

© Коллектив авторов, 2003

Е. А. Ляхова<sup>1</sup>, С. А. Ляхов<sup>1</sup>, Л. А. Литвинова<sup>1</sup>, З. М. Тополова<sup>1</sup>, И. В. Вельчева<sup>1</sup>,  
А. И. Грень<sup>1</sup>, М. Н. Лебедюк<sup>2</sup>, В. П. Федчук<sup>2</sup>, Г. А. Хорохорина<sup>2</sup>

## СИНТЕЗ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА АКРИДИНИЛГИДРАЗИДОВ N,N-ДИАЛКИЛ ГЛИЦИНОВ

<sup>1</sup> Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса;

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр "БППП", Одесса

Интеркаляция в ДНК играет ключевую роль в реализации противовирусной и интерферониндуцирующей активности амиксина и его аналогов [1 – 3]. Эта гипотеза в значительной степени нашла подтверждение в результатах изучения ряда производных аминокридина. Известны интеркалирующие свойства как 9-аминокридина, так и ряда акридиниламиноспиртов и акридиниламинокислот [4, 5]. С другой стороны, показано, что некоторые из этих соединений (как и некоторые бис-акридины) обладают противовирусным действием [6 – 8]. Представляется, что интеркаляция лежит в основе противовирусного действия и других производных акридина [9]. Более того, многие из изученных соединений оказались индукторами интерферона [10]. Показана шистосомоцидная активность ряда акридинилгидразидов феноксиуксусных кислот [11] и противовирусная активность *in ovo* соответствующих бис-производных [12]. Однако низкая растворимость в воде последних ограничивает возможности их дальнейшего изучения и применения. Предполагалось, что замена феноксильного остатка третичной аминогруппой должна привести к растворимым в воде производным акридинилгидразина, способным к интеркаляции в ДНК и, исходя из сказанного выше, обладающими противовирусной и интерферониндуцирующей активностями. В связи с этим в настоящем сообщении мы описываем синтез и ДНК-интеркалирую-

щие свойства ранее неизученных акридинилгидразидов аминоксусных кислот и их способность ингибировать ДНК-зависимую ДНК-полимеразу в условиях полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Синтез целевых соединений осуществляли согласно схеме 1. Обработкой метилбромацетата вторичными аминами (I – VII), взятыми в двукратном избытке, в кипящем бензоле получали соответствующие эфиры N,N-дизамещенных аминоксусных кислот (VIII – XIV) с выходами 75 – 85 %. Гидразинолиз эфиров (VIII – XIV) действием гидразингидрата в метаноле приводил к соответствующим гидразидам (XV – XXI) с высокими выходами. Конечные продукты (XXII – XXVIII) получали действием метоксиакридина на гидразиды XV – XXI в кипящем метаноле.

Акридинилгидразиды XXII – XXVIII представляют собой оранжевые мелко-кристаллические вещества, хорошо растворимые в большинстве органических растворителях (таких как бензол, метанол, ДМФА и др.), а в воде — в кислой и нейтральной среде (pH 2 – 7).

Физико-химические свойства синтезированных соединений приведены в табл. 1. Чистоту эфиров VIII – XIV контролировали методом ТСХ и ГЖХ, а гидразидов XV – XXI и акридинилгидразидов XXII – XXVIII — методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254. Состав подтвержден данными элементного анализа, строение — спектральными методами. В масс-спектрах всех промежуточных и конечных продуктов имеются пики молекулярных ионов, хотя интенсивность их невелика. Наиболее характерным направлением фрагментации молекулярного иона для соединений XXII – XXVIII является разрыв β-связи аминоксильного остатка и связи N–N гидразина (схема 2).

В ИК-спектрах эфиров VIII – XIV имеются: набор полос поглощения, соответствующих валентным и деформационным колебаниям связей C–H<sub>алиф</sub> (2700 – 3015 см<sup>-1</sup> и 1350 – 1455 см<sup>-1</sup>, соответственно); полоса поглощения, соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы (1730 – 1735 см<sup>-1</sup>); набор по-

