним загальновідомим методом, який використовується для утворення пептидних зв'язків є метод змішаних ангідридів [120]. Активація карбоксильної групи здійснюється через обробку вихідної карбонової кислоти естером іншої галогенозаміщеної кислоти, при цьому як проміжний продукт утворюється змішаний ангідрид, до якого в подальшому додають амін.

В роботі [121] групою японських вчених було здійснено амідування ряду ненасичених та ароматичних кислот із використанням методу змішаного ангідриду. Для цього розчиняли відповідну кислоту, етиловий естер монохлорвугільної кислоти та Et_3N у мольному співвідношенні 1:1,4:3 в ТГФ та перемішували 30 хв при 0°C , потім додавали джерело амоніаку (водн. розчин амоній гідроксиду або хлориду) і підтримуючи температуру постійною перемішували ще 30 хв. При цьому утворювались первинні амідні з високими виходами.

Цю методику було випробувано стосовно наших вихідних реагентів, додаючи на другому етапі гідрохлориди естерів амінокислот. Як розчинник було використано хлороформ. Виявилось, що ця методика чудово працює для амідування інденохіноксалінкарбонових кислот. В результаті ми отримали п'ять раніше не описаних в літературі продуктів **2-6** (рис. 4.10, табл. 4.2), що містили амідні лінкерні ланцюги у вигляді амінокислотних фрагментів з виходами 40-60%. [122-124].

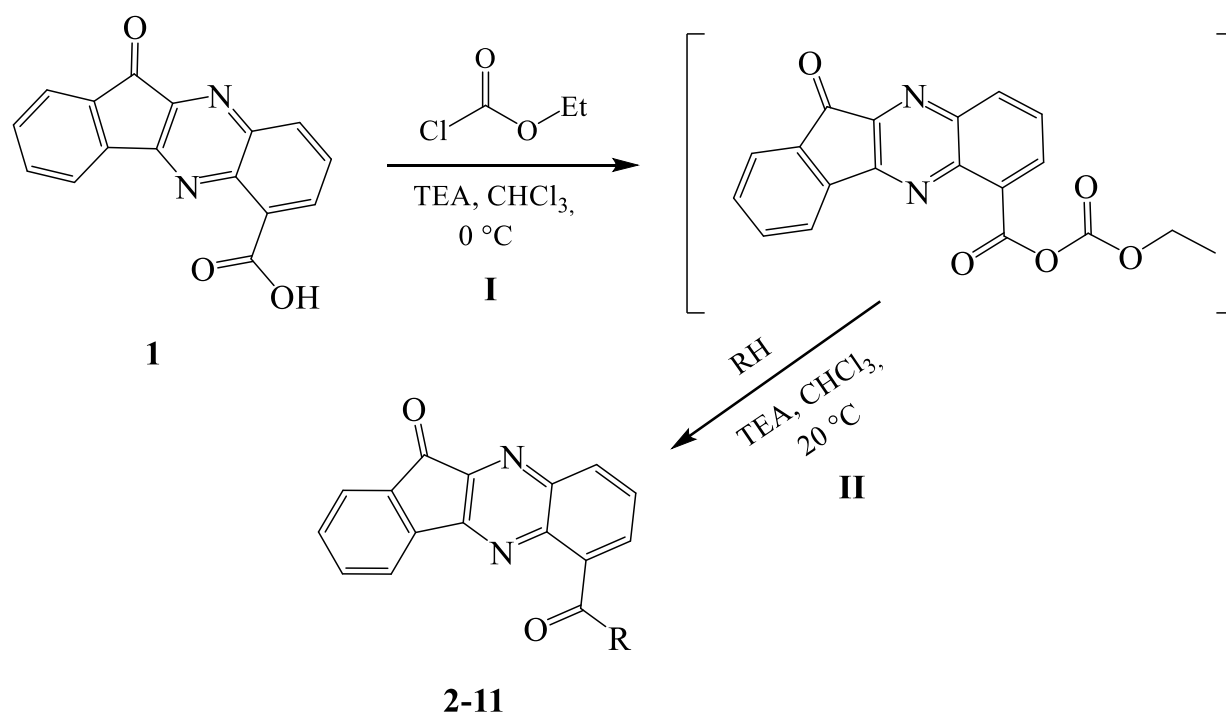


Рис. 4.10. Схема синтезу карбоксамідів на основі інденохіноксалін-6-карбонової кислоти. R наведено в таблиці 4.2.

Карбоксаміди на основі інденохіноксалін-6-карбонової кислоти

№	R	Назва IUPAC	Вихід, %
2		Етил 2-[(11-оксоіндено[1,2- b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат	60
3		Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2- b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат	47
4		Метил 3-[(11-оксоіндено[1,2- b]хіноксалін-6- карбоніл)аміно]пропаноат	42
5		Етил 2-[[2-[(11-оксоіндено[2,1- b]хіноксалін-6- карбоніл)аміно]ацетил]аміно]-ацетат	55
6		Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2- b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3- фенілпропаноат	40
7		N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11- оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6- карбоксамід	79
8		2-(Діетиламіно)етил-4-[(11- оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6- карбоніл)аміно]бензоат	75
9		N-(2,6-диметилпіримідин-4-іл)-11- оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6- карбоксамід	70
10		N-(2-гідроксіетил)-11-оксо-індено[2,1- b]хіноксалін-6-карбоксамід	57
11		6-(морфолін-4-карбоніл)індено[1,2- b]хіноксалін-11-он	63

Як було зазначено в огляді літератури, будова і довжина лінкерного фрагменту, зв'язаного з фармакофорним циклом, відіграє значну роль і може суттєво підвищувати афіність до ДНК. Наприклад, протоновані третинні аміногрупи, які входять до складу лінкерного фрагменту, забезпечують додаткову взаємодію із дном малого жолобу за рахунок негативно заряджених фрагментів фосфату, що додатково стабілізує інтеркаляцію [69]. Тому наступним етапом роботи був синтез похідних інденохіноксалинових кислот, що містять залишки амінів та аміноспиртів, які можуть додатково стабілізувати зв'язок сполук із ДНК за рахунок водневих зв'язків.

Одним із перспективних замісників є N,N-диметилпропан-1,3-діамін, оскільки в літературі вже описана подібна сполука із цим замісником, яка показала високі дані щодо біологічної активності [36]. Проте, вищевказаний амін входив до структури інденохіноксалинового фармакофору двічі: до амідної та оксимної групи одночасно (див. рис. 4.2). Монозаміщений (амін входив лише до амідної групи) N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалин-6-карбоксамід описаний в цій роботі у вигляді гідрохлориду. Ми вважали за доцільне синтезувати цю сполуку за методикою змішаного ангідриду для подальших досліджень.

Окрім цього для сполучення з інденохіноксалин-6-карбоною кислотою було обрано новокаїн, який також містить в своїй структурі третинну аміногрупу та володіє добрими анагетичними властивостями, а також морфолін та 6-диметилпіримідин-4-амін, оскільки вони добре себе зарекомендували як фармакофорні групи [125, 126]. Аміноетанол було обрано для введення короткого лінкерного фрагменту, який потенційно може стабілізувати зв'язок із ДНК за рахунок водневих зв'язків гідроксильної групи.

Отже, подальші експерименти показали, що методика змішаного ангідриду з використанням етилового естеру монохлорвугільної кислоти як активатора карбоксильної групи чудово спрацьовує і у випадку застосування вищезазначених аміновмісних сполук. Таким чином, було отримано ще 6 нових

амідів із застосуванням амінокомпоненти у вигляді: амінів (сполуки **7-9**) [127, 128], аміноетанола (**10**) та морфоліну (**11**) [129].

Всі синтезовані сполуки представляють собою жовті кристалічні порошки, більшість з них погано розчиняються в бензолі та хлороформі, малорозчинні в MeOH та EtOH (окрім сполук **6, 9**), у воді їх можна розчинити лише при легкому підкисленні розчину. Їх очищення здійснювалось методом препаративної колонкової хроматографії. Виключення становили сполуки (**5, 8**), які було очищено перекристалізацією із суміші хлороформ-етанол (1:5) та ізопропілового спирту відповідно. Виходи кінцевих продуктів з амінами та аміноспиртами складала 57-79 %, а сама методика добре відтворювалась, що вочевидь вказує на універсальність даного підходу до синтезу амідів з інденохіноксалінкарбонових кислот.

Вище зазначалось, що в літературі описано отримання амідних похідних інденохіноксалінових кислот іншим способом, де активація карбонової кислоти здійснюється CDI. Автори [36] реакцією індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-он-6-карбонової кислоти з CDI спочатку отримували проміжну сполуку – похідну імідазолу, яку для отримання амінопохідних змішували на другій стадії з різними амінами (див. рис. 1.19). Проте метод активації карбоксильної групи етиловим естером монохлорвугільної кислоти є більш зручним, оскільки він проходить в одну стадію, без відокремлення інтермедіатної сполуки, на відміну від CDI-метода, де проміжну сполуку окремо виділяють із реакційної маси, очищують і лише потім здійснюють за її участі другу стадію.

4.3. Дослідження протолітичних властивостей амідів – визначення константи іонізації

Велике значення для параметрів зв'язування інтеркалятора з ДНК мають електростатичні взаємодії між негативно зарядженим фосфатними групами ДНК і позитивно зарядженими групами інтеркалятора, які вносять важливий внесок в стабілізацію комплексу інтеркалятор-ДНК. Носієм позитивного заряду в молекулах інтеркалятора часто є бічні ланцюги основного характеру, як було

показано на прикладі препарату аміксин (діюча речовина – тіролон) [130]. Тому константа іонізації лінкерних груп є важливим параметром, який впливає на можливість інтеркаляції. Окрім цього, кислотність рідин всередині організму людини в нормі збігається з кислотністю крові і знаходиться в межах від 7,35 до 7,45 рН, а отже бажано щоб синтезовані сполуки були здатні протонуватися у цьому діапазоні.

Сполуки **2-6** не містять аміногруп і є «чистими» амідами, а оскільки амідні набагато менш схильні до протонування за нейтральних рН, адже їх протонування відбувається у доволі кислому середовищі. Тому кислотно-основні властивості сполук **2-6** не вивчалися. З цієї ж причини було недоцільним досліджувати pK_{BH^+} сполуки **1**, яка є органічною кислотою, а її константа кислотності буде близькою до звичайних ароматичних кислот.

У випадку амідів **7-11** протонуванню буде піддаватися третинна аміногрупа (сполуки **7, 8**) або піримідиновий цикл (в сполуці **9**), які входять до складу бічних ланцюгів. У морфоліновому фрагменті сполуки **10** та аміноетанольному сполуки **11** до того ж має місце негативний індуктивний ефект атому Оксигену в циклі або гідроксигрупі, відповідно, що має полегшити протонування атому Нітрогену і збільшити кислотність.

Визначення констант іонізації здійснювали методом спектрофотометрії. Зміни, які спостерігаються в спектрах світлопоглинання розчинів сполук **7-11** в цілому є подібними, тому як приклад на рис. 4.11 наведено спектр для сполуки **7**. Значення констант іонізації (pK_{BH^+}) було розраховано з даних електронних спектрів поглинання, які обробляли за допомогою спеціальної комп'ютерної програми [103]. Розраховані pK_{BH^+} для сполук **7-11** становили, відповідно: $7,07 \pm 0,03$, $5,52 \pm 0,01$, $1,46 \pm 0,01$, $6,44 \pm 0,00$, $7,13 \pm 0,01$. З отриманих значень можна бачити, що сполуки **7-11** є слабкими основами. Їх основність зменшується у ряду **11** > **7** > **10** > **8** > **9**, що відповідає загальним уявленням щодо взаємозв'язку основних властивостей відповідних вихідних амінів їх будові.

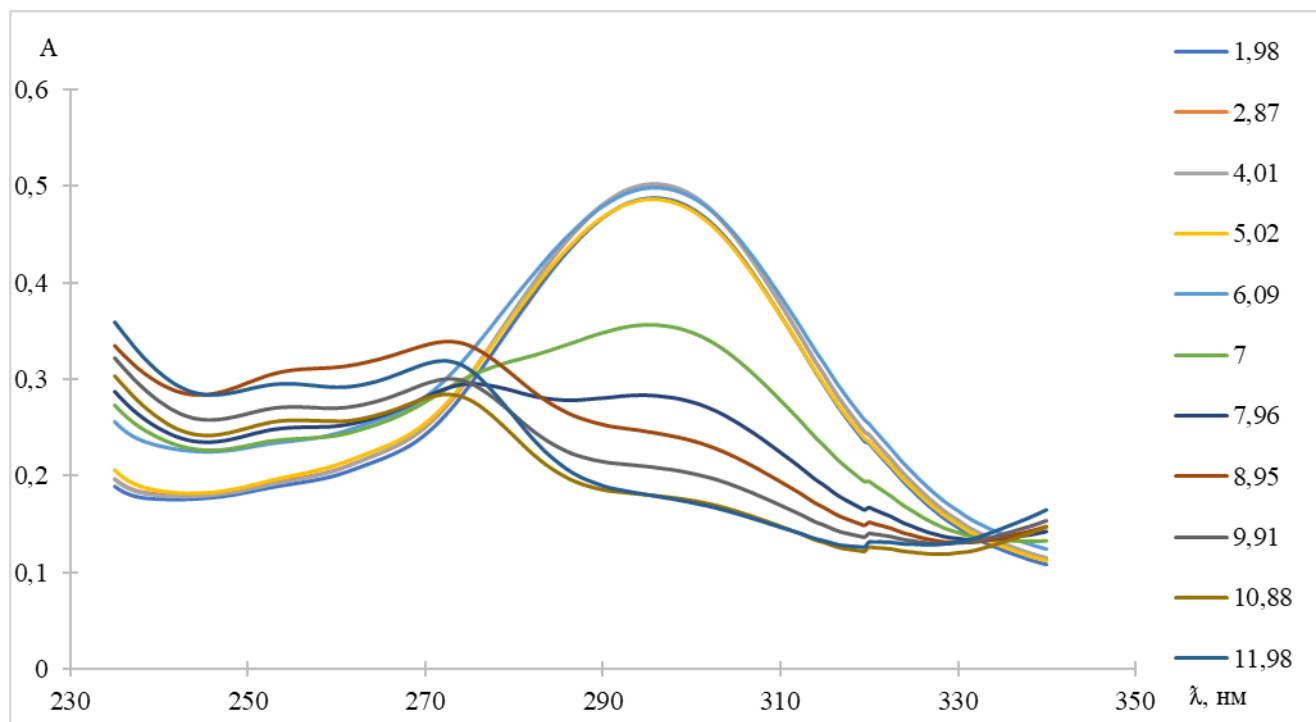


Рис. 4.11. Електронні спектри поглинання сполуки **7** при різних рН

Із значень pK_{BH^+} видно також, що лише сполуки **7** та **11** мають нейтральну реакцію і здатні протонуватися у діапазоні кислотності біологічних рідин, що повинно полегшувати їх інтеркаляцію між парами основ ДНК у випадку їх застосування як лікарських засобів.

Висновки до розділу 4

1. Отримано 11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбонову кислоту **(1)** реакцією між нінгідрином та 2,3-діамінобензеновою кислотою. Показано, що при цьому утворюється лише один регіоізомер.

2. Розроблено зручний та ефективний метод амідування 11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбонової кислоти. Отримано та ідентифіковано 10 амідів з естерами амінокислот, амінами різної будови, аміноетанолом:

- (2) Етил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат (60%);
- (3) Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат (47%);
- (4) Метил 3-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]пропаноат (42%);
- (5) Етил 2-[[2-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетил]аміно]-ацетат (55%);
- (6) Метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3-фенілпропаноат (40%);
- (7) N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (79%);
- (8) 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоат (75%);
- (9) N-(2,6-диметилпіримідин-4-іл)-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (70%);
- (10) N-(2-гідроксіетил)-11-оксо-індено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксамід (57%);
- (11) 6-(морфолін-4-карбоніл)індено[1,2-*b*]хіноксалін-11-он (63%).

Всі вищезазначені амідів, окрім **7**, синтезовано та описано вперше.

