Назва роботи: «Синтез та біологічна активність похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів та 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів»

Шифр - «Похідні хіноксалінів»

2020

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ 3
1. Фармакологічні властивості індолохіноксалінів 5
2. Фармакологічна роль інденохіноксалінонів..... 7
3. Синтез похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів та 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів..... 9
4. Біологічна активність цільових продуктів..... 10
5. Вивчення продуктів синтезу за допомогою ВЕРХ 11
6. Розділення ізомерів 14
7. Висновки 17
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 18

АНОТАЦІЯ

Синтез та біологічна активність похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів та 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів

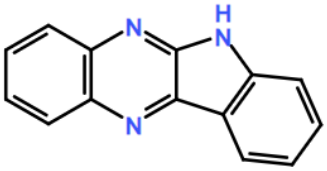
Бліненко О.М., Косюк М.І. – Одеса: ОНПУ, 2020 – 19 с., Табл. 2, рис.13.

Метою роботи є синтез похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів та 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів, як потенційних противірусних та протизапальних препаратів. Актуальність цієї роботи зумовлена необхідністю розробки нових високоефективних лікувальних засобів. В ході роботи було синтезовано похідні індолохіноксалінів та інденохіноксалінонів, досліджено їх біологічну активність.

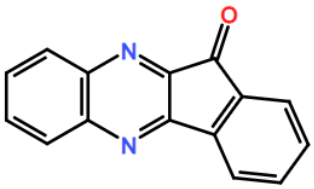
КЛЮЧОВІ СЛОВА: індолохіноксаліни, інденохіноксалінони, інгібітори JNK, індуктори інтерферону.

Сучасна пандемія COVID-19, нещодавно минулі епідемії атипічної пневмонії (SARS), MERS, свинячого та пташиного (меншою мірою) грипу а також – історично відомі пандемії іспанського, азіатського та гонконгського типів грипу поєднані, по-перше – збудником вірусного походження, та, по-друге – тяжкими запальними наслідками інфекції (саме запальні процеси легенів були причиною абсолютної більшості летальних випадків). Сучасні засоби терапії націлені на прояв противірусного та протизапального ефектів, причому втілюється це шляхом застосування декількох препаратів. З точки зору підвищення ефективності та зниження негативного впливу на організм, було б доцільно зменшити поступання надлишкових хіміотерапевтичних засобів. Цього можна досягнути шляхом розроблення нових, високоефективних противірусних та протизапальних засобів, або, навіть, поєднавши ці властивості у одній молекулі.

Раніше було показано [1], що похідні індоло[2,3-b]хіноксаліну (1) рис. 1 мають виражені противірусні властивості в експериментах in vitro. Другою групою авторів [2] була знайдена висока протизапальна активність у похідних інденохіноксаліну (2). Як видно, згадані сполуки – структурно дуже схожі і можуть навіть, вважатися аналогами одна одної. Таким чином, було доцільно розширити спектр існуючих похідних індоло- та індено-хіноксалінів та вивчити їхні біологічні властивості.



1

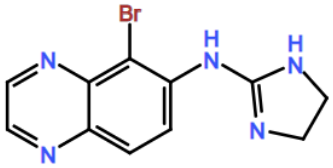


2

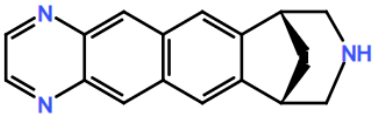
Рис. 1 Структура індоло[2,3-b]хіноксаліну та 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону

Фрагмент хіноксаліну присутній в багатьох біологічно активних речовинах, деякі з них приведені на рис 2. Бримонідин (3) володіє властивістю зменшувати внутрішньоочний тиск і використовується для лікування відкритокутової глаукоми або очної гіпертензії, вареніклин (4) використовують проти куріння, хіноцилін (5) має антибіотичну дію, гідроксиметилхіноксаліндіоксид (Діоксидин)

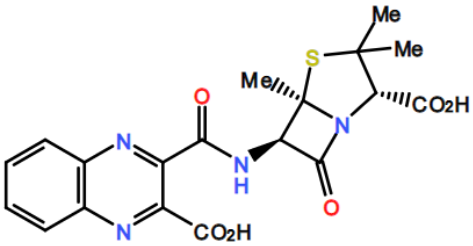
(6) застосовують як антибактеріальний засіб, має високу активність проти збудників, які не чутливі до антибіотиків. Деякі речовини мають виражені протимікробні та противірусні властивості [3].



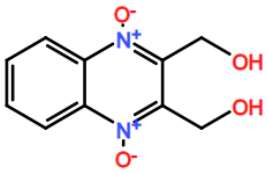
3



4



5



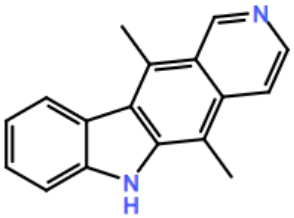
6

Рис. 2. Приклади біоактивних молекул із хіноксаліновим фрагментом

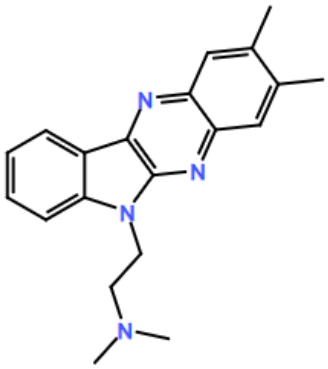
1. Фармакологічні властивості індолохіноксалінів

Індольний фрагмент входить до складу багатьох фізіологічно активних речовин, широко поширених в природі; похідні індолу є, зокрема, низькомолекулярними регуляторами центральної нервової системи людини [4]. Відомі похідні індолу - арбідол; ізохіноліну - дротаверін, папаверін, які здатні індукувати активність інтерферону, необхідного при лікуванні гострих респіраторних вірусних інфекцій.