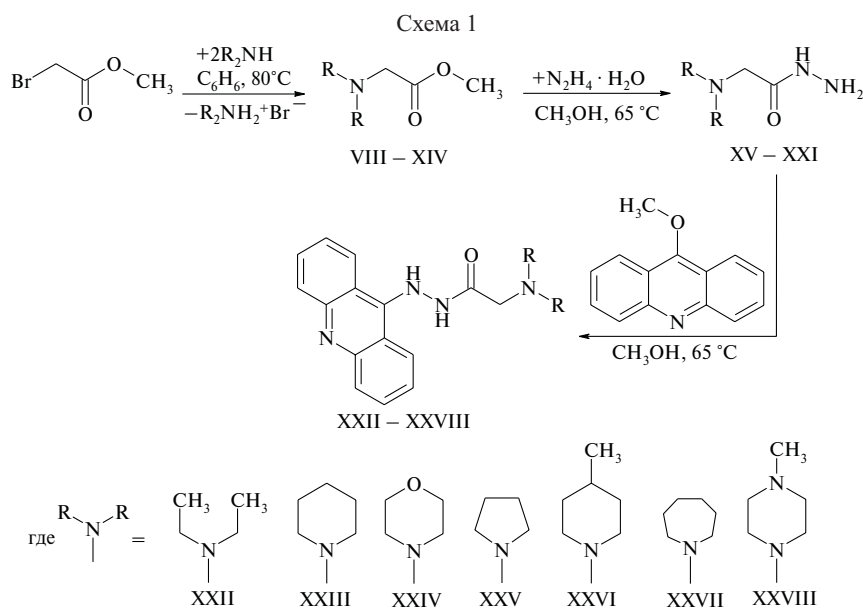
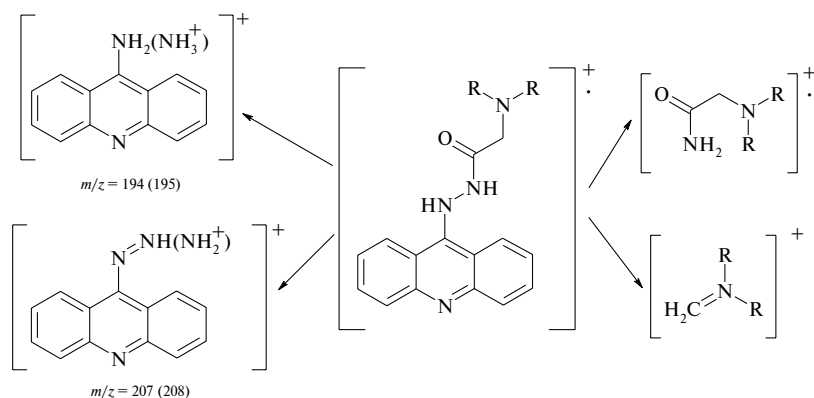


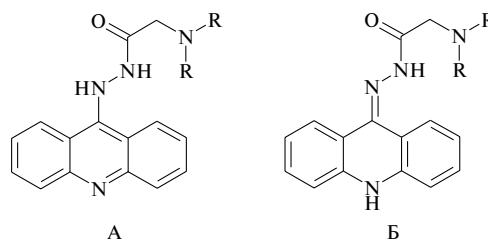
Схема 2



лос в области  $1065 - 1300 \text{ см}^{-1}$ , соответствующих колебаниям связей С–О и С–N. В спектрах гидразидов XV – XXI по сравнению со спектрами соответствующих им эфиров отсутствует полоса при  $1730 - 1735 \text{ см}^{-1}$  (карбонильная группа сложного эфира), но появляется полоса при  $1650 \text{ см}^{-1}$  (карбонильная группа гидразида), а в области  $3200 - 3450 \text{ см}^{-1}$  (с максимумом при  $3350 - 3370 \text{ см}^{-1}$ ) появляется интенсивная широкая полоса с “плечами”, соответствующая валентным колебаниям связей N–H различной степени ассоциации. В спектрах конечных продуктов XXII – XXVIII в этой области наблюдаются две полосы: узкая интенсивная полоса при  $3410 - 3420 \text{ см}^{-1}$  и широкая сложная полоса с несколькими “плечами” при  $3150 - 3300 \text{ см}^{-1}$ . Кроме того, в спектрах XXII – XXVIII наблюдаются полосы при  $1460 - 1465 \text{ см}^{-1}$ ,

$1540 - 1555 \text{ см}^{-1}$ ,  $1585 - 1590 \text{ см}^{-1}$ ,  $1600 - 1610 \text{ см}^{-1}$ , характерные для колебаний ароматических и гетероароматических систем. Волновое число полосы, соответствующей валентным колебаниям карбонильной группы ( $1655 - 1675 \text{ см}^{-1}$ ), изменяется симбатно электроотрицательности конечного амина.

В спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР акридинов XXII – XXVIII (табл. 2) наблюдаются сигналы протонов “ароматической” и “алифатической” частей молекулы, соотношение интегральных интенсивностей которых соответствует расчетному. Существенно, что в спектрах в области  $7,0 - 8,3$  м.д. наблюдается удвоенный набор сигналов половинной от расчетной интенсивности каждый, что свидетельствует в пользу существования двух таутомерных форм (А и Б), находящихся в соотношении 1:1 (приблизительно).



ДНК-связывающие свойства соединений XXII – XXVIII изучали методом вытеснения этидия бромида из его комплекса с ДНК тимуса теленка, сопровожда-

Физико-химические свойства синтезированных соединений

Таблица 1

Соединение	Выход, %	Т.пл., °С или Т.кип. (°С)/Р (мм. рт. ст.)	Брутто-формула	[M <sup>+</sup> ]	Хроматографические данные	
					R <sub>f</sub>	Элюент**
VIII	52	77/27	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	145	0,42	А
IX	68	97/17	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	157	0,48	Б
X	65	93/10	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	159	0,45	А
XI	21	84/15	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	143	0,30	А
XII	45	109/20	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	171	0,53	Б
XIII	48	109/15	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	171	0,49	Б
XIV	61	118/15	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	172	0,08	А
XV	90	*	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O	145	0,46	В
XVI	81	98 – 99	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O	157	0,30	В
XVII	88	107	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	159	0,38	В
XVIII	52	*	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O	143	0,24	В
XIX	70	95 – 96	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	171	0,41	В
XX	75	72 – 73	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	171	0,43	В
XXI	84	90 – 91	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O	172	0,12	В
XXII	75	187	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O	322	0,52	Г
XXIII	83	241 – 242	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O	334	0,47	Г
XIV	85	253	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	336	0,45	Г
XXV	53	131	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O	320	0,45	Г
XXVI	75	246 – 247	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O	348	0,51	Г
XXVII	70	214	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O	348	0,54	Г
XXVIII	64	249 – 250	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O	349	0,18	Г

\* Некристаллизующееся маслообразное вещество.

\*\* Элюенты: А, хлороформ-ацетон, 10:1; Б, хлороформ-ацетон-метанол, 30:2:1; В, хлороформ-метанол 10:1; Г, бензол-триэтиламин-метанол

ющегося резким снижением интенсивности флуоресценции, обусловленной связанной формой этидия бромид (интенсивность флуоресценции интеркалированного в ДНК этидия бромид превышает интенсивность флуоресценции свободного вещества в 300 – 500 раз) [4]. Если изучаемое вещество является интеркалятором и, вследствие этого способно вытеснять этидий бромид из его комплекса с ДНК, то интенсивность флуоресценции всей системы будет пропорциональна оставшейся связанной форме этидия бромид, при условии, что остальные компоненты раствора не поглощают свет как в области, соответствующей длине волны возбуждения, так и в области эмиссии, и не флуоресцируют сами в этой области [13]. Эти условия выполняются в изучаемой серии веществ. Так, интенсивность флуоресценции раствора, содержащего этидий бромид и ДНК (рис. 1, кривая 1), значительно превышает интенсивность флуоресценции растворов, содержащих только один из этих компонентов в тех же концентрациях. Незначительность флуоресценции исследуемых веществ (на примере соединения XXVII) иллюстрируется кривой 5. При добавлении соединения XXVII к раствору, содержащему этидий бромид и ДНК, интенсивность флуоресценции

снижается (кривые 1 – 3). Как следует из электронного спектра (рис. 2) поглощением изучаемых соединений в области длин волн возбуждения и эмиссии (545 и 596 нм, соответственно) можно пренебречь. Таким образом, описанный в литературе метод определения интеркалирующей способности лигандов по вытеснению этидия бромид из его комплексов с ДНК [13] оказывается вполне пригодным для изучения соединений XXII – XXVIII.

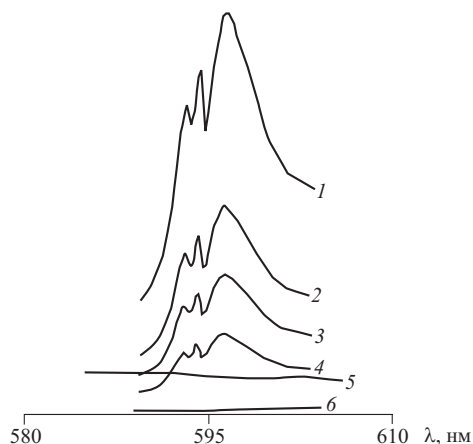
Полученные значения величин  $C_{50}$  и соответствующие им значения констант ассоциации приведены в табл. 3. Найденные значения констант ассоциации ( $\lg K_x = 4,53 - 5,59$ ) характерны для моно-интеркаляторов ДНК [4]. По интеркалирующей способности исследованные соединения располагаются в следующей последовательности: XXV  $\approx$  XXVII > XXVI  $\approx$  XXVIII > XXIV > XXII  $\approx$  XXIII.