3. Визначено значення констант іонізації сполук **7-11**, які становлять: 7,07 ± 0,03, 5,52 ± 0,01, 1,46 ± 0,01, 6,44 ± 0,01, 7,13 ± 0,01, відповідно. Сполуки **7** та **11** протонуються при рН близьких до біологічних рідин.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ СИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК З ДНК ТА ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

5.1. Якісне визначення можливості взаємодії з ДНК та кількісний розрахунок афінітету

Як було показано в огляді літератури, інденохіноксалинові сполуки в силу своєї плоскої будови проявляють біологічну активність переважно за рахунок інтеркаляції до ДНК. Тому перед тим як проводити *in vitro* та *in vivo* дослідження біологічних властивостей доцільним є попередньо оцінити спосіб та силу взаємодії отриманих сполук із ДНК, проте насамперед потрібно провести експеримент щодо принципової можливості зв'язування з нею.

5.1.1. Якісна перевірка на здатність сполук зв'язуватись із ДНК

Перевірка здатності взаємодії сполук із ДНК проводилася методом конкуренції з етидій бромідом. Цей метод полягає в здатності ЕБ утворювати міцні флуоресцентні комплекси з ДНК. Отже, досліджувані сполуки у випадку їх зв'язування з ДНК повинні витискувати ЕБ, тим самим пригнічувати флуоресценцію, оскільки самі комплекси цих сполук не здатні до флуоресценції.

Якісне тестування на здатність сполук **2-11** конкурувати з ЕБ за місця зв'язування в ДНК здійснювали планшетним способом, відповідно до методики, описаної в розд. 2.4.1.

Експеримент показав, що сполуки **3** та **9** виявились здатними знижувати флуоресценцію інтеркальованого ЕБ в концентраціях, близьких до концентрації ЕБ, яку використовували в дослідженні (12,7 мкМ). Решта сполук також витискували ЕБ з його комплексу із ДНК, що проявлялось у значному зменшенні інтенсивності флуоресценції, проте їх концентрації були дещо більшими за концентрацію ЕБ. Як приклад, на рис. 5.1 наведено фотографію планшета при дослідженні сполуки **7**.

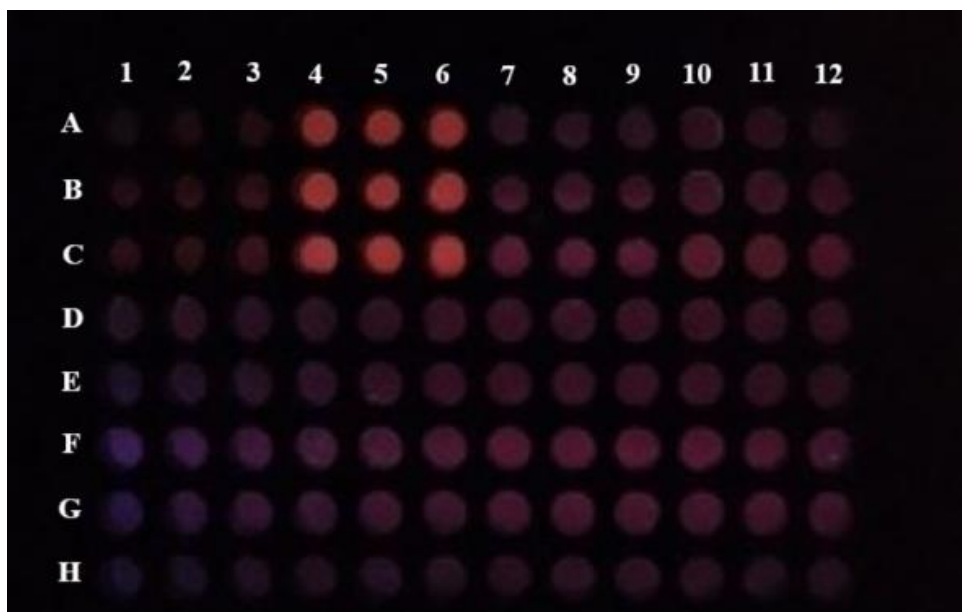


Рис. 5.1. Фотографія планшету з розчинами сполуки 7
з концентрацією 1,21 мМ

Отже, якісні дослідження вказують на здатність всіх синтезованих сполук зв'язуватись із ДНК, при чому для сполук 3 та 9 афінитет до ДНК приблизно дорівнює афінитету ЕБ, тому для них слід очікувати і більших значень констант асоціації при кількісному визначенні зв'язування.

5.1.2. Кількісне визначення афінитету до ДНК

Наступним кроком було здійснено експеримент з кількісного визначення афінитету до ДНК синтезованих сполук. Дослідження також було проведено методом конкуренції з ЕБ. Зменшення флуоресценції фіксували планшетним (для сполук 2-6; приклад на рис. 5.2) [127] та флуориметричним (для сполук 7-11; приклад на рис. 5.3) [131] способами.

Оскільки сполуки 2-6 виявилися недостатньо розчинними у воді в потрібних концентраціях, їх розчиняли у 5% розчині твіну-80. Попередньо в контрольному експерименті з аміксином, як еталонною сполукою, в аналогічних умовах було встановлено, що додавання твіну не впливає на інтенсивність флуоресценції досліджуваних розчинів.

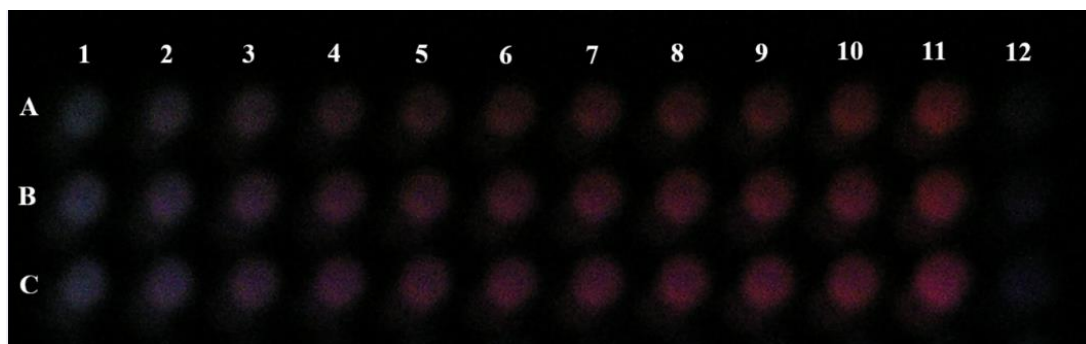


Рис. 5.2. Фотографія планшету при кількісному визначенні афінитету до ДНК сполуки **5**

При флуорометричному дослідженні сполук **7-11**, їх концентрація зменшується з 1 по 11 кювету, де в 1 кюветі концентрація, яка приводить до більш ніж 90% витиснення ЕБ, а в 11 кюветі концентрація досліджуваних сполук дорівнює нулю.

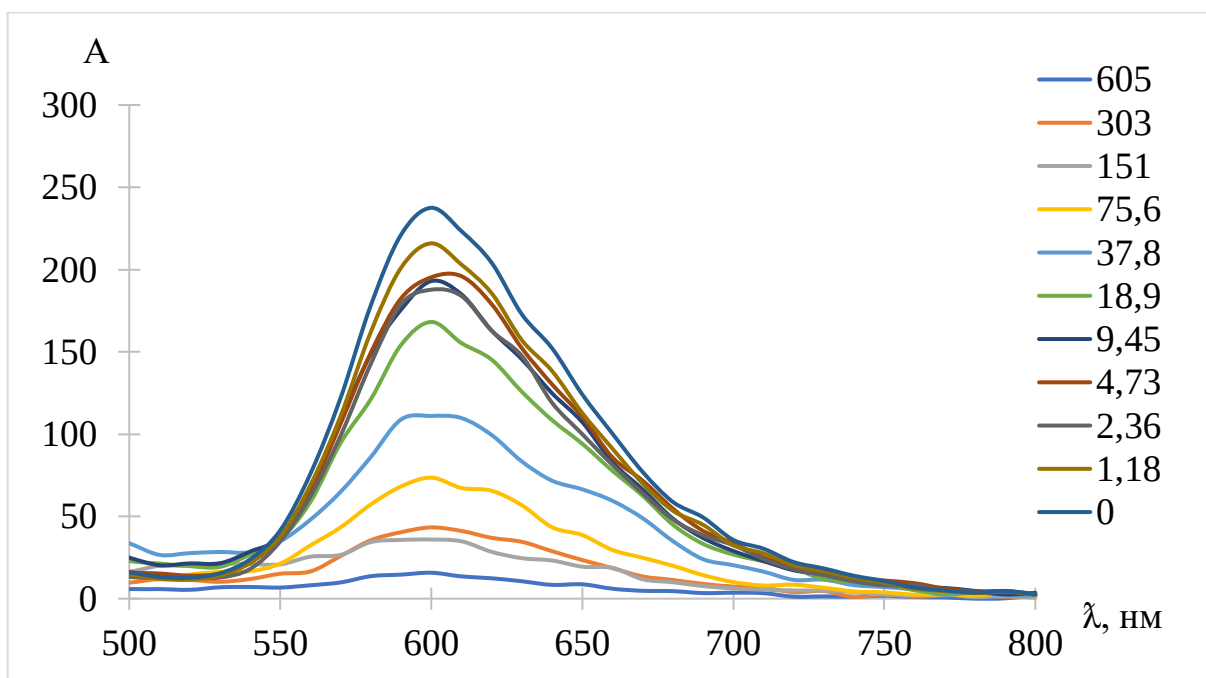


Рис. 5.3. Спектр флуоресценції сполуки **11** при різних концентраціях (мкМ). С[ЕБ] = 12,7 мкМ. С[ДНК] = 10,6 мкМ

З отриманих експериментальних даних інтенсивності флуоресценції у випадку сполук **2-6**, та оптичної густини при 600 нм для сполук **7-11** за рівнянням 2.1 було розраховано ступінь пригнічення флуоресценції (СПФ). Апроксимацією

експериментальних даних із залежності СПФ від логарифму концентрації сполук були отримані криві «Доза – ефект», (приклад на рис. 5.4), із середніх значень ($\lg C_{50}$) яких за рівнянням 2.2. були розраховані логарифми константи асоціації ($\lg K_x$) сполук **2-11** із ДНК. Результати розрахунків наведено в таблиці 5.1.

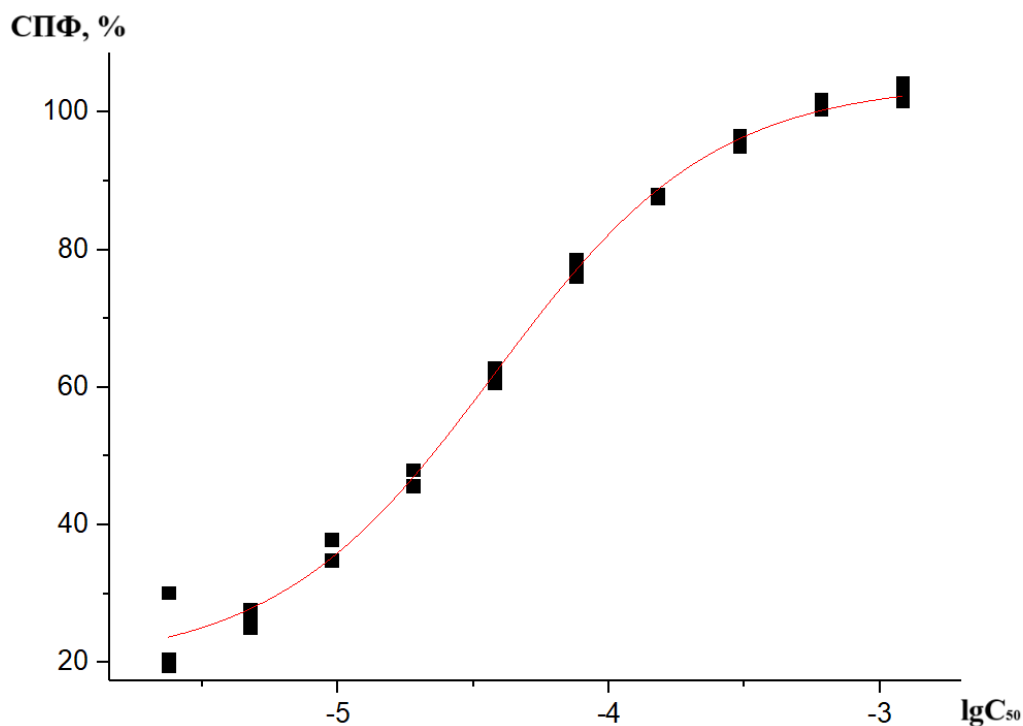


Рис. 5.4. Графічне зображення апроксимації експериментальних даних кривої «доза-ефект» для визначення середніх значень $\lg C_{50}$ на прикладі сполуки **7**

Одержані результати свідчать про те, що серед усіх синтезованих сполук найбільше значення константи асоціації спостерігається для похідних з естерами амінокислот **2–5**, за винятком сполуки **6**. Її низьке значення порівняно з іншими естерами амінокислот може бути зумовлене великим за розміром амінокислотним залишком, який ускладнює зручне розташування інденохіноксалинового каркасу в кишені зв'язування. Також отримані значення були порівняні з константою асоціації аміксину, який є противірусним препаратом та індуктором інтерферону і широко використовується в медицині [130].

Високі значення серед амінних похідних продемонстрували похідні з піримідином **9** та аміноетанолом **10**. Висока афіність сполуки **9** може

пояснюватися кон'югацією піримідину з молекулою інденохіноксаліну, що посилює π -стейкінг взаємодію між сполукою та парами основ ДНК.

Таблиця 5.1

Значення концентрацій сполук **2-11**, що забезпечують витіснення 50 % інтеркальованого етидію броміду (C_{50}) із його комплексу з ДНК та константи стійкості їх асоціатів (K_x)

Сполука	$-\lg C_{50}$	$C_{50} \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$\lg K_x$	$K_x \cdot 10^6, \text{ M}^{-1}$
Аміксин	4,44	3,64	6,54	3,47
2	4,79	1,63	6,89	7,76
3	4,92	1,20	7,02	10,47
4	4,75	1,78	6,85	7,08
5	4,81	1,55	6,91	8,13
6	4,45	3,56	6,55	3,55
7	4,42	3,78	6,52	3,31
8	4,44	3,63	6,54	3,47
9	4,89	1,30	6,99	9,77
10	4,74	1,84	6,84	6,92
11	4,42	3,80	6,52	3,31

Більш великі значення K_x для сполуки **10** порівняно з амідами **7, 8** можуть бути обумовлені утворенням водневих зв'язків завдяки гідроксильній групі, про що свідчать дані молекулярного докінгу, представлені на рис. 5.5.

Треба зазначити, що похідна з морфоліновим замісником **11** у складі амідної групи утворює з ДНК дещо міцніший комплекс ($\lg K_x=6,52$), ніж аналог, отриманий нами в попередній роботі [22], у якого морфоліновий та хіноксаліновий цикли сполучені через метиленову групу (див. рис. 3.1) ($\lg K_x=6,44$). На відміну від нього в сполуці **11** сполучення відбувається через карбонільну групу, яка й вносить свій внесок у взаємодію з ДНК, забезпечуючи збільшення афіності. Можна припустити, що карбонільна група приймає участь в утворенні додаткових водневих зв'язків з нуклеотидами ДНК, або завдяки р- π -

кон'югації з атомом Нітрогену (+М-ефект), забезпечує копланарність морфолінового та інденохіноксалинового циклів, підсилюючи π -стекінгову взаємодію. На користь такого пояснення свідчить високе значення K_x амідів **9** з піримідиновим замісником, який має π - π -кон'юговану систему IQ-каркасу із замісником.