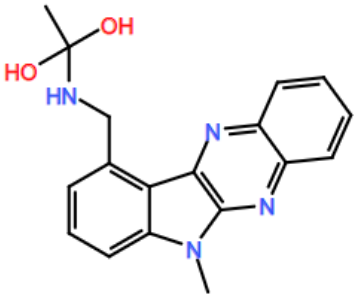
6Н-Індоло[2,3-b]хіноксаліни (1), рис. 1 - трициклічні системи, серед яких знайдені речовини з противірусною, антитоксичною, протигрибковою активністю. Плоска структура цієї сполуки сприяє інтеркаляції у ДНК, яка в свою чергу відповідає за цитотоксичність та противірусну активність [5]. При дослідженні похідних індолохіноксалінів виявлено, що присутність циклічних замісників або заміщених первинних атомів вуглецю посилює цитотоксичність щодо клітинних ліній HL60 [6].



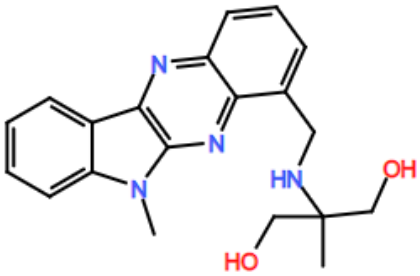
7



8



9



10

Рис. 3 Структурна формула 6Н-індоло[2,3-b]хіноксаліну та його деяких похідних

Індолохіноксалін – структурний аналог еліптицину (7), інгібітора ферменту топоізомерази II. [7] Еліптицин проявляє протиракову активність, проте через високу токсичність не може застосовуватись в лікувальних препаратах. Тому продовжувались дослідження з використанням індолохіноксаліну. У молекулі було замінено метильні групи у позиції 5 і 11 атомами азоту, що підвищило ефективність сполуки проти лімфоми Беркітта, що має вірусне походження. Так було синтезовано 2,3-діметил-6-(2-діметиламіноетил)-6Н-індоло(2,3-b)хіноксалін (В-220) (8), який пригнічує спонтанне перекисне окислення, ефективний проти аутоімунних запальних захворювань (множинний склероз, ревматоїдний артрит і т.д.), проявив противірусну активність щодо вірусу простого герпесу типу 1 (HSV1), цитомегаловірусу (CMV) та вірусу варицели-зостер (VZV) [8]. Механічно В-220 вбудовується в спіраль ДНК і порушує етапи, які є життєво важливими для вірусу. NCA0424 (2-метил-2-[(6-метил-6Н-індоло[2,3-b]хіноксалін-4-іл) метиламіно]-1,3-пропандіол) (9) та його позиційний ізомер NCA0465(10), є також похідними індолохіноксаліну. NCA0424 також продемонстрував протипухлинну активність[9].

Виражену противірусну активність проявили похідні 6-заміщеного індолохіноксаліну [1], дещо перевершивши препарат порівняння – аміксин.

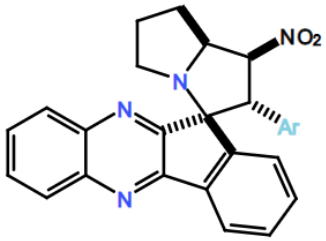
Як бачимо, пошук похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів, які можуть використовуватись в якості лікарських засобів є актуальним завданням.

2. Фармакологічна роль інденохіноксалінонів

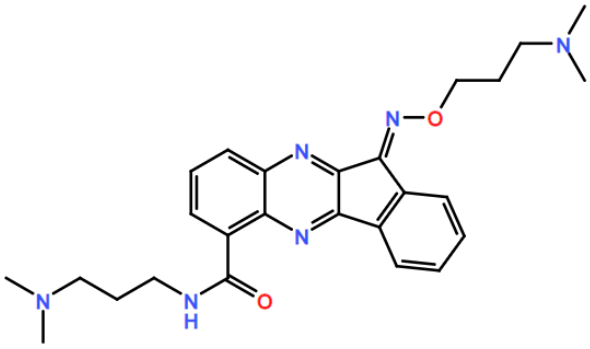
Похідні 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-она зарекомендували себе в якості перспективних протиракових та протизапальних агентів, засобів лікування діабету другого типу, засобів лікування туберкульозу та ліків від нейродегенеративних розладів.

Також описані похідні, здатні інгібувати ацетилхолінестеразу при низьких значеннях IC50 та можуть застосовуватися для лікування нейродегенеративних розладів, таких як хвороба Альцгеймера. Зокрема спіропіролізидин (11, рис. 4), за своєю активністю в 20 разів перевищує відомий медичний препарат галантамін.

Також важливими похідними є протипухлинні препарати, до яких одна із головніших вимог – селективність до пухлинних клітин і мінімальний вплив на соматичні клітини. Добре задовольняє ці потреби 11-{[3-(діметиламіно)пропоксі] аміно}-N-[3-(діметиламіно)пропіл]-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-6-карбоксамід, (12), який показав добру селективність та інгібування саме пухлинних клітин, посиленою антипроліферативною діяльністю. [2].