Способность исследованных веществ ингибировать репликацию ДНК изучали с использованием ДНК вируса *Herpes simplex I* с праймерами, специфичными для фрагментов геномов этого вируса в условиях диагностической ПЦР [15]. В качестве параметра активности веществ использовали  $C_{100}$  — минимальную концентрацию вещества, приводящую к полному ин-

Таблица 2

Характеристики спектров  $^1\text{H}$  ЯМР синтезированных соединений:  $\delta$ , м.д., J, Гц

Соединение	Параметры сигналов
XXII	Алифатические: т. 1,032 м.д., 7,2 Гц (6H, $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); кв. 2,609 м.д., 7,2 Гц (4H, $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,246 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,051 м.д. (1H); м. 7,124 м.д. (1H); м. 7,212 м.д. (1H); м. 7,365 м.д. (2H); м. 7,521 м.д. (1H); м. 8,177 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,557 м.д. (1H); о.ш.с. 11,069 м.д. (1H).
XXIII	Алифатические: м. 1,460 м.д., 5,4 Гц (2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); м. 1,580 – 1,670 м.д., 5,4 Гц (4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); т. 2,582 м.д., 5,4 Гц (4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,177 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,081 м.д. (1H); м. 7,197 м.д. (1H); м. 7,248 м.д. (1H); м. 7,411 м.д. (2H); м. 7,552 м.д. (1H); м. 8,204 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,600 м.д. (1H); о.ш.с. 11,066 м.д. (1H).
XXIV	Алифатические: т. 2,644 м.д., 7,2 Гц (4H, $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); т. 3,710 м.д., 7,2 Гц (4H, $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,231 м.д., (2H $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,086 – 7,137 м.д. (1H); м. 7,163 – 7,261 м.д. (2H); м. 7,374 – 7,464 м.д. (2H); м. 7,535 – 7,605 м.д. (1H); м. 8,180 – 8,250 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,568 м.д. (1H); о.ш.с. 10,975 м.д. (1H).
XXV	Алифатические: н/р т. 1,809 м.д. (4H, $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); н/р т. 2,700 м.д. (4H, $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,350 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,035 – 7,128 м.д. (2H); м. 7,208 – 7,235 м.д. (1H); м. 7,369 – 7,395 м.д. (2H); м. 7,486 – 7,536 м.д. (1H); м. 8,112 – 8,210 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,523 м.д., (1H); о.ш.с. 11,018 м.д., (1H).
XXVI	Алифатические: д. 0,918 м.д., 6,6 Гц (3H, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); м. 1,300 – 1,420 м.д., (1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); набор мультиплетов 1,165 – 1,295 м.д. (2H), 1,613 – 1,655 (2H), 2,168 – 2,242 (2H), 2,752 – 2,861 (2H) ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,153 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,030 – 7,081 м.д. (1H); м. 7,101 – 7,151 м.д. (1H); м. 7,198 – 7,242 м.д. (1H); м. 7,378 – 7,402 м.д. (2H); м. 7,501 – 7,552 м.д. (1H); м. 8,148 – 8,206 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,408 м.д. (1H); о.ш.с. 11,018 м.д. (1H).
XXVII	Алифатические: набор мультиплетов ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ 1,537 – 1,721 м.д. (6H); 2,749 – 2,784 м.д. (4H); м. 3,315 – 3,340 м.д. (2H); с. 3,354 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,075 – 7,126 м.д. (1H); м. 7,154 – 7,205 м.д. (1H); м. 7,229 – 7,255 м.д. (1H); м. 7,402 – 7,451 м.д. (2H); м. 7,532 – 7,583 м.д. (1H); м. 8,209 – 8,260 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,507 м.д. (1H); о.ш.с. 11,051 м.д. (1H).
XXVIII	Алифатические: с. 2,240 м.д. (3H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); н/р м. 2,280 – 2,500 м.д. (4H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); н/р м. 2,578 – 2,711 м.д. (4H, $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ); с. 3,207 м.д. (2H, $\text{COCH}_2\text{N}$ ). Ароматические: м. 7,063 – 7,114 м.д. (1H); м. 7,175 – 7,241 м.д. (2H); м. 7,391 – 7,445 м.д. (2H); м. 7,547 – 7,598 м.д. (1H); м. 8,167 – 8,206 м.д. (2H). NH: ш.с. 10,548 м.д. (1H); ш.с. 10,981 м.д. (1H).