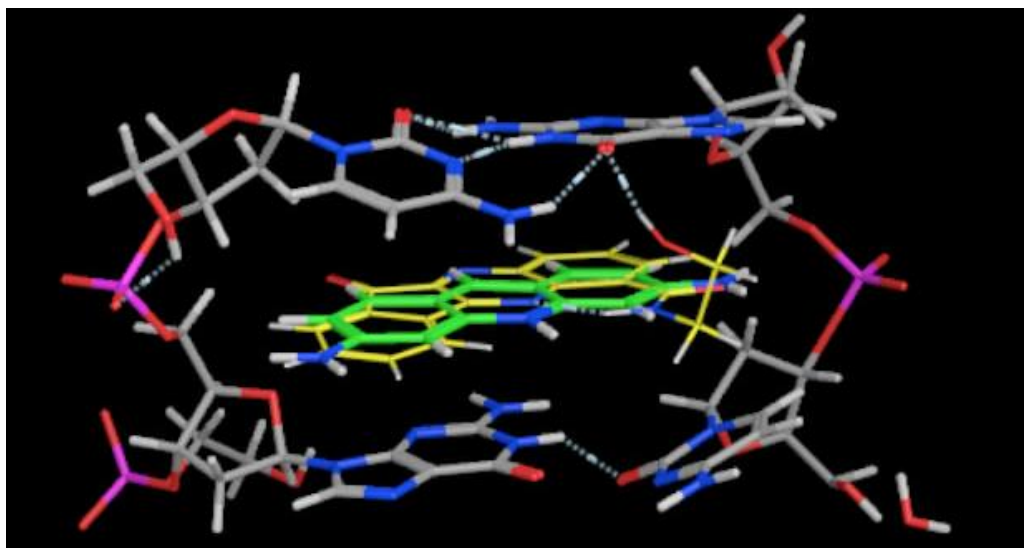


Рис. 5.5. Розташування сполуки **10** в кармані зв'язування. Жовтий колір – сполука **10**, зелений – профлавін. Водневі зв'язки позначено пунктирною лінією

Отже, визначення констант асоціації сполука-ДНК показало, що всі синтезовані карбоксаміди є високоафінними лігандами ДНК. З наведених результатів видно, що сполуки **6**, **7**, **8**, **11** за своїм афінитетом є близькими до аміксіну, тоді як афінитет решти шести амідів у 2 рази переважає його, що дозволяє їх розглядати як потенційні протиінфекційні агенти. Високі значення K_x для сполук **2-5** вказують на правильність стратегічного підходу щодо синтезу інденохіноксалинових похідних з лінкерними амінокислотними фрагментами, як складових для підвищення біологічної спорідненості потенційної лікарської субстанції з мішенями організму.

5.1.3. Спектрофотометричне дослідження способу взаємодії сполук з амініними замісниками з ДНК

Визначення способу взаємодії сполуки з ДНК є непростю задачею, оскільки «чиста» інтеркаляція може ускладнюватися додатковими зв'язуванням за рахунок лінкерних груп.

Молекулярний докінг виявив потенційну можливість синтезованих амідів взаємодіяти з ДНК шляхом інтеркаляції (розд. 4.3), а експеримент з витісненням ЕБ це підтвердив на практиці. Ще однією з ознак інтеркаляції планарних лігандів до ДНК є наявність характерних змін в електронних спектрах поглинання їх розчинів, обумовлених π - π -стекінг взаємодією ароматичних (або гетероароматичних) систем планарних частин молекул із гетероароматичними системами пар основ, а саме, батохромний зсув смуги поглинання інтеркалятору з одночасним гіпохромізмом [132]. Таким чином, на підставі змін в спектрах поглинання можна оцінити наявність «чистої» π - π -стекінг взаємодії ліганда з ДНК, разом з тим відсутність вищевказаної ознаки не свідчить про відсутність інтеркаляційної взаємодії.

Для оцінки способу зв'язування синтезованих амідів із ДНК був використаний метод спектрофотометрії. Було зареєстровано відповідні спектри поглинання сполук **7-11** в присутності різних концентрацій ДНК [133]. Зауважимо, що для сполук **2-6** провести це дослідження виявилось не можливим через їх низьку розчинність у водному середовищі, а наявність твіну-80 заважає експерименту, оскільки останній має власне поглинання в УФ-області спектру.

Аналіз спектру сполуки **7** виявив, що при збільшенні концентрації ДНК спостерігається зменшення максимуму поглинання смуги в області 230 – 270 нм водночас із його зсувом на 2-5 нм (рис. 5.6), що є характерними для лігандів, центр позитивного заряду яких знаходиться в бічному ланцюзі [134]. Отже на підставі спектроскопічних даних для сполуки **7** можна з високим ступенем вірогідності стверджувати про інтеркаляційний спосіб її взаємодії з ДНК.

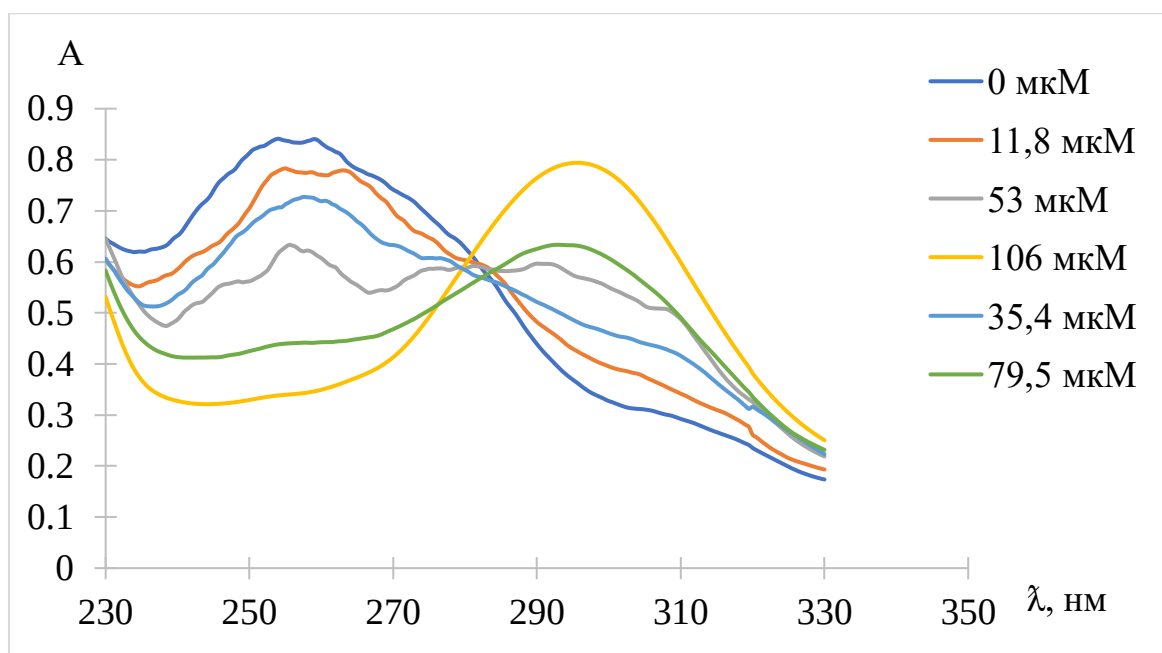


Рис. 5.6. Спектри поглинання сполуки **7** з концентрацією 11,2 мкМ у присутності різних концентрацій ДНК

Для розчину сполуки **8** зареєструвати спектри виявилось неможливим, оскільки при додаванні ДНК одразу починав випадати осад. З одного боку, це ускладнює визначення способу зв'язування речовини з ДНК, проте з іншого боку доводить її принципову можливість взаємодіяти з нею. Відомо, що через утворення іонних пар в результаті електростатичних взаємодій між аніонами ДНК та амінокатіонами ліганду втрачається гідрофільність комплексу, що призводить до колапсу конформації ДНК, в результаті чого вона втрачає свою спіральну структуру та випадає в осад з розчину [135].

Для сполук **9-11** при збільшенні концентрації ДНК спостерігався лише батахромний зсув без зменшення оптичної густини. Відсутність гіпохромізму при батахромному зсуві для сполук **9-11** може вказувати на одночасне зв'язування в малому або великому жолобах, або на поверхневе зв'язування, при якому структура молекули та її електронна щільність змінюються, але екранування π -системи не відбувається. Оскільки молекулярний докінг показав можливість їх інтеркаляції - це означає, що ці молекули геометрично здатні вбудовуватися між основами ДНК. При цьому тест з витісненням ЕБ виявив зменшення його флуоресценції, що також є непрямим підтвердженням

інтеркаляції. А отже, найбільш ймовірним є те, що ці молекули здатні до інтеркаляції, але не є «чистими» інтеркаляторами та можуть зв'язуватися з ДНК декількома способами одразу.

5.2. Дослідження антибактеріальних властивостей N-(2-гідроксіетил)-11-оксо-індено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду та N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду

Результати, які були висвітленні у попередньому розділі 5.1, показують, що синтезовані сполуки **2-11** здатні до взаємодії з ДНК з утворенням асоціатів, у тому числі і шляхом інтеркаляції; попередньо такі результати було спрогнозовано молекулярним докінгом. Загально відомо, що інтеркаляція до ДНК є причиною проявів різного роду біологічної активності. Під час аналізу літературних джерел, зазначалося, що сполуки з інденохіноксаліновим каркасом виявляють бактеріостатичну та фунгіцидну дію по відношенню до деяких патогенних мікроорганізмів [40, 41, 54]. Окрім цього скринінг біологічних мішеней, який здійснювали за допомогою програми PharmMapper (розділ 4.2) виявив серед потенційних об'єктів для зв'язування сполук **7** та **10** білки, наявні в бактеріях *S. aureus* та *E. coli*. Тому було доцільним з'ясувати питання, щодо антимікробних властивостей синтезованих амідних похідних.

Для експерименту було обрано сполуки **7, 8, 10, 11**, які наносили на диски у вигляді спиртових розчинів та поміщали в середовище Мюллера-Хінтона-II, з колоніями грам-позитивної бактерії *E. coli*, та грам-негативних – *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

S. aureus (золотистий стафілакок) є одним з найпоширеніших грампозитивних мікроорганізмів, які виділяють від хворих хірургічного профілю. Він належить до основних збудників захворювань шкіри, м'яких тканин — фурункулів, флегмі, флегмони, маститу, а також спричиняє виникнення пневмонії, остеомієліту, менінгіту та ендокардиту. *P. aeruginosa* (синьогнійна паличка) є умовно-патогенним мікроорганізмом, вона вражає ушкоджені тканини. Може викликати інфекції сечовивідних шляхів, дихальної

системи, дерматити, інфекції м'яких тканин, бактеріємію, інфекції кісток та суглобів та ін. Інфекція *P. aeruginosa* є серйозною проблемою для пацієнтів, госпіталізованих з раком, муковісцидозом та опіками. Летальність таких пацієнтів становить близько 50 %. *E. coli* (кишкова паличка) – грамнегативні бактерії, які в нормі у великих кількостях населяють кишечник, можуть викликати розвиток патології при попаданні в інші органи або порожнини людського тіла. Вірулентні штами *E. coli* можуть викликати гастроентерити, запалення сечостатевої системи, а також менінгіт у новонароджених. Деякі штами *E. coli* синтезують потенційно смертельні токсини. Харчові отруєння, інфекційним агентом при яких є вірулентні *E. coli*, зазвичай викликані вживанням немитих овочів або непрожареного м'яса [136].

Експеримент показав, що жодна з досліджуваних сполук не виявила антимікробної активності щодо *P. aeruginosa*. Проте сполука **10** N-(2-гідроксіетил)-11-оксо-індено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксамід з вмістом речовини 200 мкг інгібував зростання *E. coli*. Він спричиняв зону інгібування (9 мм), що є близьким значенням до контрольного антибіотику гентаміцину у кількості 10 мкг (13 мм) (рис. 5.7).



Рис. 5.7. Результати експерименту щодо *E. coli*

Зразок 7 (N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксамід) у кількості 780 мкг виявляв антимікробну активність проти *S. aureus* співставну з контрольним зразком: діаметр зон пригнічення їх росту 9 та 10 мм, відповідно. Але не менш цікавим результатом виявилось те, що цей диск із нанесеним зразком, як і середовище в зоні інгібування, забарвилось у зеленкуватий колір (рис.5.8).



Рис. 5.8. Результати експерименту щодо *S. aureus*

Для того, щоб з'ясувати чи не є причиною цього явища концентрація речовини, експеримент повторили взявши речовину в різних кількостях 100-600 мкг. Виявилось, що в такому разі забарвленню піддавалась уся поверхня середовища (рис.5.9). Отже ключову роль відігравала природа бактерії, а не концентрація аміду 7.

З літератури відомі факти про забарвлення поживного середовища в зелений колір, але для іншого мікроорганізму. Така зміна забарвлення відбувається при нанесенні на агарову поверхню мікробу *P. aeruginosa*, який виробляє водорозчинний пігмент *піюціанін*. Ця особливість лежить в основі тестового методу для ідентифікації цього мікроорганізму за допомогою середовища Tech agar [137]. Піюціанін є вторинним метаболітом з антибіотичною

дією, здатним окислювати інші молекули та утворювати реактивні види кисню і знищувати бактерії, що конкурують з *P. aeruginosa*.

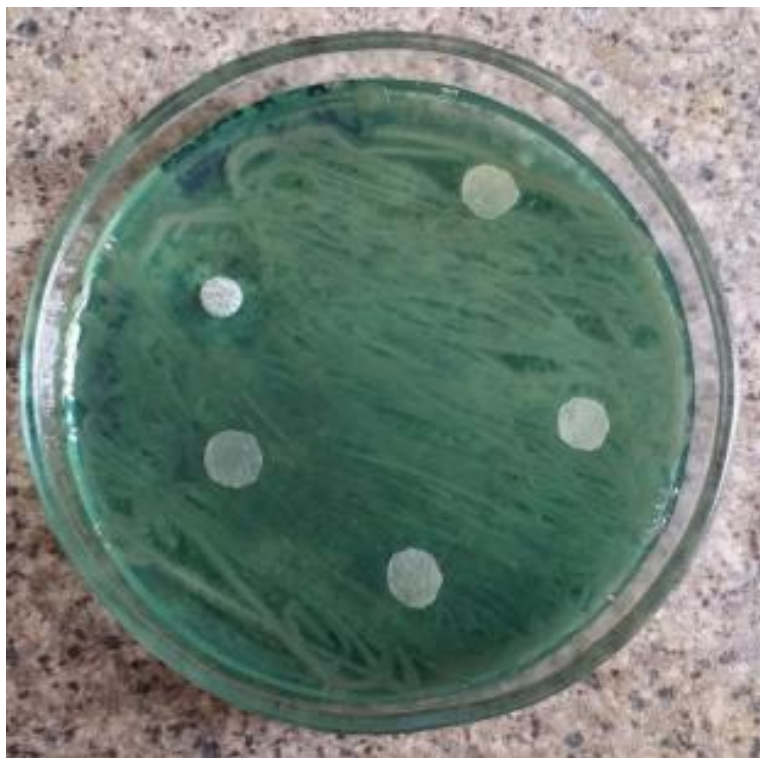


Рис. 5.9. Результати експерименту щодо *S. aureus* для сполуки 7 із різними концентраціями

Також в літературних джерелах є повідомлення про виділення та ідентифікацію *P. aeruginosa* зі зразків молока з використанням селективного цетриміду та агару [138]. Агар із цетримідом змінює колір із жовтого на синьо-зелений, при цьому спостерігається зростання *P. aeruginosa*, яка виділяє ще один пігмент – *піввердин*, що характеризується синьо-зеленою флуоресценцією в ультрафіолетовому світлі (рис. 5.10).



Рис. 5.10. Зміна забарвлення цетримідового агару для *P. aeruginosa* [138]

Щодо *S. aureus*, загально відомо, про те, що ця бактерія виробляє *стафілоксантин* – каротиноїдний пігмент жовтого кольору, завдяки якому він і отримав свою назву. Стафілоксантин служить не тільки для надання кольору, але також функціонує як важливий антиоксидант, що сприяє вірулентності. Деякі види агару посилюють виробництво стафілоксантину [139].

Відомостей про забарвлення середовища з *S. aureus* в зелений колір під впливом будь-яких хімічних речовин в літературних джерелах нами не виявлено. Проте звертає увагу той факт, що зміна забарвлення поряд з антимікробною дією виникає лише у випадку застосування сполуки **7**, решта взятих для дослідження амідів (**8**, **10**, **11**) не спричиняють ані забарвлення, ані бактерицидної дії. Враховуючи дані, описані в розд. 5.1, можна припустити, що інтеркаляція сполуки **7** до ДНК *S. aureus* може супроводжуватися або утворенням комплексу, що має забарвлення, як наприклад, з ЕБ [61], або додатковим виділенням якоїсь забарвленої речовини, як описано вище у випадку з *P. aeruginosa*. Цей факт є доволі цікавим і потребує окремого детального вивчення, оскільки сполука **7** в перспективі може бути використана не лише в лікувальних (антибактеріальних) цілях, а й для специфічного фарбування у швидкому тест-методі при визначенні *S. aureus* у змішаних бактеріальних середовищах.