11

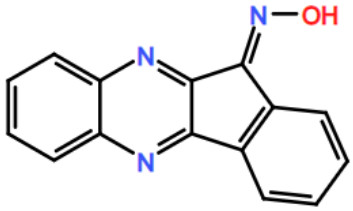


12

Рис. 4. Приклади похідних 11Н- індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону

N-Термінальні кінази c-Jun (JNK) належать до сімейства мітогенактивованих протеїнкіназ (MAPK), які активуються у відповідь на різні стресові подразники, такі як ультрафіолетове опромінення, окислювальний стрес, тепловий та осмотичний шок та ішемічно-реперфузійне пошкодження мозку і серця [10]. JNK1 і JNK2 містяться у всіх клітинах і тканинах організму, тоді як JNK3 знаходиться переважно в мозку, серці та яєчках [12]. Показано, що JNK відіграють важливу роль у регуляції сигнальних шляхів, що беруть участь в апоптозі, некрозі, запаленні та ішемії / реперфузійній травмі. Вони беруть участь у широкому діапазоні захворювань, включаючи ревматоїдний артрит, остеоартрит, розсіяний склероз, запальні захворювання кишечника, резистентність до інсуліну, пухлини, інсульт, ішемія нирок та хвороби Альцгеймера та Паркінсона [13]. . Значна кількість фармакологічних та генетичних даних свідчить про те, що пригнічення передачі сигналів JNK може представляти перспективну терапевтичну стратегію [14]. Селективні інгібітори JNK1/3 можуть мати клінічну користь при лікуванні нейродегенеративних розладів. Однак було важко розробити селективні інгібітори JNK через високу ідентичність послідовностей серед ізоформ JNK (від 73 до 75%) і, зокрема, ідентичність послідовності їхніх кишень, що зв'язують АТФ (близько 98%) [15].
Було ідентифіковано новий клас інгібіторів JNK на основі 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-ону (2), рис. 1.

Зокрема, 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он-оксим (13) та його аналоги пригнічують активність JNK і, отже, протизапальну продукцію цитокінів у мишачих та людських лейкоцитів [16].



13

Рис. 5. Структура 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он-оксима (13)

Також виявлено, що 13 зменшує запалення та втрату хряща, пов'язані з колаген-індукованим артритом (КІА), і захищає від ішемії головного мозку перфузійних травм у мишей [17]. Таким чином, припускається, що модифікація 13 шляхом введення різних замісників може підвищити ефективність та / або селективність отриманих аналогів щодо ізоформ JNK.

3. Синтез похідних 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів та 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів

Синтез похідних індолохіноксалінів здійснювали реакцією індол-2,3-діону (ізатину) з заміщеними 1,2-діамінобензолами (орто-фенілендіамінами) в киплячій оцтовій кислоті (рис. 6 А). Отримані похідні 6Н-індоло[2,3-b]хіноксаліну — 2-нітро-6Н-індоло[2,3-b]хіноксалін та 3-нітро-6Н-індоло[2,3-b]хіноксалін, табл. 1 (14), 1,3-дихлоро-6Н-індоло[2,3-b]хіноксалін та 2,4-дихлоро-6Н-індоло[2,3-b] хіноксалін, табл. 1. (15).

Для синтезу інденохіноксалінонів використовували 2,2-дігідрокси-індан-1,3-діон (нінгідрін) та заміщені 1,2-діамінобензоли (орто-фенілендіаміни), реакцію проводили в киплячому етиловому спирті (рис. 6 Б). Отримані похідні — 7-нітроіндено[1,2-b]хіноксалін-11-он та 8-нітроіндено[1,2-b]хіноксалін-11-он(16), 6,8-дихлор-11Н-індено[1,2-b]хіноксалін- 11-он та 7,9-дихлор- 11Н-індено[1,2-b]хіноксалін-11-он, табл. 1. (17).