**Рис. 1.** Спектры флуоресценции: 1–3 — раствор этидия бромида (1,27 мкМ) в присутствии ДНК ( $1 \times 10^{-6}$  М пар оснований) и соединения XXVII в концентрациях 0,00;  $6,17 \times 10^{-5}$  и  $1,23 \times 10^{-4}$  М, соответственно; 4 — раствор этидия бромида (1,27 мкМ) в отсутствие ДНК; 5 — раствор соединения XXVII в концентрации  $6,17 \times 10^{-5}$  М; 6 — раствор ДНК в концентрации (в парах оснований)  $1 \times 10^{-6}$  М. Для спектров 4–6 интенсивность увеличена в 100 раз

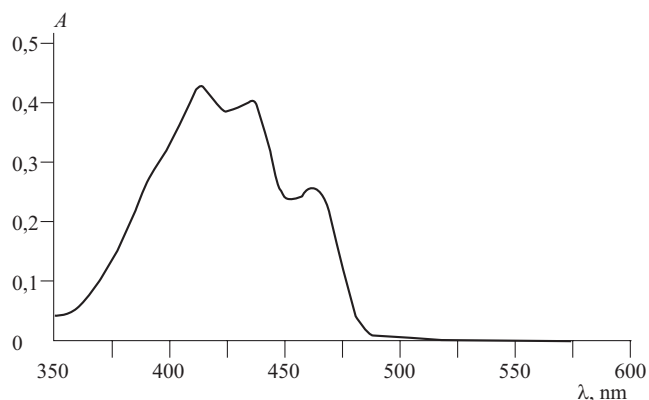
гибиранию амплификации (многократного синтеза копий фрагмента ДНК вируса). Характерно, что ингибирование амплификации положительного контроля (тотальная ДНК вируса герпеса простого тип I) симбатно ингибированию внутреннего контроля, что свидетельствует об однотипности механизмов ингибирования линейной и плазмидной ДНК.

Результаты изучения способности синтезированных соединений XXII–XXVIII ингибировать ПЦР приведены в табл. 3. По ингибирующей активности соединения располагаются в следующей последовательности: XXIII  $\approx$  XXII > XXV >> XXVI > XXVIII > XXVII  $\approx$  XXIV. Характерно, что 9-аминоакридин, обладающий максимальным сродством к ДНК (по результатам вытеснения этидия бромида), не ингибирует ПЦР вплоть до концентраций 1 мМ. Так же, как и в случае с вытеснением этидия бромида установить рациональную взаимосвязь между структурой и способностью веществ ингибировать ПЦР не удастся.

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на отсутствие корреляции между интеркалирующей активностью и способностью исследованных веществ ингибировать ПЦР, что свидетельствует о существовании других механизмов ингибирования репликации ДНК (кроме стабилизации дуплекса интеркалятором).

#### Экспериментальная химическая часть

Масс-спектры записаны на приборе МХ-1321 с прямым вводом образца. Энергия ионизации 70 эВ, температура источника 220 °С. ИК-спектры снимались на спектрометре Specord 75 IR в растворах  $\text{CHCl}_3$ . Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  получены на приборе Varian VXR-300 в ДМФ- $d_7$  (внутренний стандарт — ТМС). Для тонкослойной хроматографии применяли пластинки марки “Silufol UV-254” и “Silufol UV-366”. Анализ методом



**Рис. 2.** Электронный спектр соединения XXVII в водном растворе при pH 5,0

ГЖХ проводили на приборе ЛХМ-80, детектор — катарометр, колонка  $2000 \times 3$  мм, стационарная фаза SE-301, нанесенная в количестве 5 % на Chromaton N-AW, фракция 0,125–0,16 мм, газ-носитель — гелий,  $t_{\text{исп.}} = 200$  °С,  $t_{\text{кол.}} = 150$  °С,  $t_{\text{дет.}} = 200$  °С.

В синтезах использованы коммерческие реактивы с содержанием не ниже 97 % основного вещества.

**Диэтиламиноуксусной кислоты метиловый эфир (VIII).** К 62,7 мл (0,6 моль) перегнанного диэтиламина в 100 мл сухого бензола постепенно добавляют 26 мл (0,3 моль) метилхлорацетата и кипятят смесь 8 ч. Охлаждают до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре  $3 \times 50$  мл бензола, фильтрат упаривают в вакууме, остаток перегоняют при 25 мм.рт.ст. (т.кип. 77 °С). Выход 45 г (52 %). Аналогично получают соединения IX–XIV.