Таким чином, в ході дослідження *in vitro* була встановлена антибактеріальна дія сполук **10** та **7** по відношенню до мікроорганізмів *E. coli* та *S. aureus*, відповідно. Варто зауважити, що *in silico* скринінг програмою PharmMapper з великою вірогідністю передбачив взаємодію цих сполук з біологічними мішенями, які входять до вищевказаних мікробів (див. розділ 4.2), що підтвердилось експериментально.

5.3. Дослідження антифунгальної активності щодо *C. albicans*

C. albicans – умовно-патогенні дріжджеподібні гриби овоїдної форми, що мешкають в шлунково-кишковому тракті, на шкірі та слизових оболонках статевих органів. При зниженні імунної опірності організму дані мікроорганізми можуть викликати ураження цих ділянок організму – кандидоз, або молочницю.

На сьогоднішній день їм належить одна з провідних ролей в інфекційній патології статевої системи.

Оскільки методом *in silico* було спрогнозовано, що сполука **6** може бути здатна пригнічувати глюкозамін-6-фосфатсинтазу, яка є ферментом, що приймає участь у реплікації *C. albicans*, наступним кроком стало дослідження синтезованих сполук щодо антифунгальної активності.

Сполуки **2-11** наносили на диски у вигляді спиртових розчинів та розчинів ДМСО аналогічно як у попередньому дослідженні, та поміщали в середовище з колоніями *C. albicans*. Як референс-препарат було взято флуконазол у кількості 40 мкг. Антифунгальний ефект оцінювали за діаметром зони інгібування (ДЗІ).

Попередній скринінг дисковим методом виявив наступне. Сполуки **4-7, 10, 11**, були здатні пригнічувати ріст *C. albicans*. При цьому сполуки **4-6, 10, 11** взяті у кількості 40 мкг спричиняли слабку антифунгальну дію (ДЗІ = 8-10 мм), яка значно поступалась флуконазолу (ДЗІ = 40 мм, рис. 5.11, А); сполука **7** мала дещо більшу протигрибкову активність (ДЗІ = 14 мм (рис. 5.11, Б)), проте все рівно програвала контрольному зразку.

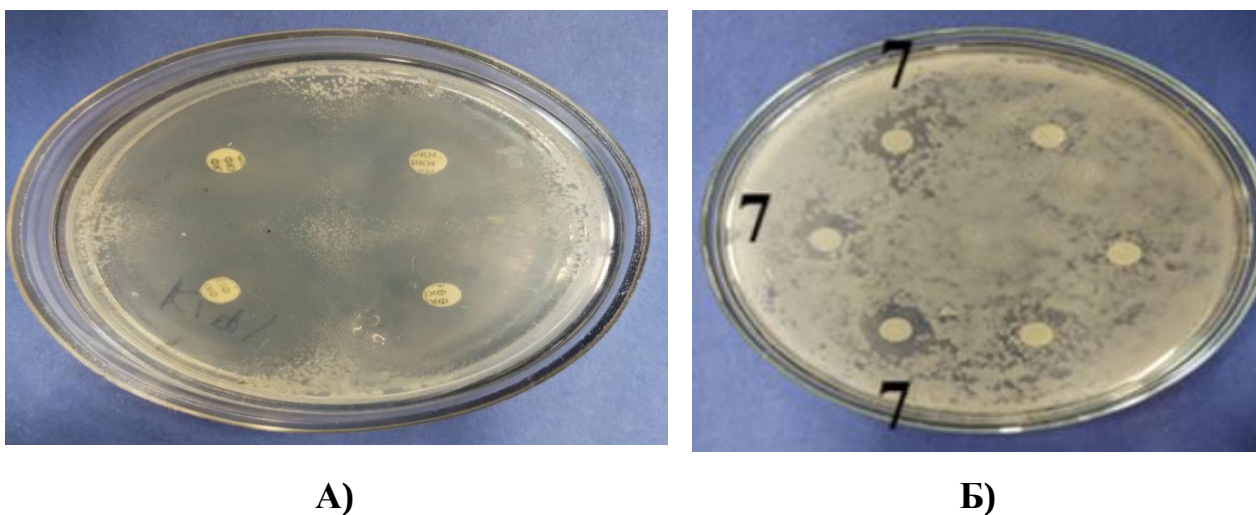


Рис. 5.11. Результати експерименту щодо *C. albicans*:

А-для флуконазолу, Б-для сполуки **7**. Концентрація препаратів – 40 мкг

На наступному етапі ці ж зразки досліджувались у менших концентраціях – приблизно 0,4 мкг. При цьому сполука **6** неочікувано виявилась значно більш

ефективною. Вона пригнічувала грибок з ДЗІ = 15 мм (рис. 5.12), при цьому її концентрація була у 130 разів меншою (0,44 мкг), ніж референс-препарату. Решта досліджуваних сполук за низьких концентрацій не виявили суттєвої протидії *C. albicans*. Отже було очевидним, що антифунгальна активність залежить від концентрації взятої речовини. Тому цікаво було дослідити кількісні параметри протигрибкової активності сполук **6** та **7**, як найбільш ефективних об'єктів.

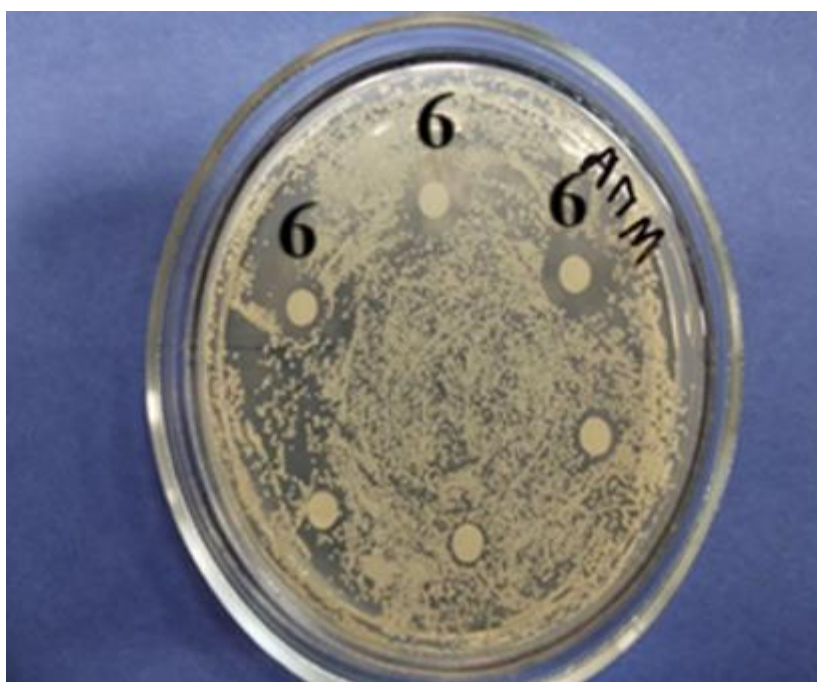


Рис. 5.12. Результати експерименту щодо *C. albicans*
для сполуки **6** з концентрацією 0,44 мкг

Для оцінки мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) застосували планшетний метод із використанням барвника резазурину, який широко застосовується для подібних цілей. Цей метод ґрунтується на здатності живих клітин відновлювати резазурин, змінюючи його колір, що дозволяє кількісно визначити життєздатність грибів під впливом антимікотиків. Якщо клітини ростуть - вони метаболічно активні і відновлюють резазурин (синього кольору) до резорфуруну (рожевого кольору). Залежно від ступеня відновлення це призводить до підвищення оптичної щільності в діапазоні 570-600 нм.

Нажаль, сполуку **6** дослідити планшетним методом виявилось неможливим, внаслідок її поганої розчинності у воді. При розведенні вихідного розчину культурою, частка води збільшувалась і речовина частково осаджувалась. Це приводило до того, що подальші вимірювання не можна було вважати коректними. Тому планшетний метод застосували лише для сполуки **7**.

Було встановлено, що сполука **7** була здатна пригнічувати рост *C. albicans* на 92% у кількості 4 мкг. Подальше розведення приводило до зниження ефективності. Таким чином, сполука **7**, як і **6**, при дуже малих концентраціях проявляла кращу антифунгальну активність, ніж за великих концентрацій. Причиною цього явища можуть бути декілька факторів. По-перше, у високих концентраціях ці речовини можуть утворювати агрегати, тим самим знижуючи їх біодоступність. По-друге, деякі речовини в малих дозах можуть пригнічувати ключові процеси у грибів, тоді як у високих дозах відбувається їх метаболічна перебудова [140].

Отже за результатами експериментів було підтверджено антифунгальну активність метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3-фенілпропаноату (сполука **6**) дисковим методом та N-[3-(диметиламіно) пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду (сполука **7**) планшетним способом. Вони здатні пригнічувати рост *C. albicans* у дуже малих концентраціях – 0,44 мкг та 4 мкг, відповідно, що можна при подальших дослідженнях використати при розробці засобів проти мікотичних уражень. При цьому варто зауважити, що програмою PharmMapper було заздалегідь передбачено взаємодію сполуки **6** з біологічною мішенню, яка входить до складу *C. albicans*.

5.4. Дослідження анагетичної активності 2-(діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату

Сполука **8** – 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоніл) аміно]бензоат містить у своєму складі фрагмент новокаїну. Новокаїн (прокаїну гідрохлорид) є місцевоанестезуючим засобом з помірною анестезуючою активністю та великою широтою терапевтичної дії. Будучи

слабкою основою, блокує натрієві канали, перешкоджає генерації імпульсів у закінченнях чутливих нервів та проведенню імпульсів з нервових волокон. Має коротку анестезуючу активність (тривалість інфільтраційної анестезії становить 0,5-1 год).

Поєднання в межах однієї молекули інденохіноксалінового фрагменту, здатного до інтеркаляції до ДНК, з новокаїном викликає інтерес, оскільки може збільшувати вірогідність ефективної та селективної взаємодії з певними біологічними мішенями, які відповідають за аналгетичну дію. Тому цікаво було дослідити аналгетичну активність сполуки **8** на різних моделях болю.

5.4.1. Дослідження аналгетичної активності на термічних моделях болю

Методи термічної ноцицептивної стимуляції є одними з основних інструментів для дослідження аналгетичної активності в експериментальних умовах. Активація терморецепторів, в термічних тестах, викликає включення різних ланок ноцицептивної системи, зокрема терморецепторів, ноцирецепторів, а також так званих «парадоксальних холодкових» рецепторів.

Для дослідження аналгетичної активності дослідного зразку було обрано дві моделі термічного болю «гаряча вода» та «гаряча пластина».

У тесті «гаряча вода» при зануренні хвоста щурів у гарячу воду площа подразнення значна, і процес нагрівання шкіри відбувається дуже швидко. Внаслідок цього не відбувається активація терморецепторів, а одразу стимулюються С- та А δ -волокна полімодальних ноцицепторів і механорецепторів. Формування реакції тварини (висмикування хвоста, писк) відбувається через передачу больового імпульсу центральною ноцицептивною системою, а механізм аналгезії реалізується шляхом блокування передачі цього імпульсу.

Дослідження аналгетичної активності дослідних зразків мазей показало, що не всі обрані концентрації мазей здатні ефективно пригнічувати поріг больової реакції та зменшувати больові відчуття у тварин. Ефективність

застосованих зразків мазей збільшувались із зростанням тривалості аплікацій мазей на поверхні шкіри тварин до початку експерименту.

Найкращий результат знеболення відзначався у групі тварин, які отримували аплікації 5 % мазі за одну годину до експерименту та достовірно зменшували больові відчуття на 63,8 % ($p < 0,05$), відносно показників контрольної групи. Дещо менш виразний аналгетичний ефект відзначався в групі тварин, яким наносили 3 % мазь, де поріг больової реакції знижувався до 42 %.

В групі тварин, яким наносили 1 % мазь виразного знеболюючого ефекту не було зареєстровано, аналогічну картину спостерігали при аплікації маzewої основи, яка не проявляла жодних аналгетичних властивостей (табл.5.2).

Таблиця 5.2

Аналгетична активність 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-
b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоат на моделі подразнення хвоста у щурів

Конц. мазі, %	Тривалість аплікації мазі до початку експерименту					
	15 хвилин		30 хвилин		1 година	
	Латент- ний час, с	у % до контролю	Латент- ний час, с	у % до контролю	Латент- ний час, с	у % до контролю
Контроль	7,1±0,6	100,0	7,3±0,4	100,0	6,9±0,7	100,0
Мазева основа	7,3±0,5	102,8	7,2±0,6	98,2	7,0±0,5	101,4
1 % мазь	7,2±0,6	101,4	7,3±0,4	100,0	7,1±0,6	102,9
3 % мазь	8,5±0,9	119,7	9,1±1,2	124,6	9,8±1,1	142,0
5 % мазь	9,1±1,1	128,2	9,8±1,2	134,2	11,3±0,9*	163,8
Анесте- зин	*11,4±0,8	160,6	15,3±1,1*	209,6	15,1±1,3*	218,8

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

Аналіз динаміки аналгетичної активності мазей з концентраціями 3 та 5 % свідчить про те, що вони здатні впливати на центральний компонент ноцицептивної системи та пригнічувати больові відчуття у піддослідних тварин, однак знеболюючий ефект був нижче ніж у референс-препарату.

Формування больового синдрому під впливом термічного подразнення в тесті «гаряча пластина», подібно до попереднього дослідження, супроводжується емоційною реакцією на біль, де ключову роль у цьому процесі відіграють центральні механізми. У цьому тесті показником больової чутливості є латентний час (в секундах, с), який визначається як проміжок часу від початку експерименту до першого прояву оборонного рефлексу у тварин, що полягає в облизуванні кінцівок.

Дослідження анагезивної ефективності дослідних зразків мазей в тесті «гаряча пластина» показало, що у тварин контрольної групи середній латентний час становив 10,5 с, тоді як при застосуванні досліджуваних мазей різних концентрацій цей показник збільшувався і варіював в межах від 11,3 до 15,2 с, порівняно з контролем (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Аналгетична активність 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату в тесті «гаряча пластина»

Дослідна група	Тривалість аплікації мазі до початку експерименту					
	15 хвилин		30 хвилин		1 година	
	Латент-ний час, с	у % до контролю	Латент-ний час, с	у % до контролю	Латент-ний час, с	у % до контролю
Контроль	10,5±0,8	100,0	10,6±0,7	100,0	10,5±0,9	100,0
Мазева основа	10,7±0,8	101,9	10,8±0,4	101,8	10,6±0,7	100,9
1 % мазь	10,6±0,5	100,9	10,5±0,8	99,1	10,9±0,6	103,8
3 % мазь	11,3±0,6	107,6	11,7±1,3	110,4	12,3±1,4	117,1
5 % мазь	11,8±1,2	112,4	12,6±1,4	118,9	15,2±0,4*	144,8
Анестезин	16,7±1,2*	159,0	20,3±1,1*	191,5	20,2±1,6*	192,4

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

Найвиразніший знеболюючий ефект відзначався в групі тварин, яким наносили аплікації 5 % мазі за одну годину до початку тестування, пригнічення

больової реакції становило 44,8 % ($p < 0,05$), у порівнянні з групою контролю, яка не отримувала жодної базисної терапії.

Також помірна аналгетична активність відзначалась і в групі тварин, яким наносили аплікації 3 % мазі, де латентний час коливався у межах від 11,8 – 15,2 с, що перевищувало показники контрольної групи тварин, проте фармакологічний ефект був нижчим у порівнянні з 2 % маззю анестезину.

Отже, результати досліджень на термічних моделях болю свідчать про наявність аналгезивних властивостей у 5 % мазі, які проявляються через блокування передачі больового імпульсу центральною ноцицептивною системою. Дослідний зразок мазі має перспективи для подальших поглиблених досліджень в якості місцевого знеболюючого засобу.