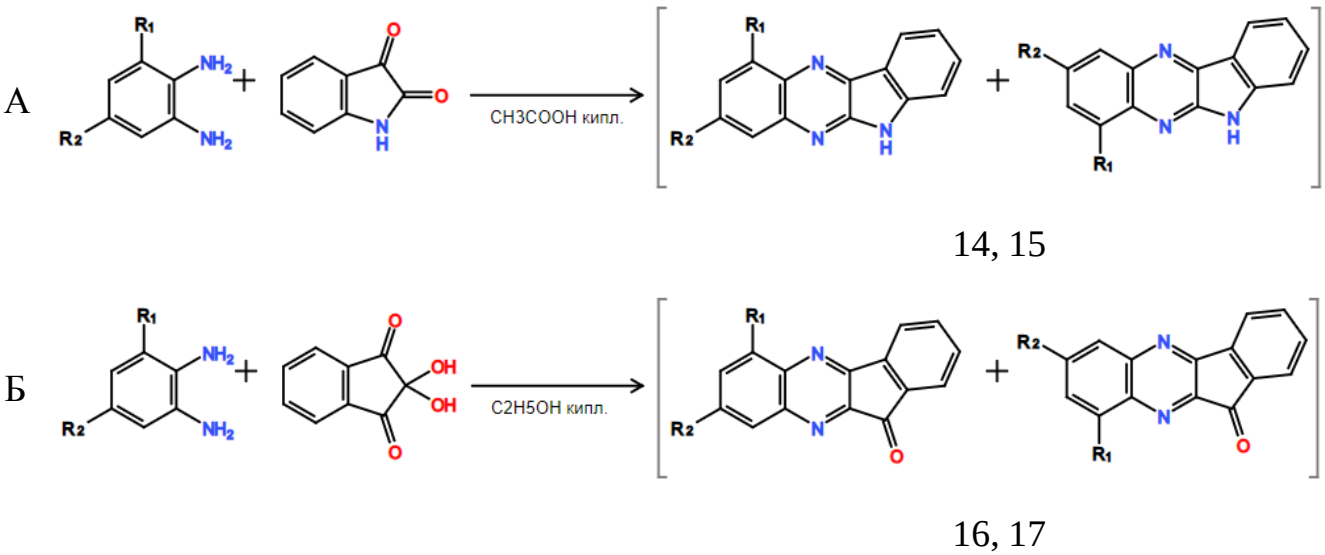


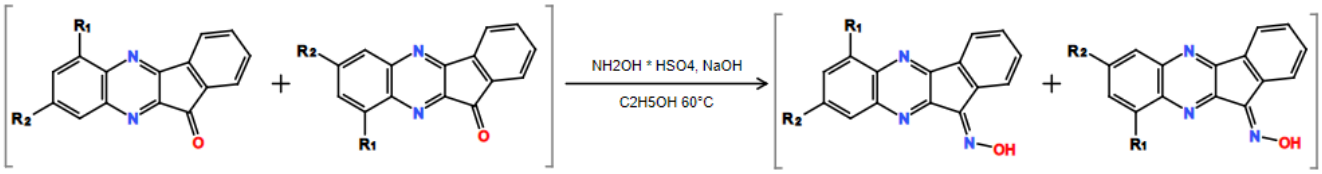
Рис 6. Схема синтезу похідних індолохіноксаліну А та інденохіноксалінону Б

Таблиця 1

Положення замісників у молекулах

Сполука	R_1	R_2
14	H	NO_2
15	Cl	Cl
16	H	NO_2
17	Cl	Cl
18	H	NO_2
19	Cl	Cl

Оксими інденохіноксалінонів отримували за схемою приведеною на рис 7, аналогічно [2].



16, 17 18, 19

Рис 7. Схема синтезу оксимів інденохіноксалінонів

4. **Біологічна активність цільових продуктів**

Похідні 11H-індено[1,2-b]хіноксалін-11-онів оцінювали на їх здатність зв'язуватися з трьома ізоформами JNK у порівнянні з оксимом 13, а результати, представлені в таблиці 2, демонструють, що похідні 11H-індено[1,2-b] хіноксалін11-ону є потенційними інгібіторами JNK.

Таблиця 2

Активність оксимів похідних інденохіноксалінонів

Сполука		R_1	R_2	JNK1	JNK2	JNK3	NF-kB/AP-1	IL-6
				K_d (μM)			IC_{50} (μM)	
1	**індоло**хіноксаліни	H	H	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
14		H	NO_2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
15		Cl	Cl	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
13	**інденох**іноксаліни	H	H	0.24±0.11	0.36±0.054	0.1±0.036	2.3±0.4	3.8±0.8
18		H	NO_2	6.0±0.21	12.0±1.41	4.3±0.28	2.7±0.7	3.0±1.2
19		Cl	Cl	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

N.A. - відсутнє інгібування при концентрації < 40 μM

При проведенні експерименту з виявлення продукції активних форм кисню (люмінісцентне визначення на моделі клітин кісткового мозку) 6Н-індоло[2,3-b]хіноксалін та похідні нітро-6Н-індоло[2,3-b]хіноксаліну проявили слабку активність, а похідні дихлор-6Н-індоло[2,3-b]хіноксаліну високу активність, що свідчить про високий протизапальний потенціал цих речовини в умовах організму.

Наразі, тривають детальні біологічні дослідження.

5. Вивчення продуктів синтезу за допомогою ВЕРХ

Було визначено чистоту отриманих продуктів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням УФ детектора. При синтезі ізомерних сполук 14 їхня чистота становила 85,6 %, а для сполук 15 - 94,6 %. Під час синтезу сполук 14 та 15 окрім цільових продуктів утворюються

побічні продукти, які становлять основну частину домішок. При синтезі сполук 16 та 17 домішки не було виявлено.

Ізомерні речовини 14 досліджували за допомогою хромато-мас-спектрометру з типом іонізації ESI+, хроматограму приведено на рис. 8.