**Диэтиламиноуксусной кислоты гидразид (XV).** К раствору 16,7 г (0,115 моль) метилового эфира диэтиламиноуксусной кислоты в 20 мл метанола добавляют 6,26 мл (0,125 моль) 100 %-ого гидразингидрата. Реакционную смесь кипятят 4 ч, выпаривают досуха при остаточном давлении 20–30 мм рт.ст. и выдерживают в этих условиях 1 ч. Продукт получают в виде бледноокрашенного масла (15 г, 90 %), которое используют без дополнительной очистки. Аналогично получают соединения XVI, XVII, XIX–XXI получают аналогично с той лишь разницей, что гидразиды выделяют в кристаллическом виде и очищают перекристаллизацией из смеси бензола с гептаном (1:5).

**N'-(Акридин-9-ил)гидразид диэтиламиноуксусной кислоты (XXII).** К кипящему раствору 0,726 г (0,005 моль) гидразида диэтиламиноуксусной кислоты в 10 мл метанола добавляют в один прием 1,05 г (5 ммоль) 9-метоксиакридина. Реакционную смесь кипятят 30 мин, метанол упаривают в вакууме досуха, остаток растворяют в 4 мл теплого бензола. К полученному раствору постепенно добавляют 20 мл теплого гептана и медленно охлаждают до комнатной температуры. Продукт кристаллизуется при потирании палочкой о стенки стакана. Кристаллический осадок отфильтровывают, промывают на фильтре смесью бензола с гептаном (1:5), охлажденной до  $-18$  °С

## Интеркалирующие ДНК свойства синтезированных соединений XXII – XXVIII и их способность ингибировать полимеразную цепную реакцию (ПЦР)

Соединение	Вытеснение этидия бромидом			Ингибирование ПЦР	
	$\lg C_{50}$	$C_{50}, \times 10^6, \text{M}$	$K_x \times 10^{-4}, \text{M}^{-1}$	$\lg K_x$	$C_{100}, \mu\text{M} \pm \epsilon_p < 0,05$
XXII	$-3,75 \pm 0,08$	178	3,6	4,56	$37 \pm 0,10$
XXIII	$-3,72 \pm 0,17$	191	3,39	4,53	$3,27 \pm 0,10$
XXIV	$-3,94 \pm 0,09$	114,8	5,6	4,75	$48,3 \pm 2,0$
XXV	$-4,42 \pm 0,19$	38	17,1	5,23	$325 \pm 15$
XXVI	$-4,08 \pm 0,10$	83,2	7,8	4,89	$290 \pm 10$
XXVII	$-4,2 \pm 0,18$	63,1	10,3	5,01	$316 \pm 15$
XXVIII	$-4,07 \pm 0,12$	85,1	7,6	4,88	$158 \pm 7,3$
9-Аминоакридин	$-4,49 \pm 0,09$	32,4	38,89	5,59	$> 1000 \pm 10$

( $3 \times 1$  мл), гептаном ( $2 \times 1$  мл) и высушивают в вакууме. Выход 1,21 г (75 %). Аналогично было получено соединение XXV. Соединения XXIII, XXIV, XXVI – XXVIII получают аналогично, с той лишь разницей, что продукты кристаллизуются из реакционной смеси и перекристаллизовываются из метанола.

## Экспериментальная биологическая часть

При изучении интеркалирующей способности использовали высокополимерную ДНК тимуса теленка (Serva, 18560) и этидий бромистый (Acros, 32722). В качестве вещества сравнения использовали 9-аминоакридин (Acros, 10311). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (колонка DI-425, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH,  $1 \times 10^{-6} \text{ Ом}^{-1}$ ), для приготовления буферных растворов ацетат натрия и уксусную кислоту квалификации о.с.ч., этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль (Fluka, 03677). Спектрофлуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре СДЛ-1. Электронные спектры записаны в ацетатном буферном растворе (натрия хлорид — 9,3 мМ, натрия ацетат — 2 мМ, этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль — 0,1 мМ, натрия азид — 0,3 мМ; pH =  $5,0 \pm 0,1$ ) на спектрофотометре Perkin-Elmer Lambda 9.