5.4.2. Дослідження аналгетичної активності на хімічних моделях болю

Дослідження антиноцицептивної активності дослідних зразків мазей на моделі АІТЦ-індукованого болю пов'язане з блокадою периферичних ноцицепторів, зокрема, TRPV1-рецепторів (рецептори, що реагують на температурні зміни та деякі хімічні подразники), а також інших типів рецепторів, таких як P2X-рецептори (рецептори, що реагують на аденозинтрифосфат) та імовірно, частково, опіюїдних рецепторів, які беруть участь у зменшенні больової чутливості.

При субплантарному введенні АІТЦ показником больової чутливості був сумарний час облизування ураженої кінцівки впродовж 10 хв.

Дослідження антиноцицептивної активності дослідних зразків мазей на моделі АІТЦ-індукованого болю показало, що місцеве їх нанесення за 1 годину до ін'єкції больового агенту сприяли зменшенню збудливості вісцеральних ноцицепторів, що, в свою чергу, стимулювало скорочення часу облизування тваринами задніх кінцівок майже в усіх групах піддослідних тварин, за винятком лише груп, де застосовували 1 % мазь. Найбільший рівень аналгетичної активності відмічався при нанесенні 5 % мазі, тривалість больової реакції

викликаной дією хімічного подразника становила при цьому 66,5 с, однак дещо поступалась дії (51,9 с) препарату порівняння – анестезину (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Аналгетична активність 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-
b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату на моделі АІТЦ-індукованому тесті

Дослідна група	Тривалість аплікації мазі до початку експерименту					
	15 хвилин		30 хвилин		1 година	
	Латент-ний час, с	у % до контролю	Латент-ний час, с	у % до контролю	Латент-ний час, с	у % до контролю
Контроль	85,8±4,2	100,0	86,2±5,1	100,0	85,4±7,2	100,0
Мазева основа	85,3±8,7	99,4	86,1±6,6	99,9	85,9±8,7	100,6
1 % мазь	85,6±5,1	99,8	85,8±4,5	99,5	83,4±5,3	97,6
3 % мазь	85,8±6,4	100,0	81,2±5,8	94,2	73,4±7,6	86,0
5 % мазь	83,4±8,8	97,2	75,6±7,9	87,7	56,8±5,2*	66,5
Анестезин	65,4±6,7	76,2	45,5±1,2*	52,8	44,3±1,2*	51,9

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

Наступним етапом роботи було дослідження аналгетичних властивостей дослідних зразків мазей в формаліновому тесті, який являє собою реєстрацію ноцицептивної реакції гризунів на індукцію болю, викликаного пошкодженням тканин формаліном.

У відповідь на субплантарне введення формаліна розвиваються дві фази больової реакції. Перша фаза (0–5 хвилин після ін'єкції) характеризується гострим болем, який зумовлений хімічним впливом на ноцицептори та активацією С-волокон. Протягом наступних 10–15 хвилин больова реакція значно зменшується або відсутня. Друга фаза (20–30 хвилин після ін'єкції) асоціюється з розвитком запального процесу в периферичних тканинах. У першій фазі участь у больовій реакції беруть субстанція Р та брадикінін, а в другій фазі — гістамін, серотонін, простагландини та брадикінін. Одним із механізмів

ноцицептивної дії формаліна є активація TRPA1 каналів, які, в нормальних умовах, реагують на холод і сприяють розвитку запалення.

Дослідження аналгетичної активності дослідних зразків мазей у формалін-індукованому тесті показало, що жодна концентрації мазей не здатна пригнічувати больову реакцію в I – фазі тесту та не здатні впливати на запальний процес, який розвивається в II – фазі експерименту (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Аналгетична активність 2-(Діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-
b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату у формалін-індукованому тесті

Дослідна група	Тривалість аплікації мазі до початку експерименту 1 год			
	I – фаза		II – фаза	
	Час реакції, с	у % до контролю	Час реакції, с	у % до контролю
Контроль	65,9±4,3	100	175,8±8,6	100
Мазева основа	65,5±5,8	99,4	175,9±9,4	100,1
1 % мазь	65,7±5,4	99,7	176,3±7,3	100,3
3 % мазь	65,9±5,7	100	175,4±9,5	99,8
5 % мазь	65,4±6,1	99,2	175,6±10,2	99,9
Анестезин	29,5±2,1*	39,3	66,5±5,7*	37,8

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю

Таким чином, дослідження антиноцицептивної активності дослідних зразків мазей на моделі АІТЦ-індукованого болю показало, що місцеві нанесення аплікації засобів сприяли зменшенню больової чутливості у піддослідних тварин, особливо при використанні 5% мазі, що свідчить про здатність даного засобу блокувати периферичні ноцицептори, зокрема, TRPV1 та P2X-рецепторів. Тоді як в формалін-індукованому тесті жодна з мазей не вплинула на першу та другу фазу больової реакції, а отже можна припустити, що обраний зразок не здатний впливати на TRPA1 рецептори.

Висновки до розділу 5

1. Встановлено, що всі синтезовані карбоксаміди є високоафінними лігандами ДНК. Константа їх зв'язування з ДНК знаходиться в межах $(3,31-10,47) \cdot 10^{-6}$ М, що дозволяє розглядати їх як потенційні протиінфекційні та протипухлинні агенти. Серед сполук з амінокислотними залишками найміцніший комплекс з ДНК утворює метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-*b*]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]ацетат (сполука **3**), а серед сполук з аміногрупами – N-(2,6-диметилпіримідин-4-іл)-11-оксоіндено[2,1-*b*] хіноксалін-6-карбоксамід (сполука **9**).
2. Найбільші значення K_x для сполук **2-5** вказують на правильність стратегічного підходу щодо синтезу інденохіноксалінових похідних з лінкерними амінокислотними фрагментами, як складових для підвищення біологічної спорідненості потенційної лікарської субстанції з мішенями організму.
3. Дослідження сполук **7-11** з ДНК спектрофотометричним методом виявили наявність батохромного зсуву смуг поглинання N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-*b*]хіноксалін-6-карбоксаміду (сполука **7**) в електронних спектрах з одночасним гіпохромізмом. Враховуючи її здатність знижувати інтенсивність флуоресценції ЕБ, інтеркальованого в ДНК, цій сполуці можна з великим ступенем вірогідності приписати інтеркаляційний спосіб взаємодії з ДНК, тоді як електронні спектри інших сполук вказують на більш складний характер взаємодії.
4. Експериментальним шляхом *in vitro* була встановлена антибактеріальна дія сполук **10** та **7** по відношенню до мікроорганізмів *E. coli* та *S. aureus*, відповідно, яка до того була передбачена *in silico*.
5. Скринінг зразків **2-11** на антифунгальну активність по відношенню до дріжджеподібного грибка *C. albicans* виявив наявність такої дії для сполук **6** та **7**. При цьому вони виявляють значну фунгіцидну дію у доволі низьких концентраціях (0,44 та 4,0 мкг, відповідно), що вказує на високу

ефективність та перспективність розробки на їх основі антифунгальних препаратів.

6. Дослідження антиноцицептивної активності дослідних зразків мазей на основі сполуки **8**, що містить фрагмент новокаїну, показало, що місцеві нанесення аплікації засобів сприяли зменшенню больової чутливості у піддослідних тварин, особливо при використанні 5% мазі. Дослідний зразок мазі має перспективи для подальших поглиблених досліджень в якості місцевого знеболюючого засобу

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Дисертаційне дослідження присвячене пошуку ефективного методу синтезу нових амідних похідних інденохіноксалинового ряду, дослідженню їх протолітичних властивостей та встановленню різними методами (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) як потенційних, так і реальних проявів біологічної активності.

1. В ході синтезу індено[1,2-*b*]хіноксалинкарбонової кислоти конденсацією 2,3-діамінобензойної кислоти з нінгідрином встановлено, що за відсутності інших замісників в *o*-фенілендіаминах, наявність карбоксильної групи в 3-положенні кільця діамінів приводить до регіоселективності реакції – утворенню кислоти із карбоксильною групою в положенні 6 інденохіноксалинового каркасу.
2. Запропоновано зручний та ефективний метод синтезу десяти амідних похідних індено[1,2-*b*]хіноксалин-6-карбонової кислоти, із застосуванням як активатора етилового естеру монохлорвугільної кислоти. Показана універсальність цього методу амідкування на прикладі естерів амінокислот, аліфатичних, ароматичних, гетероциклічних амінів та аміноспиртів. Дев'ять амідів отримано та ідентифіковано вперше.
3. Досліджено протолітичні властивості п'яти інденохіноксалинових похідних з лінкерними аміногрупами у складі амідної та розраховано їх константи іонізації. Знайдені значення $pK_{BH^+} = 5,5-7,1$ підтвердили для більшості з них помірні основні властивості за виключенням сполуки із замісником 2,6-піримідил, яка є дуже слабкою основою ($pK_{BH^+} = 1,46$).
4. Методами *in silico* показано, що всі синтезовані амідні похідні за фізико-хімічними та фармакокінетичними показниками можуть бути віднесені до “drug-like”, проте мають доволі значну токсичність. Молекулярний докінг виявив їх потенційну можливість інтеркаляції до ДНК; серед біологічних мішеней для зв'язування переважають ті, що відповідають за реплікацію та поділ клітин, що потенційно передбачає протиінфекційні та протипухлинні властивості синтезованих амідів.

5. Методами спектрофотометрії та флуориметрії доведено високу афіність синтезованих амідів до ДНК. Батохромний зсув смуг поглинання з одночасним гіпохромізмом в електронних спектрах N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду при різних концентраціях ДНК експериментально засвідчує їх взаємодію шляхом інтеркаляції. Решта амідів мають більш складний характер зв'язування.
6. Встановлено, що низка амідів мають антимікробну та антифунгальну дію: N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду щодо *S.aureus*; N-(2-гідроксіетил)-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксаміду – щодо *E.coli*; метил 2-[(11-оксоіндено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]-3-фенілпропаноат та N-[3-(диметиламіно)пропіл]-11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоксамід пригнічують зростання дріжджеподібного грибка *C. albicans*, що вказує на перспективність їх використання як компонентів антибактеріальних та антигрибкових засобів. Дослідження мазей на основі 2-(діетиламіно)етил-4-[(11-оксоіндено[2,1-b]хіноксалін-6-карбоніл)аміно]бензоату, виявило здатність цієї сполуки проявляти анальгезивну дію, що надає потенційну можливість її застосування як місцевого знеболюючого засобу.

Список використаних джерел

1. Montana, M.; Montero, V.; Khoumeri, O.; Vanelle, P. Quinoxaline Derivatives as Antiviral Agents: A Systematic Review. *Molecules* **2020**, 25(12), 2784. [doi:10.3390/molecules25122784](https://doi.org/10.3390/molecules25122784).
2. Montana, M.; Montero, V.; Khoumeri, O.; Vanelle, P. Quinoxaline Moiety: A Potential Scaffold against *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* **2021**, 26 (16), 4742. [doi:10.3390/molecules26164742](https://doi.org/10.3390/molecules26164742).
3. Montana, M.; Mathias, F.; Terme, T.; Vanelle, P. Antitumoral Activity of Quinoxaline Derivatives: A Systematic Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 163, pp 136–147. [doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.053](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.053).
4. Ajani, O.O. Present Status of Quinoxaline Motifs: Excellent Pathfinders in Therapeutic Medicine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 85, pp 688–715. [doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.065](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.065).
5. Pereira, J.A.; Pessoa, A.M.; Cordeiro, M.N.D.S.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Noronha, J.P.; Vieira, M. Quinoxaline, Its Derivatives and Applications: A State of the Art Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 97, pp 664–672. [doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.076](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.076).
6. Gao, H.; Yamasaki, E.F.; Chan, K.K.; Shen, L.L.; Snapka, R.M. DNA Sequence Specificity for Topoisomerase II Poisoning by the Quinoxaline Anticancer Drugs XK469 and CQS. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63(6), pp 1382–1388. [doi:10.1124/mol.63.6.1382](https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1382).
7. Khatoon, H.; Abdulmalek, E. Novel Synthetic Routes to Prepare Biologically Active Quinoxalines and Their Derivatives: A Synthetic Review for the Last Two Decades. *Molecules* **2021**, 26(4), 1055. [doi:10.3390/molecules26041055](https://doi.org/10.3390/molecules26041055).
8. Taiwo, F.O.; Akinpelu, D.A.; Obafemi, C.A. Recent Advances on the Synthesis, Reactions and Evaluation of the Pharmacological Properties of Quinoxaline, Quinoxaline-2-One and Quinoxaline-2,3-Dione. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* **2021**, 22(8), pp 35–54. [doi:10.9734/irjpac/2021/v22i830427](https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i830427).
9. Yashwantrao, G.; Saha, S. Recent Advances in the Synthesis and Reactivity of Quinoxaline. *Org. Chem. Front.* **2021**, 8(5), pp 1039–1055. [doi:10.1039/D0QO01575J](https://doi.org/10.1039/D0QO01575J).
10. Suthar, S.K.; Chundawat, N.S.; Singh, G.P.; Padrón, J.M.; Jhala, Y.K. Quinoxaline: A Comprehension of Current Pharmacological Advancement in

- Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2022**, 5, 100040. [doi:10.1016/j.ejmcr.2022.100040](https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100040).
11. Avula, B.; Chenna, Reddivari Ch.K.R.; Muchumarri, R.M.R.; Eraganaboyina, S.; Zyryanov, G.V.; Nemallapudi, B.R. Recent Advances in the Synthesis of Quinoxalines: A Mini Review. *Polycycl. Aromat. Comp.* **2024**, 44(1), pp 634–670. [doi:10.1080/10406638.2023.2167215](https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2167215).
 12. Ruhemann, S. Cyclic Di- and Tri-Ketones. *J. Chem. Soc. Trans.* **1910**, 97, pp 1438–1449.
 13. Pearson, B.D.; Mitsch, R.A.; Cromwell, N.H. Indenoquinolines. III. Derivatives of 11H-Indeno[1,2-b]quinoxaline and Related Indenoquinolines. *J. Org. Chem.* **1962**, 27(5), pp 1674–1678. [doi:10.1021/jo01052a046](https://doi.org/10.1021/jo01052a046).
 14. Etman, H.A.; Metwally, H.M.; Elkasaby, M.M.; Khalil, A.M.; Metwally, M.A. Green, Two-Component Highly Efficient Reaction of Ninhydrin with Aromatic Amines and Malononitrile Using Ball-Milling Technique. *Am. J. Org. Chem.* **2011**, 1(1), pp 10–13. [doi:10.5923/j.ajoc.20110101.03](https://doi.org/10.5923/j.ajoc.20110101.03).
 15. Ghalib, R.M.; Hashim, R.; Sulaiman, O.; Hemamalini, M.; Fun, H.-K. 11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one. *Acta Crystallogr. Sect. E* **2010**, 66, o1494. [doi:10.1107/S1600536810019252](https://doi.org/10.1107/S1600536810019252).
 16. Wakelin, L.P.G. Polyfunctional DNA Intercalating Agents. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6(3), pp 275–340. [doi:10.1002/med.2610060303](https://doi.org/10.1002/med.2610060303).
 17. Loupy, A.; de la Hoz, A. *Microwaves in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: 2013. [doi: 10.1002/9783527651313](https://doi.org/10.1002/9783527651313)
 18. Azizian, J.; Mohammadizadeh, M.R.; Zomorodbakhsh, S.; Mohammadi, A.A.; Karimi, A.R. Microwave-Assisted One-Pot Synthesis of Some Dicyano-Methylene Derivatives of Indenoquinoxaline and Tryptanthrin under Solvent-Free Conditions. *Arkivoc* **2007**, 15, pp 24–30.
 19. Liao, L.-G.; Song, M.-M.; Feng, J.-F.; Tan, M.; Liu, F.; Qiu, Z.-J.; Zhang, S.; Bang-Jing, L. Green Synthesis of Indeno[1,2-b]quinoxalines Using β -Cyclodextrin as Catalyst. *Molecules* **2022**, 27, 580. [doi:10.3390/molecules27020580](https://doi.org/10.3390/molecules27020580).
 20. Rahimi, Z.; Bayat, M.; Hosseini, H. New Multicomponent Reactions in Water: A Facile Synthesis of 1,3-Dioxo-2-Indanilidene-Heterocyclic Scaffolds and Indenoquinoxalines through Reaction of Ninhydrin-Malononitrile Adduct with Diverse N-Binucleophiles. *RSC Adv.* **2022**, 12(52), pp 33772–33779. [doi:10.1039/d2ra06469c](https://doi.org/10.1039/d2ra06469c).