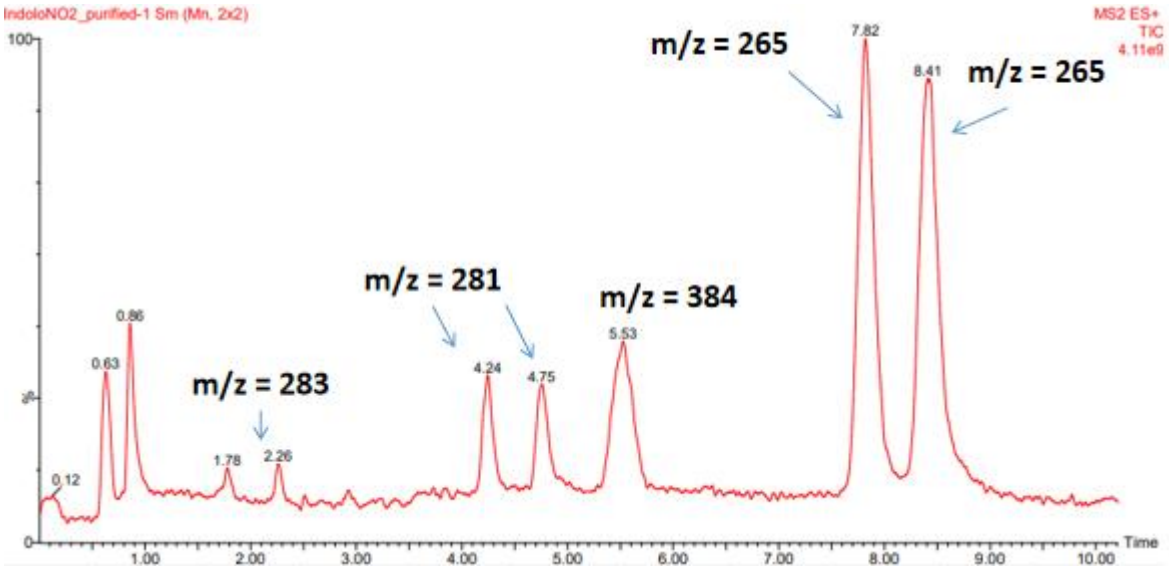


Рис. 8 - Хроматограма синтезованих ізомерних сполук 14

На хроматограмі ідентифіковано піки з часом утримання 2,26 хв. та співвідношенням m/z=283, часом утримання 4,24 та 4,75 хв. (m/z=281), що відповідають побічним продуктам реакції; піки з часом утримання 7,82 та 8,41 хв. та m/z=265, що відповідає значенню $[M+H]^+$ для цільових ізомерів.

Хроматограму ізомерних сполук 16 приведено на рис. 9.

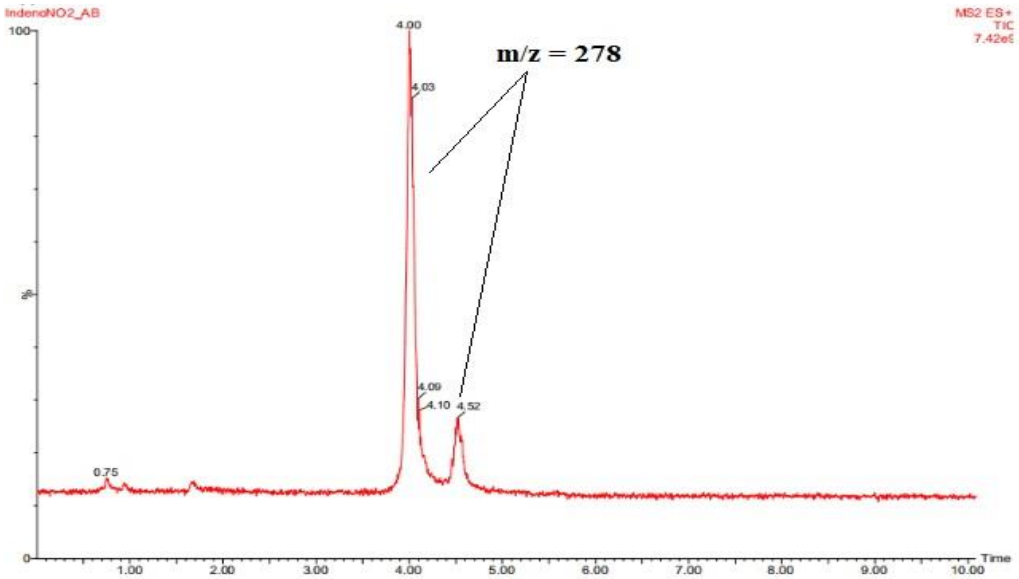


Рис. 9 Хроматограма синтезованих ізомерних сполук 16.

На хроматограмі ідентифіковано піки з часом утримання 4,00 та 4,52 хв. із значенням m/z=278, що відповідає значенню $[M+H]^+$ для цільових ізомерів. Хроматограму сполук 17 приведено на рис. 10.