При изучении влияния исследуемых веществ на ПЦР использовали буферные растворы, раствор Taq-полимеразы, положительный контроль (ДНК ВПГ-1) и внутренний контроль (рекомбинантная плазида), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, прямой и обратный праймеры, входящие в состав стандартного “Набора реагентов для обнаружения ДНК HSV-1” (НПФ “Литех”, Москва). Состав буферного раствора для амплификации: KCl (0,05 М), Трис-HCl (0,01 М), MgCl<sub>2</sub> (2,5 мМ), БСА (0,1 мг/мл), pH = 8,4. Состав буферного раствора для проведения электрофореза: Трис (89 мМ), борная кислота (89 мМ), ЭДТА (2 мМ). Амплификацию проводили на приборе AMPLY-250 (“БИОКОМ”, Москва).

## Метод изучения интеркалирующей способности синтезированных веществ по вытеснению этидия бромидом из его комплекса с ДНК

Во избежание неоднозначностей в степени протонирования изучаемых соединений эксперименты проводили при pH = 5 в 0,02 М ацетатном буферном растворе (ионная сила 0,0115 М) [4]. Концентрацию 50 %-го вытеснения получали из значения абсциссы точки перегиба сигмоидальной кривой, аппроксимирующей значения, отложенные в координатах  $\lg C$  — % вытеснения (кривая доза — ответ в полулогарифмических координатах) (рис. 3). Коэффициент нелинейной корреляции и значения регрессионных параметров рассчитывали согласно [14, сс. 295 – 298]. Значения, использованные для аппроксимации, представляли собой средние величины из трех параллельных экспериментов. Доверительные интервалы на уровне доверительной вероятности для средних проводили согласно [14, сс. 106 – 110]. Во всех случаях доверительные интервалы для средних были меньше ширины и высоты коридора ошибок (верхняя и нижняя кривая на рис. 3).

Расчет значений констант ассоциации ( $K_x$ ) проводили по формуле (1), предложенной в работе [13]:

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

где  $K_x$  — константа ассоциации изучаемого вещества,  $C_{50}$  — концентрация вещества, приводящая к 50 %-ому снижению интенсивности флуоресценции (вытеснению этидия бромидом из его комплекса с ДНК),  $C_{Et}$  — используемая в эксперименте концентрация этидия бромидом,  $K_{Et}$  — константа ассоциации с ДНК этидия бромидом ( $K_{Et} = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  [13]).

Измеряли интенсивность пика (относительные единицы) флуоресценции этидия бромидом при 595 нм (длина волны возбуждения 546 нм) серии растворов, содержащих ДНК (1  $\mu\text{M}$ , в парах оснований), натрия хлорид (9,3 мМ), натрия ацетат (2 мМ, pH =  $5,0 \pm 0,1$ ), этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль (0,1 мМ), натрия азид (0,3 мМ), этидий бромистый (1,26  $\mu\text{M}$ ) и изучаемые соединения в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-7}$  —  $1 \times 10^{-3}$  М. Раствор, не содержащий изучаемое вещество, использовали в каче-

стве контрольного. Степень вытеснения этидия бромида ( $R$ ) рассчитывали по формуле (2):

$$R = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

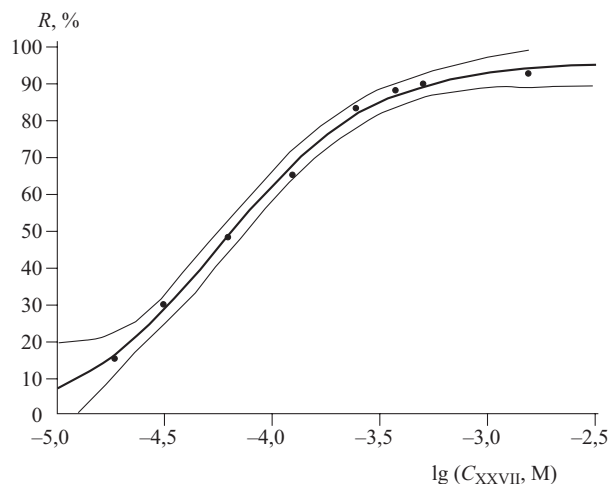
где  $I$  — интенсивность флуоресценции раствора, содержащего лиганд в определенной концентрации,  $I_0$  — интенсивность флуоресценции контрольного раствора,  $R$  — доля (в %) вытесненного этидия бромида.