21. Schepetkin, I.A.; Khlebnikov, A.I.; Potapov, A.S.; Kovrizhina, A.R.; Matveevskaya, V.V.; Belyanin, M.L.; Atochin, D.N.; Zanoza, S.O.; Gaidarzhy, N.M.; Lyakhov, S.A. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of 11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one Derivatives and Tryptanthrin-6-Oxime as c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 161, pp 179–191. [doi:10.1016/j.ejmech.2018.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.023).
22. Дума, Г.І.; Сазонов, К.Д.; Ляхов, Л.С.; Топоров, С.В.; Ляхов, С.А. 6- та 7-Амінометил-11Н-індено[1,2-б]хіноксалін-11-они – синтез, афінітет до ДНК та токсичність. *Вісник Одеськ. нац. унів. Хімія* **2020**, 1(73), с 65–75. [doi:10.18524/2304-0947.2020.1\(73\).198316](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2020.1(73).198316).
23. Deady, L.W.; Desneves, J.; Ross, A.C. Synthesis of Some 11H-Indeno(1,2-b)quinoxalin-11-ones. *Tetrahedron* **1993**, 49(43), pp 9823–9828.
24. Liakhov, S.A.; Schepetkin, I.A.; Karpenko, O.S.; Duma, H.I.; Haidarzhy, N.M.; Kirpotina, L.N.; Kovrizhina, A.R.; Khlebnikov, A.I.; Bagryanskaya, I.Y.; Quinn, M.T. Novel c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitors with an 11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one Scaffold. *Molecules* **2021**, 26(18), pp 5688–5706. [doi:10.3390/molecules26185688](https://doi.org/10.3390/molecules26185688).
25. Бліненко, О.М.; Косюк, М.І.; Карпенко, О.С.; Нестеркіна, М.В.; Кравченко, І.А. Синтез, аналіз і розділення ізомерних індено- та індохіноксалінів. *Вісник Одеськ. нац. унів. Хімія* **2020**, 4(76), с 89–98. [doi:10.18524/2304-0947.2020.4\(76\).216933](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2020.4(76).216933).
26. Gornostaev, L.M.; Rukovets, T.A.; Arnold, E.V.; Lavrikova, T.I.; Khalyavina, J.G.; Kryukovskaya, I.S. On the Reactivity of Benzo[a]phenazine-5,6-dione 7-Oxides with Methanolic Alkali and Pyrrolidine. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 51, pp 166–169.
27. Chowdhury, G.; Sarkar, U.; Pullen, S.; Wilson, W.; Rajapakse, A.; Fuchs-Knotts, T.; Gates, K. DNA Strand Cleavage by the Phenazine Di-N-Oxide Natural Product Myxin under Both Aerobic and Anaerobic Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25(1), pp 197–206. [doi:10.1021/tx2004213](https://doi.org/10.1021/tx2004213).
28. Sehlstedt, U.; Aich, P.; Bergman, J.; Vallberg, H.; Nordén, B.; Gräslund, A. Interactions of the Antiviral Quinoxaline Derivative 9-OH-B220 {2,3-Dimethyl-6-(dimethylaminoethyl)-9-hydroxy-6H-indolo-[2,3-b]quinoxaline} with Duplex and Triplex Forms of Synthetic DNA and RNA. *J. Mol. Biol.* **1998**, 278(1), pp 31–56. [doi:10.1006/jmbi.1998.1670](https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1670).

29. Shibinskaya, M.O.; Lyakhov, S.A.; Mazepa, A.V.; Andronati, S.A.; Turov, A.V.; Zholobak, N.M.; Spivak, N.Y. Synthesis, Cytotoxicity, Antiviral Activity and Interferon Inducing Ability of 6-(2-Aminoethyl)-6H-Indolo[2,3-b]quinoxalines. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2010**, 45, pp 1237–1243. [doi:10.1016/j.ejmech.2009.12.014](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.014).
30. Sasane, N.A.; Meshram, G.A.; Bhise, K.S.; Popatkar, B.B. Facile, One Pot Synthesis of Indoloquinoxaline and Its Derivatives Using Aqueous Orange Peel Extract at Room Temperature. *IJAR SCT* **2022**, 2(3), pp 129–133. [doi:10.48175/IJAR SCT-3073](https://doi.org/10.48175/IJAR SCT-3073).
31. Карпенко, О.С.; Бойко, О.О.; Шибінська, М.О.; Кутузова, Н.А.; Ляхов, С.А. Синтез та афінитет до ДНК 1-Діалкіламіно-3-Індола[2,3-б]Хіноксалін-6-Ілпропан-2-Олів. *Вісник Одеськ. нац. унів. Хімія* **2018**, 3(67), с 40–49. [doi:10.18524/2304-0947.2018.3\(67\).140799](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2018.3(67).140799).
32. Deady, L.W.; Kaye, A.J. Fused Tetracyclic Quinoxalines from Reactions of *o*-Phenylenediamines in Polyphosphoric Acid. *Aust. J. Chem.* **1997**, 50(5), pp 473–478. [doi:10.1071/C96170](https://doi.org/10.1071/C96170).
33. Shibinskaya, M.O.; Karpenko, A.S.; Lyakhov, S.A.; Andronati, S.A.; Zholobak, N.M.; Spivak, N.Y.; Samochina, N.A.; Shafran, L.M.; Zubritsky, V.F. Synthesis and Biological Activity of 7H-Benzo[4,5]Indolo[2,3-b]-Quinoxaline Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46(2), pp 794–798. [doi:10.1016/j.ejmech.2010.11.040](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.040).
34. Israel, M. 6H-Indeno[1,2-b]pyrido[3,2-e]pyrazines. A New Heterocyclic Ring System. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, 9(2), pp 255–262. [doi:10.1002/jhet.5570090213](https://doi.org/10.1002/jhet.5570090213).
35. Wang, S.; Liu, S.; Zhang, J.; Zhang, W.; Jiang, G.; Fan, X.; Xie, Y.; Li, S.; Zhou, G.; Qin, X.S. Indene(1,2-b)quinoxaline-11-One Oxime Derivatives and Preparation Methods and Uses Thereof. *Patent China No. 201310248361*, Patent Agency, National Patent and Trademark Office, Ltd., 13112, June 20, 2013.
36. Tseng, C.H.; Chen, Y.R.; Tzeng, C.C.; Liu, W.; Chou, C.K.; Chiu, C.C.; Chen, Y.L. Discovery of Indeno[1,2-b]quinoxaline Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 108, pp 258–273. [doi:10.1016/j.ejmech.2015.11.031](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.031).
37. Deady, L.W.; Kaye, A.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. Synthesis and Antitumor Properties of *N*-[2-(Dimethylamino)ethyl]carboxamide Derivatives of Fused Tetracyclic Quinolines and Quinoxalines: A New Class of

- Putative Topoisomerase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1997**, 40(13), pp 2040–2046. [doi:10.1021/jm970044r](https://doi.org/10.1021/jm970044r).
38. Deady, L.W.; Desneves, J.; Kaye, A.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. Synthesis and Antitumor Activity of Some Indeno[1,2-b]quinoline-Based Bis Carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, pp 977–984. [doi:10.1016/s0968-0896\(00\)00039-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00039-0).
39. Tantawy, E.S.; Amer, A.M.; Mohamed, E.K.; Abd Alla, M.M.; Nafie, M.S. Synthesis, Characterization of Some Pyrazine Derivatives as Anti-Cancer Agents: *In Vitro* and *In Silico* Approaches. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1210, 128013. [doi:10.1016/j.molstruc.2020.128013](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128013).
40. Abd El Salam, H.A.; El-Bendary, M.A.; Ibrahim, M.; El-Samahy, F.A. Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of Indeno[1,2-b]quinoxaline Derivatives as Antifungal and Antibacterial Agents. *Egypt. J. Chem.* **2020**, 63(7), pp 2577–2590. [doi:10.21608/ejchem.2020.21366.2275](https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.21366.2275).
41. Gomaa, M.A.M.; El-Katatny, M.H.; Ali H.A. Synthesis and Characterization of *N'*-(11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-ylidene) Benzohydrazonamides as Potential Antimicrobial Agents. *Synth. Commun.* **2020**, 50(18), pp 2819–2829. [doi:10.1080/00397911.2020.1786122](https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1786122).
42. Gopal, B.; Velmathi, S. Quinoxaline-Based Redox Relay Receptor for Iodide Ions and Its Application Towards Real Sample Analysis and Logic Gate Function. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 256, pp 126–134. [doi:10.1016/j.snb.2017.10.082](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.082).
43. Eldeken, G.A.; El-Samahy, F.A.; Zayed, E.M.; Osman, F.H.; Elgemeie, G.E. Synthesis, Biological Activities and Molecular Docking Analysis of a Novel Series of 11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one Derivatives. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1261, 132929. [doi:10.1016/j.molstruc.2022.132929](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132929).
44. Azizian, J.; Karimi, A.R.; Kazemizadeh, Z.; Mohammadi, A.A.; Mohammadizadeh, M. R. Silica Sulfuric Acid-Catalyzed Reaction of 4-Hydroxyproline with 11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one and Isatin Derivatives: A Novel Synthesis of New Pyrrole Compounds. *Synthesis* **2005**, 7, pp 1095–1098.
45. Karimi, A.R.; Behzadi, F.; Amini, M.M. Highly Efficient Synthesis of 3-Pyrrolyl-Indolinones and Pyrrolyl-Indeno[1,2-b]quinoxalines Catalyzed by Heteropolyacids. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, pp 5393–5396. [doi:10.1016/j.tetlet.2008.07.015](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.015).

46. Yadav, J.S.; Reddy, B.S.; Jain, R.; Reddy, C.S. Dy(OTf)₃ as a Versatile Catalyst for the Synthesis of 3-Pyrrolyl-Indolinones and Pyrrolyl-Indeno[1,2-b]quinoxalines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48(18), pp 3295–3298. [doi:10.1016/j.tetlet.2007.02.134](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.02.134).
47. Shaabanzadeh, M.; Khabari, F. One-Pot and Diastereoselective Synthesis of New Spiro[indenoquinoxalin-Cyclopropane] Derivatives. *ARKIVOC* **2009**, 11, pp 307–315.
48. Rad, J.A.; Jarrahpour, A.; Ersanlı, C.C.; Atioglu, Z.; Akkrut, M.; Turos, E. Synthesis of Some Novel Indeno[1,2-b]quinoxalin Spiro-β-Lactam Conjugates. *Tetrahedron* **2017**, 73, pp 1135–1142. [doi:10.1016/j.tet.2017.01.009](https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.01.009).
49. Azizian, J.; Karimi, A.R.; Mohammadi, A.A.; Mohammadizadeh, M.R. Three-Component Synthesis of Some γ-Spiroiminolactones under Microwave-Assisted Solvent-Free Conditions. *Heterocycles* **2004**, 63(10), pp 2225–2229.
50. Maghsoodlou, M.T.; Habibi-Khorassani, S.M.; Moradi, A.; Hazeri, N.; Davodi, A.; Sajadikhah, S.S. One-Pot Three-Component Synthesis of Functionalized Spirolactones by Means of Reaction Between Aromatic Ketones, Dimethyl Acetylenedicarboxylate, and N-Heterocycles. *Tetrahedron* **2011**, 67, pp 8492–8495. [doi:10.1016/j.tet.2011.09.017](https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.017).
51. Yazdani-Elah-Abadia, A.; Maghsoodlou, M.-T.; Mohebat, R.; Heydaria, R. An Efficient Domino One-Pot Synthesis of Novel Spirofurane-Indenoquinoxalines by Vinyltriphenylphosphonium Salts. *J. Chem. Sci.* **2017**, 129(6), pp 691–698. [doi:10.1007/s12039-017-1292-4](https://doi.org/10.1007/s12039-017-1292-4).
52. Narayanarao, M.; Koodlur, L.; Revanasiddappa, V.G.; Gopal, S.; Kamila, S. Multicomponent Synthesis of Spiropyrrolidine Analogues Derived from Vinylindole/Indazole by a 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, 12(1), pp 2893–2897. [doi:10.3762/bjoc.12.288](https://doi.org/10.3762/bjoc.12.288).
53. Arumugam, N.; Almansour, A.I.; Kumar, R.S.; Alaqeel, S.I.; Krishna, V.S.; Sriram, D. Anti-Tubercular Activity of Novel Class of Spiropyrrolidine Tethered Indenoquinoxaline Heterocyclic Hybrids. *Bioorg. Chem.* **2020**, 99, pp 103799–103806. [doi:10.1016/j.bioorg.2020.103799](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103799).
54. Bouali, N.; Hammouda, M.B.; Ahmad, I.; Ghannay, S.; Thouri, A.; Dbeibia, A.; Patel, H.; Hamadou, W.S.; Hosni, K.; Snoussi, M.; Adnan, M.; Hassan, M.I.; Noumi, E.; Aouadi, K.; Kadri, A. Multifunctional Derivatives of Spiropyrrolidine Tethered Indeno-Quinoxaline Heterocyclic Hybrids as Potent Antimicrobial, Antioxidant and Antidiabetic Agents: Design, Synthesis, *In Vitro*

- and *In Silico* Approaches. *Molecules* **2022**, *27*(21), 7248. [doi:10.3390/molecules27217248](https://doi.org/10.3390/molecules27217248).
55. Singh, R.; Bhardwaj, D.; Saini, M.R. Recent Advancement in the Synthesis of Diverse Spiro-Indeno[1,2-b]quinoxalines: A Review. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 4760. [doi:10.1039/d0ra09130h](https://doi.org/10.1039/d0ra09130h).
 56. Obot, I.B.; Obi-Egbedi, N.O. Indeno-1-One [2,3-b]quinoxaline as an Effective Inhibitor for the Corrosion of Mild Steel in 0.5M H₂SO₄ Solution. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *122*, pp 325–328. [doi:10.1016/j.matchemphys.2010.03.037](https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.03.037).
 57. Kumari, R.; Singh, M. Photocatalytic Reduction of Fluorescent Dyes in Sunlight by Newly Synthesized Spiroindenoquinoxaline Pyrrolizidines. *ACS Omega* **2020**, *5*, pp 23201–23218. [doi:10.1021/acsomega.0c02976](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02976).
 58. Mukherjee, A.; Sasikala, W. D. Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2013**, *92*, pp 1–62.
 59. Lauria, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Dattolo, G.; Almerico, A.M. DNA Minor Groove Binders: An Overview on Molecular Modeling and QSAR Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*(20), pp 2136–2160. [doi:10.2174/092986707781389673](https://doi.org/10.2174/092986707781389673).
 60. Almaqwashi, A.A.; Paramanathan, T.; Rouzina, I.; Williams, M.C. Mechanisms of Small Molecule-DNA Interactions Probed by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*(9), pp 3971–3988. [doi:10.1093/nar/gkw237](https://doi.org/10.1093/nar/gkw237).
 61. Galindo-Murillo, R.; Cheatham, T.E. Ethidium Bromide Interactions with DNA: An Exploration of a Classic DNA-Ligand Complex with Unbiased Molecular Dynamics Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*(7), pp 3735–3747. [doi:10.1093/nar/gkab143](https://doi.org/10.1093/nar/gkab143).
 62. Krey, A.K.; Hahn, F.E. Berberine: Complex with DNA. *Science* **1969**, *166*, pp 755–757. [doi:10.1126/science.166.3906.755](https://doi.org/10.1126/science.166.3906.755).
 63. Shafer, R.H.; Waring, M.J. DNA Bis-Intercalation: Application of Theory to the Binding of Echinomycin to DNA. *Biopolymers* **1980**, *19*(2), pp 431–443. [doi:10.1002/bip.1980.360190216](https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190216).
 64. Dikic, J.; Seidel, R. Anticooperative Binding Governs the Mechanics of Ethidium-Complexed DNA. *Biophys. J.* **2019**, *116*(8), pp 1394–1405. [doi:10.1016/j.bpj.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.03.005).
 65. Faridi, J.; Nielsen, K.E.; Stein, P.C.; Jacobsen, J.P. Dynamic Bis-Intercalation of a Homodimeric Thiazole Orange Dye in DNA: Evidence of Intercalator