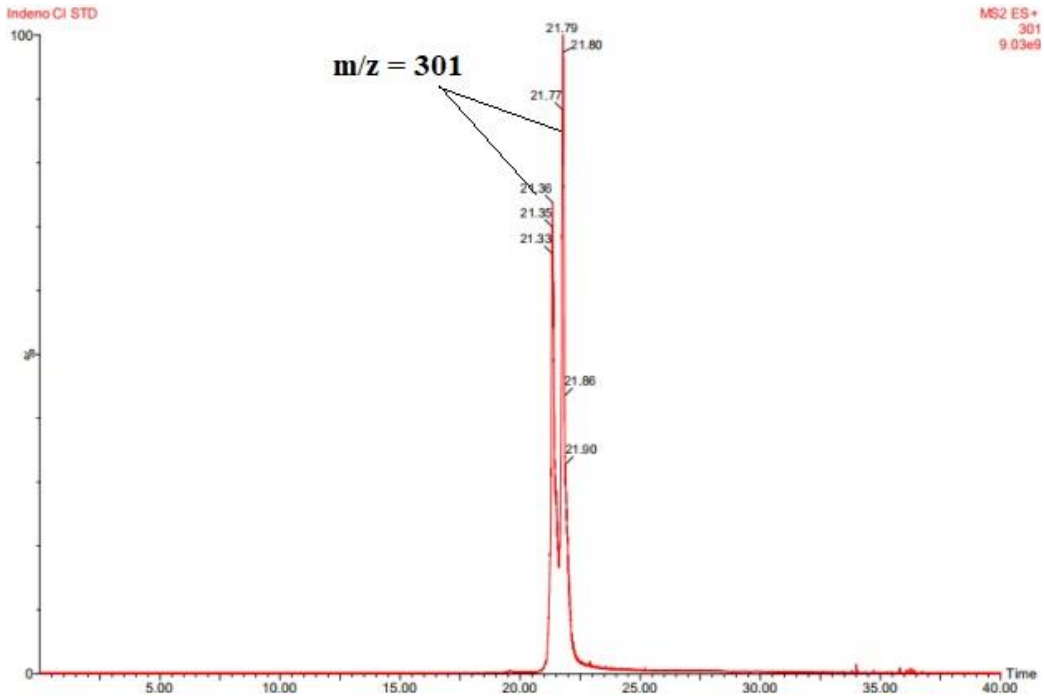


Рис.10 Хроматограма ізомерних синтезованих сполук 17.

На хроматограмі ідентифіковано піки з часом утримання 21.36 та 21.79 хв. із значенням m/z=301, що відповідає значенню $[M+H^+]^+$ для цільових ізомерів.

Ізомерні сполуки 15 досліджували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (рис. 11).

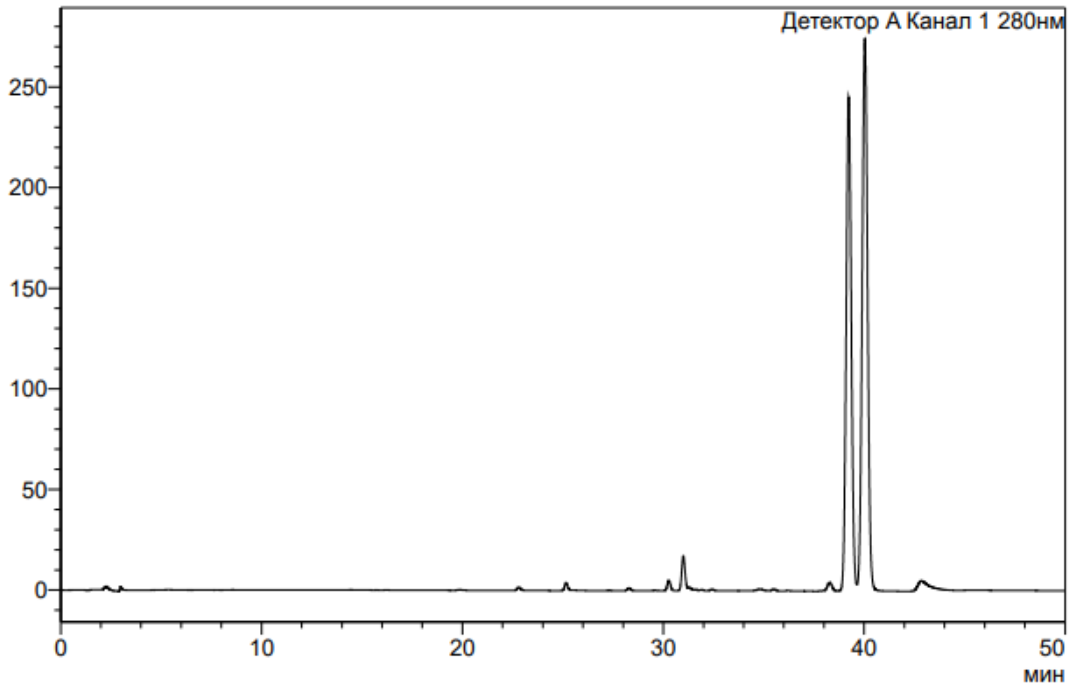


Рис.11 Хроматограма синтезованих ізомерних сполук 15

На хроматограмі присутні два піки с близьким часом утримання (39.2 та 40.0 хв.), що свідчить про те, що ці речовини ймовірно є ізомерами.

6. Розділення ізомерів

Дослідження біологічної активності проводились для суміші ізомерів синтезованих сполук, тому було поставлено завдання розділити ізомери для подальшого вивчення кожного з них, адже відомо, що вони можуть проявляти різну активність. Для розділення використовувався метод тонкошарової хроматографії. Вдалося виділити один ізомер з суміші нітро-6Н-індоло[2,3-b]хіноксалінів, що підверджено за допомогою хромато-мас-спектрометру (рис.12).