- Creeping. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, 15(2), pp 321–332. [doi:10.1080/07391102.1997.10508195](https://doi.org/10.1080/07391102.1997.10508195).
66. Venugopal, S.; Sharma, V.; Mehra, A.; Singh, I.; Singh, G. DNA Intercalators as Anticancer Agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, 100(4), pp 580–598. [doi:10.1111/cbdd.14116](https://doi.org/10.1111/cbdd.14116).
67. Wright, R.G.; Wakelin, L.P.; Fieldes, A.; Acheson, R. M.; Waring, M. J. Effects of Ring Substituents and Linker Chains on the Bifunctional Intercalation of Diacridines into Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **1980**, 19(25), pp 5825–5836. [doi:10.1021/bi00566a026](https://doi.org/10.1021/bi00566a026).
68. Waring, M. J. Overview of the Interaction between Chemotherapeutic Agents and DNA. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1986**, 12(6–7), pp 441–453.
69. Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W.D. *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*; Wiley-VCH, 2003; p. 754.
70. Sangshetti, J.; Pathan, S.K.; Patil, R.; Ansari, S.A.; Chhajed, S.; Arote, R.; Shinde, D.B. Synthesis and Biological Activity of Structurally Diverse Phthalazine Derivatives: A Systematic Review. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27(18), pp 3979–3997. [doi:10.1016/j.bmc.2019.07.050](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.050).
71. Khalifa, M.M.; Al-Karmalawy, A.A.; Elkaeed, E.B.; Nafie, M.S.; Tantawy, M.A.; Eissa, I.H.; Mahdy, H.A. Topo II Inhibition and DNA Intercalation by New Phthalazine-Based Derivatives as Potent Anticancer Agents: Design, Synthesis, Anti-Proliferative, Docking, and *In Vivo* Studies. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, 37(1), pp 299–314. [doi:10.1080/14756366.2021.2007905](https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2007905).
72. Song, F.; Liu, D.; Huo, X.; Qiu, D. The Anticancer Activity of Carbazole Alkaloids. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2022**, 355(1), e2100277. [doi:10.1002/ardp.202100277](https://doi.org/10.1002/ardp.202100277).
73. Braña, M.F.; Ramos, A. Naphthalimides as Anti-Cancer Agents: Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2001**, 1(3), pp 237–255. [doi:10.2174/1568011013354624](https://doi.org/10.2174/1568011013354624).
74. Chen, Z.; Xu, Y.; Qian, X. Naphthalimides and Analogues as Antitumor Agents: A Review on Molecular Design, Bioactivity, and Mechanism of Action. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, 29(12), pp 1741–1756. [doi:10.1016/j.cclet.2018.09.020](https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.09.020).
75. Ferguson, L.R.; Denny, W.A. Genotoxicity of Non-Covalent Interactions: DNA Intercalators. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623(1–2), pp 14–23. [doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014).

76. Tseng, C.H.; Chen, Y.L.; Lu, P.J.; Yang, C.N.; Tzeng, C.C. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Certain Indeno[1,2-c]quinoline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, pp 3153–3162. [doi:10.1016/j.bmc.2007.12.028](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.028).
77. Tseng, C.H.; Chen, Y.L.; Chung, K.Y.; Cheng, C.M.; Wang, C.H.; Tzeng, C.C. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of 6-Arylindeno[1,2-c]quinoline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, pp 7465–7476. [doi:10.1016/j.bmc.2009.09.021](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.09.021).
78. Tseng, C.H.; Tzeng, C.C.; Chung, K.Y.; Kao, C.L.; Hsu, C.Y.; Cheng, C.M.; Huang, K.S.; Chen, Y.L. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of 6-Aryl-11-Iminoindeno[1,2-c]quinoline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, pp 7653–7663. [doi:10.1016/j.bmc.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.014).
79. Tseng, C.H.; Tzeng, C.C.; Yang, C.L.; Lu, P.J.; Chen, H.L.; Li, H.Y.; Chuang, Y.C.; Yang, C.N.; Chen, Y.L. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Certain Indeno[1,2-c]quinoline Derivatives. Part 2. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, pp 6164–6179. [doi:10.1021/jm1005447](https://doi.org/10.1021/jm1005447).
80. Deady, L.W.; Desneves, J.; Kaye, A.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. Positioning of the Carboxamide Side Chain in 11-Oxo-11H-indeno[1,2-b]quinolinecarboxamide Anticancer Agents: Effects on Cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, pp 445–452. [doi:10.1016/s0968-0896\(00\)00264-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00264-9).
81. Deady, L.W.; Desneves, J.; Kaye, A.J.; Thompson, M.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. Ring-Substituted 11-Oxo-11H-indeno[1,2-b]quinoline-6-carboxamides with Similar Patterns of Cytotoxicity to the Dual Topo I/II Inhibitor DACA. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, pp 2801–2809. [doi:10.1016/s0968-0896\(99\)00231-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00231-x).
82. Schepetkin, I.A.; Kirpotina, L.N.; Hammaker, D.; Kochetkova, I.; Khlebnikov, A.I.; Lyakhov, S.A.; Firestein, G.S.; Quinn, M.T. Anti-Inflammatory Effects and Joint Protection in Collagen-Induced Arthritis after Treatment with IQ-1S, a Selective c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, 353, pp 505–516. [doi:10.1124/jpet.114.220251](https://doi.org/10.1124/jpet.114.220251).
83. Nie, Z.; Xia, X.; Zhao, Y.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Wang, J. JNK Selective Inhibitor, IQ-1S, Protects the Mice against Lipopolysaccharides-Induced Sepsis. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 30, 115945. [doi:10.1016/j.bmc.2020.115945](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115945).
84. Atochin, D.N.; Schepetkin, I.A.; Khlebnikov, A.I.; Seledtsov, V.I.; Swanson, H.; Quinn, M.T.; Huang, P.L. A Novel Dual NO-Donating Oxime and

- c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor Protects against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Neurosci. Lett.* **2016**, 618, pp 45–49. [doi:10.1016/j.neulet.2016.02.033](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.033).
85. Jin, W.; Stokes, J.M.; Eastman, R.T.; Itkin, Z.; Zakharov, A.V.; Collins, J.J.; Jaakkola, T.S.; Barzilay, R. Deep Learning Identifies Synergistic Drug Combinations for Treating COVID-19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, 118, e2105070118. [doi:10.1073/pnas.2105070118](https://doi.org/10.1073/pnas.2105070118).
 86. Akondi, A.M.; Mekala, S.; Kantam, M.L.; Trivedi, R.; Chowhan, L.R.; Das, A. An Expedient Microwave-Assisted Regio- and Stereoselective Synthesis of Spiroquinoxaline Pyrrolizine Derivatives and Their AChE Inhibitory Activity. *New J. Chem.* **2017**, 41, pp 873–878. [doi:10.1039/C6NJ02869A](https://doi.org/10.1039/C6NJ02869A).
 87. Khan, M.S.; Munawar, M.A.; Ashraf, M.; Alam, U.; Ata, A.; Asiri, A.M.; Kousar, S.; Khan, M.A. Synthesis of Novel Indenoquinoxaline Derivatives as Potent α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, pp 1195–1200. [doi:10.1016/j.bmc.2013.12.024](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.12.024).
 88. Hameed, Sh.; Saleem, F.; Özil, M.; Baltaş, N.; Salar, U.; Ashraf, S.; Ul-Haq, Z.; Taha, M.; Khan, K.M. Indenoquinoxaline-Phenylacrylohydrazide Hybrids as Promising Drug Candidates for the Treatment of Type 2 Diabetes: In Vitro and In Silico Evaluation of Enzyme Inhibition and Antioxidant Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 263(2), 129517. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.129517](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129517).
 89. Ren, W.; Zhao, Q.; Yu, M.; Guo, L.; Chang, H.-M.; Jiang, X.; Luo, Y.-F.; Huang, W.; He, G. Design and Synthesis of Novel Spirooxindole-Indenoquinoxaline Derivatives as Novel Tryptophanyl-tRNA Synthetase Inhibitors. *Mol. Divers.* **2020**, 24, pp 1043–1063. [doi:10.1007/s11030-019-10011-2](https://doi.org/10.1007/s11030-019-10011-2).
 90. Fu, L.; Shi, S.; Yi, J.; Wang, N.; He, Y.; Wu, Z.; Peng, J.; Deng, Y.; Wang, W.; Wu, C.; Lyu, A.; Zeng, X.; Zhao, W.; Hou, T.; Cao, D. ADMETlab 3.0: An Updated Comprehensive Online ADMET Prediction Platform Enhanced with Broader Coverage, Improved Performance, API Functionality and Decision Support. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52(1), pp 422–431. [doi:10.1093/nar/gkae236](https://doi.org/10.1093/nar/gkae236).
 91. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, pp 3–25. [doi:10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).

92. Dong, J.; Wang, N.; Yao, Z.J.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Lu, A.P.; Cao, D.S. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *Journal of Cheminformatics* **2018**, 10(29). doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x
93. Sahoo, R.N.; Pattanaik, S.; Pattnaik, G.; Mallick, S.; Mohapatra, R. Review on the Use of Molecular Docking as the First Line Tool in Drug Discovery and Development. *Indian J. Pharm. Sci.* **2022**, 84(5), pp 1334–1337.
94. Meng, X.Y.; Zhang, H.X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, 7, pp 146–157. [doi:10.2174/157340911795677602](https://doi.org/10.2174/157340911795677602).
95. Smyth, M.S.; Martin, J.H. X-Ray Crystallography. *Mol. Pathol.* **2000**, 53, pp 8–14. [doi:10.1136/mp.53.1.8](https://doi.org/10.1136/mp.53.1.8).
96. Sugiki, T.; Kobayashi, N.; Fujiwara, T. Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-Dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2017**, 15, pp 328–339. [doi:10.1016/j.csbj.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.04.001).
97. Nakane, T.; Kotecha, A.; Sente, A.; McMullan, G.; Masiulis, S.; Brown, P.M.G.E.; Grigoras, I.T.; Malinauskaite, L.; Malinauskas, T.; Miehl, J.; Uchański, T.; Yu, L.; Karia, D.; Pechnikova, E.V.; de Jong, E.; Keizer, J.; Bischoff, M.; McCormack, J.; Tiemeijer, P.; Hardwick, S.W.; Chirgadze, D.Y.; Murshudov, G.; Aricescu, A.R.; Scheres, S.H.W. Single-Particle Cryo-EM at Atomic Resolution. *Nature* **2020**, 587(7832), pp 152–156. [doi:10.1038/s41586-020-2829-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2829-0).
98. Paggi, J.M.; Pandit, A.; Dror, R.O. The Art and Science of Molecular Docking. *Annu. Rev. Biochem.* **2024**, 93, pp 389–410. [doi:10.1146/annurev-biochem-030222-120000](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000).
99. Wang, X.; Shen, Y.; Wang, S.; Li, S.; Zhang, W.; Liu, X.; Li, H. PharmMapper 2017 Update: A Web Server for Potential Drug Target Identification with a Comprehensive Target Pharmacophore Database. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, pp 356–360. [doi:10.1093/nar/gkx374](https://doi.org/10.1093/nar/gkx374).
100. Griffin, R.J.; Calvert, A.H.; Curtin, N.J.; Newell, D.R.; Golding, B.T. U.S. Patent 6,310,082, October 30, 2001.
101. Schmidt, A.; Gholipour, S.A.; Nieger, M. On Benzo[b][1,4]diazepinium-Olates, -Thiolates, and -Carboxylates as Anti-Hückel Mesomeric Betaines. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, pp 4342–4350. <https://doi.org/10.1039/b308412d>

102. Li, J.; Sha, Y.A. Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* **2008**, 13, pp 1111–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules13051111>
103. Совін, О. Р.; Пацай, І.О. Програма “SpectroCalc–H5A” для розрахунку констант кислотності на основі спектрофотометричних даних. *Методи та об’єкти хім. аналізу* **2012**, 7(2), с 74–80.
104. Antonini, I.; Polucci, P.; Kelland, L.R.; Menta, E.; Pescalli, N.; Martelli, S. 2,3-Dihydro-1H,7H-Pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-Trione Derivatives, a Class of Cytotoxic Agents Active on Multidrug-Resistant Cell Lines: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, 42(14), pp 2535–2541. <https://doi.org/10.1021/jm9805586>
105. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A. A Second Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, pp 5179–5197.
106. Chien, H. T.; Wasi, A. N.; Hamid, N.; Ahmad, N.; Han, L. L. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiology* **2017**, 17(36). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0936-3>
107. Terry, L.R.; Richard, A.M.; Andrew, L.N.; Sarah, D.; Hélène, A.B.; Tracy, J.W.; Lisa, M. Assay Guidance Manual [Online]; Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (accessed May 1, 2013; last update July 1, 2016).
108. AAT Bioquest. Quest Graph™ Absorption [Resorufin]. <https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/resorufin> (accessed March 9, 2025).
109. Еберле, Л.В.; Коберник, А.О.; Кравченко, А.І. Аналгетична активність густого екстракту імбиру. *Актуальні проблеми транспортної медицини* **2017**, 4(50), с 120-125.
110. Нефьодов, О.О.; Еберле, Л.В.; Цісак, А.О.; Грицук, О.І.; Александрова, О.І.; Гузенко, О.М.; Шкодовська, А.М.; Бурега, І.Ю. Оцінка антиноцицептивної та антиексудативної дії комплексного фітопрепарату в терапії соматичного болю та запалення різного генезу. *Світ медицини та біології* **2023**, 3(85), с 224-229. [doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293327](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293327)

111. Молодан, Ю.О.; Ларіонов, В.Б.; Борисюк, І.Ю.; Макаренко, О.А. Тваринні моделі *in vivo* для скринінгу потенційних протизапальних та знеболювальних засобів. *Вісник Одеського національного університету. Серія Біологія*; **2023**, 28, 2(53), с 113-127. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293327](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293327)
112. Еберле, Л.В. Фармакологічне обґрунтування терапевтичної активності екстракту *zingiber officinale* на моделях запалення та аналгезії. Дисертація канд. біол. наук, Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеський національний медичний університет, 2019.
113. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 року № 3447-IV. Відомості Верховної Ради України. 2006. № 27. Ст. 230.
114. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg: Council of Europe. Eur. Treaty Series. N 123. 11 p.
115. Lipinski, C.A. Lead- and Drug-Like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, 1(4), pp 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
116. Wang, X.; Shen, Y.; Wang, S.; Li, S.; Zhang, W.; Liu, X.; Li, H. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, pp. W356-W360. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx374>
117. Gatasheh, M.K.; Kannan, S.; Hemalatha, K.; Imrana, N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala International Journal of Modern Science* **2017**, 3(4), pp 272–278. [doi:10.1016/j.kijoms.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.07.003)
118. Rich, D.H.; Singh, J. Chapter 5 - The Carbodiimide Method. In *Major Methods of Peptide Bond Formation*; Gross, E., Meienhofer, J., Eds.; Academic Press: New York, 1979; Vol. 1, pp 241–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-304201-9.50011-4>
119. Hermanson, G.T. Chapter 4 - Zero-Length Crosslinkers. In *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Academic Press: New York, 2013; pp 259–273. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00004-2>
120. Meienhofer, J. Chapter 6 - The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptide Synthesis. In *Major Methods of Peptide Bond Formation*; Gross, E.,