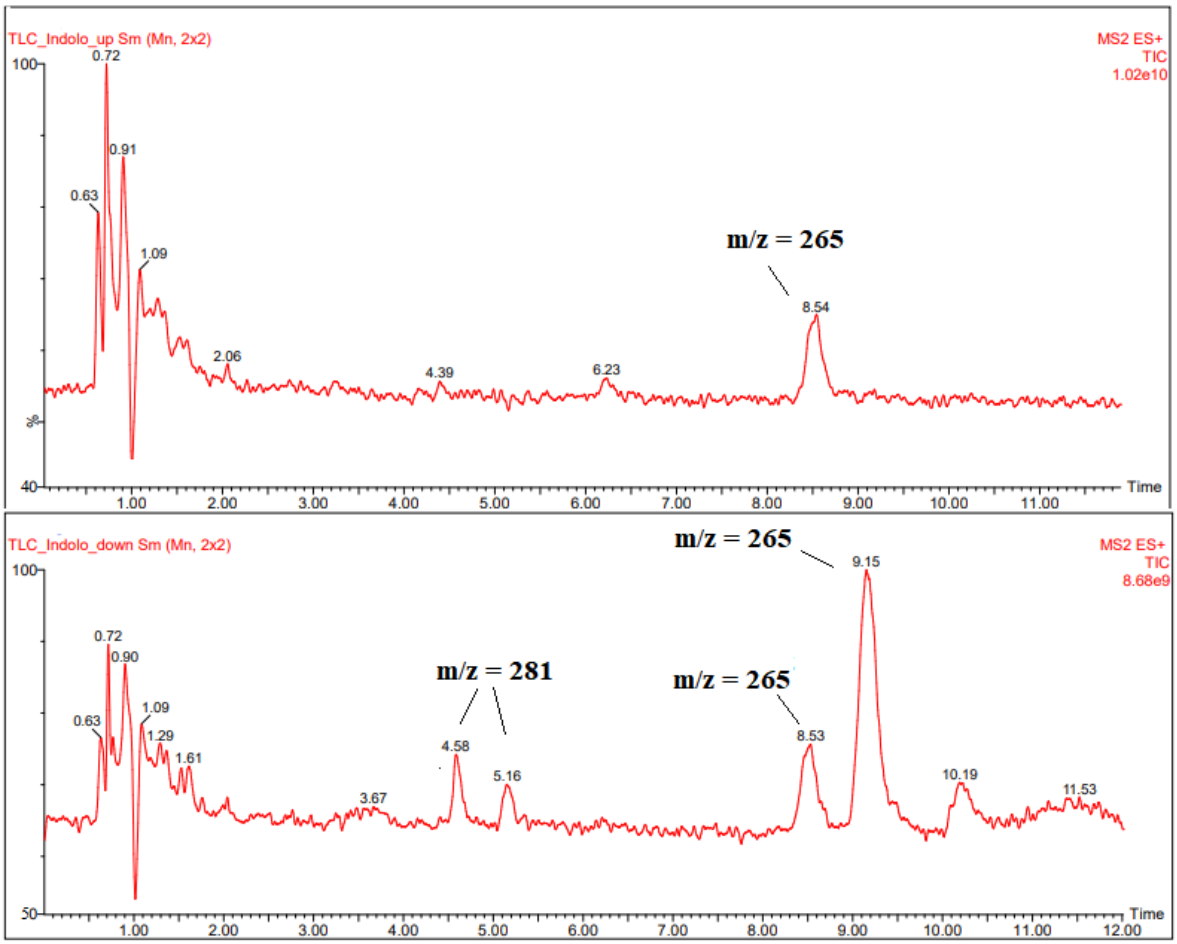


Рис. 12 Хроматограма двох фракцій, отриманих в процесі розділення ізомерних сполук 14

На рисунку приведено хроматограми двох виділених фракцій, одна з яких містить лише один ізомер, однак в другій фракції присутні обидва піки. Хроматограми для ізомерних сполук 15 приведено на рис. 13.

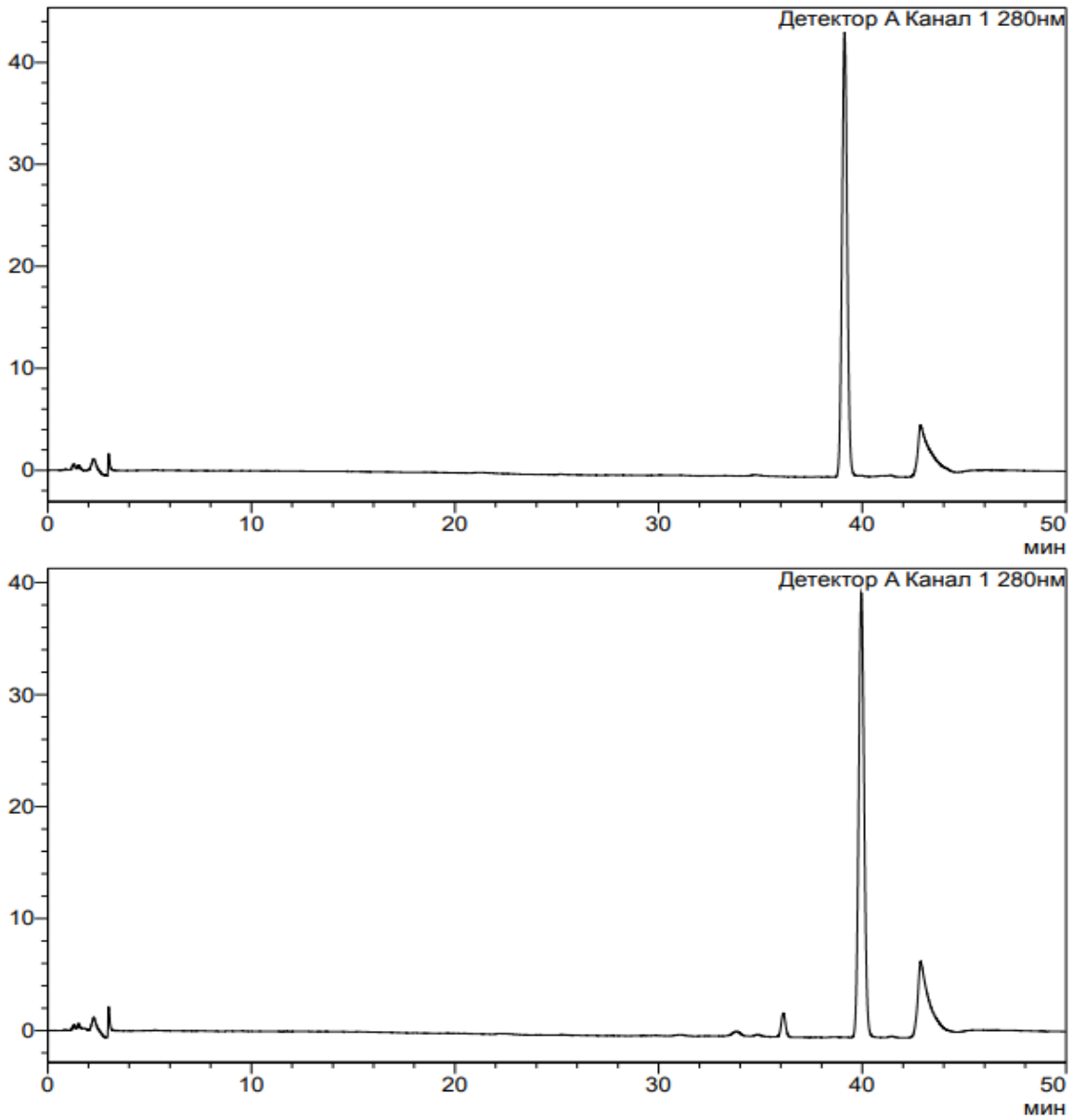


Рис. 13 Хроматограма двох фракцій, отриманих в процесі розділення ізомерних сполук 15

На хроматограмах виділених фракцій присутні піки з різними часами виходу (39.2 та 40.0 хв.), які відповідають пікам на хроматограмі суміші ізомерів (рис.11), що свідчить про те, що методом ТШХ вдалося розділити ці ізомери.

Виділені чисті ізомери планується дослідити за допомогою рентгеноструктурного аналізу.

Розділити ізомери сполук 16 та 17, використовуючи різний склад рухомої фази ТШХ, не вдалося.

7. Висновки

- Вивчений ізомерний склад продуктів синтезу асиметричних похідних індено- та індолохіноксалінів;
- На прикладі похідних індолохіноксаліну відпрацьовані умови розділення регіоізомерних сполук.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Marina O. Shibinskaya, Sergey A. Lyakhov, Alexander V. Mazepa, Sergey A. Andronati, Alexander V. Turov, Nadezhda M. Zholobak, Nikolay Ya. Spivak, Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines. European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 45, Issue 3, (2010) 1237-1243.

2. I.A. Schepetkin, L.N. Kirpotina, A.I. Khlebnikov, T.S. Hanks, I. Kochetkova, D.W. Pascual, M.A. Jutila, M.T. Quinn, Identification and characterization of a novel class of c-Jun N-terminal kinase inhibitors, Mol. Pharmacol. 81 (2012) 832-845.

3. Vladislav U., Korotaev, N.S., Zimnickiu A.Y., Barkarov I.B., Kutyshev V.Y., Sosovskih. Stabilized azomethine ylides based on indeno[1,2-b]quinoxalinones in reactions of [3+2]cycloaddition with electrophilic alkenes // Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University 2018.

4. V. Sharma,P. Kumar, D.Pathaka. // Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review, J. Heterocyclic Chem., 47, 2010, p. 491.

5. Wilson, W. D. DNA and RNA intercalators. // DNA and Aspects of Molecular Biology, Pergamon, New York, 1999, p. 427-476.

6. Moorthy, N.S.H.N.; Karthikeyan, C.; Trivedi, P. Design, synthesis, cytotoxic evaluation and QSAR study of some 6H-indolo[2,3- b]quinoxaline derivatives. // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 25 (3), 2010, p. 394-405.

7. Bergman, J.; Åkerfeldt, S. G. Substituted Indoloquinoxalines. Patent WO 87/04436, 1987.

8. Wamberg, M. C.; Hassan, A. A.; Bond, A. D.; Pedersen, E. B. Intercalating nucleic acids (INAs) containing insertions of 6H-indolo[2,3-b]quinoxaline.// Tetrahedron, 62, 2006, 11187-11199.

9. N. S. Hari Narayana Moorthy, E. Manivannan, C. Karthikeyan, Piyush Trivedi. 6H-Indolo[2,3-b]quinoxalines: DNA and Protein Interacting Scaffold for Pharmacological Activities. // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2013.

10. H. Duplain, Salvage of ischemic myocardium: a focus on JNK, Hypoxia and Exercise 588 (2006) 157-164.

11. V. Waetzig, T. Herdegen, Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage, Trends Pharmacol. Sci. 26 (2005) 455-461.
12. A.M. Bode, Z.G. Dong, The functional contrariety of JNK, Mol. Carcinog. 46 (2007) 591-598.
13. G.L. Johnson, K. Nakamura, The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease, Biochim. Biophys. Acta 1773 (2007) 1341-1348
14. P. LoGrasso, T. Kamenecka, Inhibitors of c-jun-N-terminal kinase (JNK), Mini Rev. Med. Chem. 8 (2008) 755-766
15. H. Park, S. Iqbal, P. Hernandez, R. Mora, K. Zheng, Y.B. Feng, P. LoGrasso, Structural basis and biological consequences for JNK2/3 isoform selective aminopyrazoles, Sci. Rep. 5 (2015).
16. D.N. Atochin, I.A. Schepetkin, I.A. Klebnikov, V.I. Seledtsov, H. Swanson, M.T. Quinn, P.L. Huang, A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice, Neurosci. Lett. 618 (2016) 45-49.