- Meienhofer, J., Eds.; Academic Press: New York, 1979; Vol. 1, pp 263–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-304201-9.50012-6>
121. Noguchi, T.; Sekine, M.; Yokoo, Y.; Jung, S.; Imai, N. Convenient Preparation of Primary Amides via Activation of Carboxylic Acids with Ethyl Chloroformate and Triethylamine under Mild Conditions. *Chem. Lett.* **2013**, 42(6), pp 580–582. <https://doi.org/10.1246/cl.130096>
122. Сазонов, К.Д.; Ішков, Ю.В. Розробка зручного варіанту синтезу нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з естерами α , β , γ -амінокислот. *Проблеми та досягнення сучасної хімії*, Тези Доповідей XXII Наукової Молодіжної Конференції, Одеса, Україна, Вересень 14-15, 2023; ФХІ ім. О.В. Богатського: Одеса, 2023; с 24.
123. Сазонов, К.Д.; Ішков, Ю.В.; Шевченко, О.В. Кількісне визначення афінитету до ДНК нових похідних хіноксалінового ряду з естерами амінокислот. *Modern chemistry of medicines*, Тези Доповідей Міжнародної internet-конференції, Одеса, Україна, Вересень 25, 2024; НФУ: Харків; с 117.
124. Sazonov, K.D.; Ishkov, Yu.V. Development of an effective method for synthesis of new derivatives of indenoquinoxaline carboxylic acids with esters of α -, β -amino acids. *Вісник Одеського національного університету. Серія Хімія*; **2024**, 1(87), pp 91-98. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1\(87\).307869](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1(87).307869)
125. Archana, K.; Rajesh, K.S. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorg. Chem.* **2020**, 96, 103578. [doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103578](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103578)
126. Vishal, V.; Chandra, P. J.; Alka, A.; Sakshi, S.; Udichi, K. A Review on Pharmacological Aspects of Pyrimidine Derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* **2020**, 10(5), pp 358-361.
127. Сазонов, К.Д.; Ішков, Ю.В. Синтез нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з амінами та дослідження їх афінитету до ДНК. *Хімія і сучасні технології*, Тези Доповідей XI Міжнародної Науково-практичної інтернет-конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених, Дніпро, Україна, Грудень 06-07, 2023; ДВНЗ «УДХТУ»: Дніпро; с 74.
128. Sazonov, K.D.; Ishkov, Yu.V.; Shevchenko, O.V. Synthesis of new derivatives of indenoquinoxalinecarboxylic acids with amines and in silico prediction of

- their biological activity. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii* **2024**, 6, pp 40-46. [doi: 10.32434/0321-4095-2024-157-6-40-46](https://doi.org/10.32434/0321-4095-2024-157-6-40-46)
129. Сазонов, К.Д.; Еберле, Л.В.; Шевченко, О.В.; Ішков, Ю.В. Синтез амідних похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з аміноетанолом і морфоліном та дослідження їх біологічної активності. *Хімічні проблеми сьогодення*, Тези Доповідей VIII Міжнародної (XVIII Української) Наукової Конференції студентів, аспірантів і молодих учених, Вінниця, Україна, Березень 25-27, 2025; ДНУ ім. Василя Стуса: Вінниця; с 37.
130. Ekins, S.; Lane, T.R.; Madrid, P.B. Tilorone: a Broad-Spectrum Antiviral Invented in the USA and Commercialized in Russia and beyond. *Pharm Res.* **2020**; 37(4), 71. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02799-8>. Erratum in: *Pharm Res.* **2020**; 37(12), 239. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02969-8>
131. Сазонук, К.Д.; Ішков, Ю.В.; Шевченко, О.В. Нові біологічно активні амідни інденохіноксалін-6-карбонової кислоти: Синтез, властивості та афінитет до ДНК. *Інноваційні напрями розвитку хімії*, Тези Доповідей І наукової конференції з міжнародною участю, Одеса, Україна, Вересень 9-11, 2024; ОНУ імені І. І. Мечникова: Одеса, с 79.
132. Heiko, I.; Daniela, O. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA – General Principles and Recent Developments. *Supramolecular Dye Chemistry, Topics in Current Chemistry* **2005**, 258, 5. <http://dx.doi.org/10.1007/b135804>
133. Sazonov, K.D.; Ishkov, Yu.V.; Shevchenko, O.V. Acid-base properties and affinity to DNA of indenoquinolinecarboxylic acid derivatives. *Journal of Chemistry and Technologies* **2024**, 32(4), pp 916-923. [doi: 10.15421/jchemtech.v32i4.311315](https://doi.org/10.15421/jchemtech.v32i4.311315)
134. Peltonen, K.; Colis, L.; Liu, H.; Jaamaa, S.; Moore, H.M.; Enback, J.; Laakkonen, P.; Vaahtokari, A.; Jones, R.J.; af Hallstrom, T.M.; Laiho, M. Identification of novel p53 pathway activating small-molecule compounds reveals unexpected similarities with known therapeutic agents. *PLoS.One.* **2010**, 5(9), 12996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012996>
135. Tomoki, N.; Tadashi, O.; Andrew, M. K.; Naohiko, S.; Yoichi, T.; Kazuo, S. DNA Binding of Tilorone: ¹H NMR and Calorimetric Studies of the Intercalation. *Biochemistry* **2007**, 46, pp 8156-8163. <https://doi.org/10.1021/bi602402m>

136. Широбоков, В.П. *Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія, 3-е вид.*; Підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів: Вінниця, 2011; с. 952.
137. Reyes, E.A.; Bale, M.J.; Cannon, W.H.; Matsen, J.M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar. *J Clin Microbiol.* **1981**, 13(3), pp 456-458. [doi:10.1128/jcm.13.3.456-458.1981](https://doi.org/10.1128/jcm.13.3.456-458.1981)
138. Banerjee, S.; Batabyal, K.; Joardar, S.N.; Isore, D.P.; Dey, S.; Samanta, I.; Samanta, T.K.; Murmu, S. Detection and characterization of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* from bovine subclinical mastitis in West Bengal, India. *Vet World* **2017**, 10(7), pp 738-742. [doi: 10.14202/vetworld.2017.738-742](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.738-742)
139. Nirmala, B.; Omar, B.J. Enhancing Staphyloxanthin Synthesis in *Staphylococcus aureus* Using Innovative Agar Media Formulations. *Cureus.* **2024**, 16(5), 59892. [doi:10.7759/cureus.59892](https://doi.org/10.7759/cureus.59892)
140. Ting-Li, H.; Sergey, T.; Richard, D.C.; Silas, G.V. Metabolic Response of *Candida albicans* to Phenylethyl Alcohol under Hyphae-Inducing Conditions. *PLoS One.* **2013**, 8(8), 71364. [doi: 10.1371/journal.pone.0071364](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071364)

Список опублікованих праць за темою дисертації***праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:***

1. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V. Development of an effective method for synthesis of new derivatives of indenoquinoxaline carboxylic acids with esters of α -, β -amino acids. *Вісник Одеського національного університету. Хімія*; **2024**, 1(87), 91-98. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1\(87\).307869](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2024.1(87).307869) (Фахове видання, Категорія Б). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*
2. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Synthesis of new derivatives of indenoquinoxalinecarboxylic acids with amines and in silico prediction of their biological activity. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*. **2024**, 6, pp 40-46. <http://dx.doi.org/10.32434/0321-4095-2024-157-6-40-46> (Scopus, Q4). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*
3. **Sazonov K.D.**, Ishkov Yu.V., Shevchenko O.V. Acid-base properties and affinity to DNA of indenoquinoxalinecarboxylic acid derivatives. *Journal of Chemistry and Technologies* **2024**, 32(4), pp 916-923. <https://doi.org/10.15421/jchemtech.v32i4.311315> (Scopus, Q4). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*

праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Сазонов К.Д.**, Ішков Ю.В. Розробка зручного варіанту синтезу нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з естерами α , β , γ -амінокислот. *Проблеми та досягнення сучасної хімії*, Тези Доповідей XXII Наукової Молодіжної Конференції, Одеса, Україна, Вересень 14-15, 2023; ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України: Одеса, 2023; с 24. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці тез до друку.*

2. **Сазонов К.Д., Ішков Ю.В.** Синтез нових похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з амінами та дослідження їх афінитету до ДНК. *Хімія і сучасні технології*, Тези Доповідей XI Міжнародної Науково-практичної інтернет-конференції здобувачів вищої освіти та молодих учених, Дніпро, Україна, Грудень 06-07, 2023; ДВНЗ «УДХТУ»: Дніпро; с 74. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці тез до друку.*

3. **Сазонюк К.Д., Ішков Ю.В., Шевченко О.В.** Нові біологічно активні амідні інденохіноксалін-6-карбонової кислоти: Синтез, властивості та афінитет до ДНК. *Інноваційні напрями розвитку хімії*, Тези Доповідей I наукової конференції з міжнародною участю, Одеса, Україна, Вересень 9-11, 2024; ОНУ імені І. І. Мечникова: Одеса, с 79. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці тез до друку.*

4. **Сазонов К.Д., Ішков Ю.В., Шевченко О.В.** Кількісне визначення афінитету до ДНК нових похідних хіноксалінового ряду з естерами амінокислот. *Modern chemistry of medicines*, Тези Доповідей Міжнародної internet-конференції, Харків, Україна, Вересень 25, 2024; НФУ: Харків; с 117. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці тез до друку.*

5. **Сазонов К.Д., Еберле Л.В., Шевченко О.В., Ішков Ю.В.** Синтез амідних похідних інденохіноксалін-6-карбонової кислоти з аміноетанолом і морфоліном та дослідження їх біологічної активності. *Хімічні проблеми сьогодення*, Тези Доповідей VIII Міжнародної (XVIII Української) Наукової Конференції студентів, аспірантів і молодих учених, Вінниця, Україна, Березень 25-27, 2025; ДНУ ім. Василя Стуса: Вінниця; с 74. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці тез до друку.*

«ЗАТВЕРЖДУЮ»
Проректор з наукової роботи
д-р біол. наук, проф.

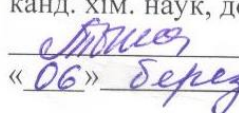
Володимир ІВАНІЦЯ
«06» березня 2025 р.
МП

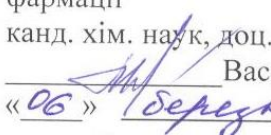
«ЗАТВЕРЖДУЮ»
Проректор з науково-педагогічної
роботи д-р екон. наук, проф.

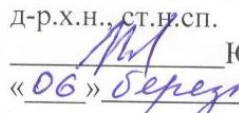
Ірина ЛОМАЧИНСЬКА
«11» березня 2025 р.
МП

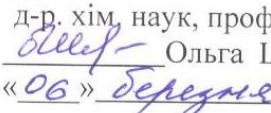
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів дисертаційного дослідження
у освітній процес Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова

Наукові та науково-практичні результати дисертаційної роботи «Синтез та біологічна активність нових амідних похідних інденохіноксалінового ряду» впроваджено здобувачем Сазоновим Кирилом Дмитровичем в освітній процес на кафедрі органічної та фармацевтичної хімії факультету хімії та фармації ОНУ імені І.І. Мечникова при розробці лабораторної роботи «Синтез 6-інденохіноксалінкарбонової кислоти» до дисципліни «Хімія ароматичних та гетероциклічних сполук» для студентів 3 курсу першого (бакалаврського) рівня освіти спеціальності 102 Хімія (ОПП Хімія та ОПП Фармацевтична хімія).

Заступник декана з наукової роботи
факультету хімії та фармації,
канд. хім. наук, доц.

Алла ТИМЧУК
«06» березня 2025 р.

Декан факультету хімії та
фармації
канд. хім. наук, доц.

Василь МЕНЧУК
«06» березня 2025
р.

Науковий керівник
д-р.х.н., ст.н.сп.

Юрій ІШКОВ
«06» березня 2025 р.

Завідувач кафедри органічної та
фармацевтичної хімії
д-р. хім. наук, проф.

Ольга ШЕВЧЕНКО
«06» березня 2025 р.

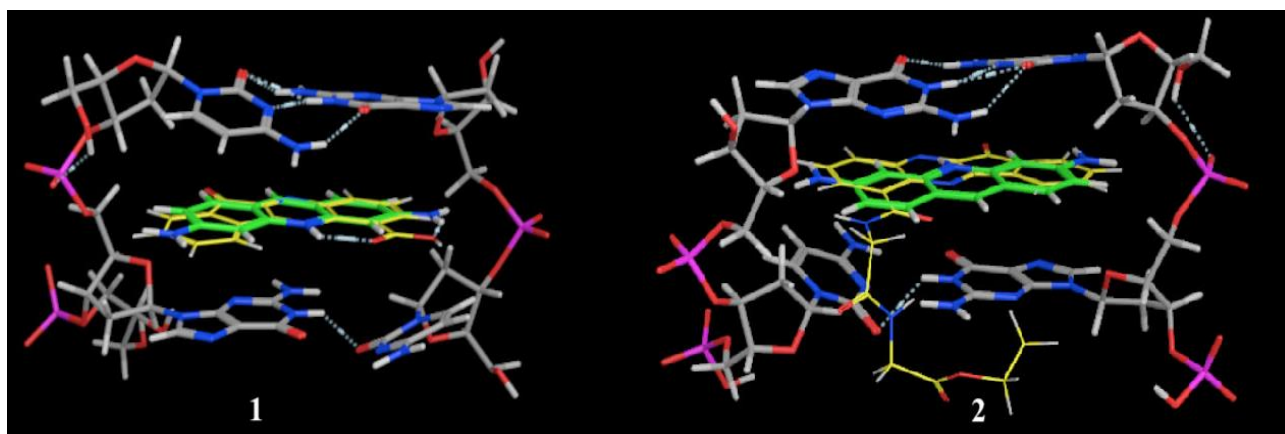


Рис. 1. Розташування сполук **1**, **2** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)

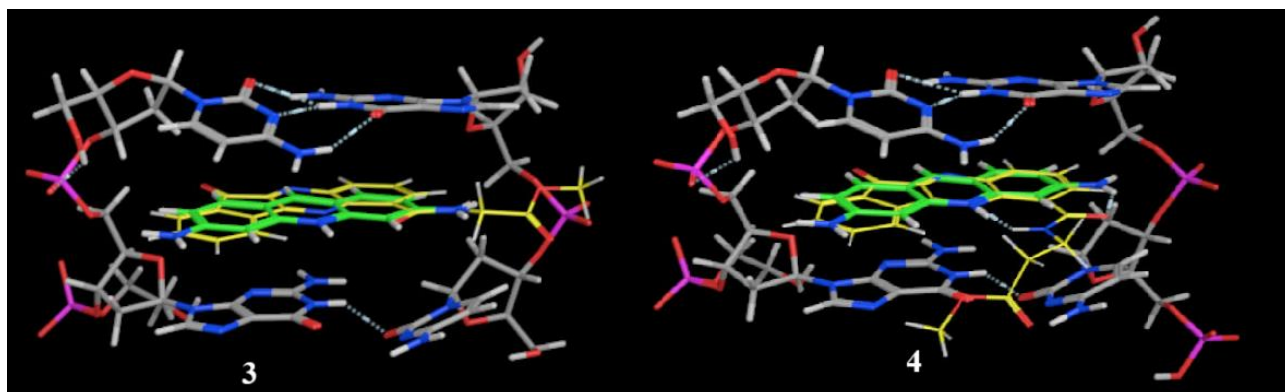


Рис. 2. Розташування сполук **3**, **4** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)

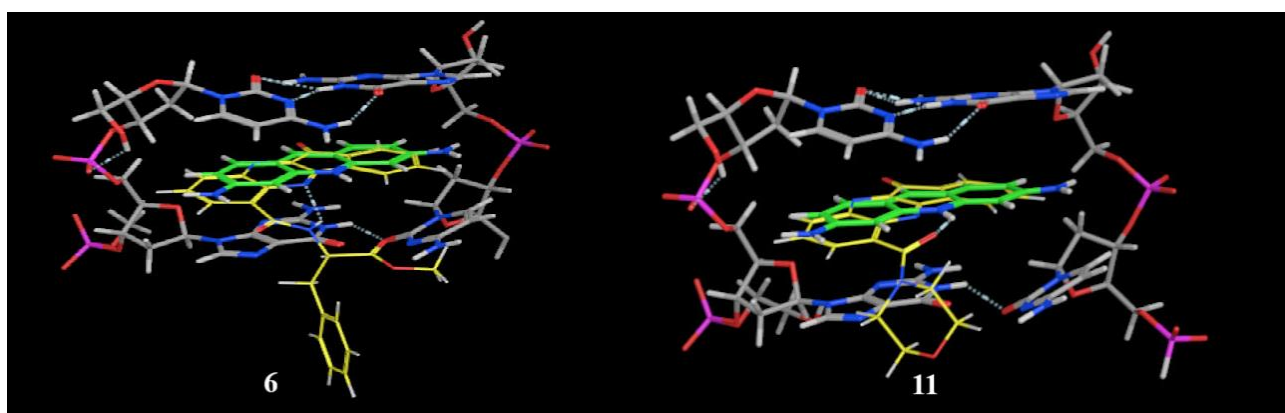


Рис. 3. Розташування сполук **6**, **11** в кармані зв'язування (жовтим кольором) профлавіну (зеленим кольором)