Для каждой используемой в эксперименте концентрации рассчитывали значения ее логарифма и степени вытеснения этидия бромида и строили график зависимости  $R$  —  $\lg C$ . Ордината точки перегиба во всех случаях соответствовала  $R = 50 \pm 5\%$ . Абсцисса точки перегиба, определенная графически, совпадала ( $\pm 2\%$ ) со значением регрессионного параметра, доверительный интервал которого совпадал с шириной коридора ошибок в этой точке и во всех случаях не превышал 5% значения определяемой величины. Статистическую обработку результатов выполняли согласно [14, сс. 298 – 303].

#### Метод изучения способности веществ ингибировать ПЦР

Оценку способности синтезированных соединений ингибировать матричные функции ДНК проводили методом ПЦР согласно [15] и инструкции по применению к стандартному “Набору реагентов для обнаружения ДНК ВПГ-1”. Для этого в пластиковую пробирку (0,5 мл) вводили 2,5 мкл раствора прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и наслаивали 10 мкл расплавленного воска так, чтобы он полностью покрывал раствор. На поверхность застывшего воска прибавляли 10 мкл ПЦР-буфера, содержащего ДНК-полимеразу (Taq-полимеразу), поверх реакционной смеси наслаивали 20 мкл минерального масла, на поверхность которого прибавляли 5 мкл раствора изучаемого соединения и 5 мкл положительного контроля (тотальная ДНК вируса простого герпеса I типа, выделенная из штамма Л2 методом фенольной экстракции с преципитацией этанолом). Пробирку устанавливали в термостат и нагревали до 65 °С, при этом воск расплавлялся и поднимался вверх, а верхняя и нижняя фазы перемешивались. После этого проводили амплификацию — многократное увеличение числа копий специфического участка ДНК, катализируемую Taq-полимеразой. Амплификацию проводили в следующем режиме: 4 мин при 95 °С — один цикл; 1 мин при 95 °С, 1 мин при 67 °С, 1 мин при 72 °С — 30 циклов; 2 мин при 72 °С — один цикл, после чего образец охлаждали до +4 °С и сохраняли при данной температуре.

Анализ продуктов амплификации проводили на 1,5% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера при комнатной температуре и напряжении 80–100 В. 15 мкл раствора продукта амплификации смешивали с 5 мкл раствора бромфенолового синего. 10 мкл полученного раствора помещали в лунки геля.



**Рис. 3.** Кривая вытеснения этидия бромида соединением XXVII в полулогарифмических координатах. Значения  $R$  (степени вытеснения) при концентрации соединения  $5 \times 10^{-7}$  и  $1 \times 10^{-6}$  М недостоверно отличались от контроля, в связи с чем в расчетах не учитывались и на графике не отражены. Точки — средние величины, полученные для трех параллельных экспериментов

Электрофорез проводили 25 мин при комнатной температуре.

Наличие репликата определяли после электрофореза с помощью УФ-трансиллюминатора при облучении ультрафиолетовым светом с длиной волны 310 нм.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова, *О взаимодействии аминоксифлуороенонов с нуклеиновыми кислотами и олигонуклеотидами*, ФХИ АН УССР, Рук. деп. в ВИНТИ № 6264-B89, Одесса (1989).
2. С. А. Андронати, Л. А. Литвинова, Н. Я. Головенко, *Ж. Акад. мед. наук Украины*, **5**(1), 53 – 66 (1999).
3. S. A. Lyakhov, *Abstrs. of the 6th Int. Symp. On the Molecular Aspects of the Chemotherapy*, Gdansk (1997), p. 137.
4. B. C. Baguley, W. A. Denny, G. J. Atwell, et al., *J. Med. Chem.*, **24**(2), 170 – 177 (1981).
5. M. Asakawa, K. Endo, K. Kobayashi, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**(8), 2050 – 2055 (1992).
6. S. A. Lyakhov, Y. I. Suveyzdis, L. K. Berezina, et al., *Die Pharmazie*, **49**(12), 926 – 927 (1994).
7. Я. И. Сувейздис, С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(10), 15 – 16 (2000).
8. S. A. Lyakhov, Y. I. Suveyzdis, L. A. Litvinova, et al., *Die Pharmazie*, **55**(10), 733 – 736 (2000).
9. I. Mucsi, J. Molnar, M. Tanaka, et al., *Anticancer Res.*, **8**(4), 3011 – 3015 (1998).
10. С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова, Я. И. Сувейздис и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(9), 20 – 21 (2000).
11. Патент США 4711889 (1987); *Chem. Abstr.*, **108**, 167319x (1987).
12. С. А. Ляхов, Е. А. Ляхова, Н. Н. Панченко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(12), 10 – 13 (2001).
13. I. Antonini, P. Polucci, L. R. Kelland, et al., *J. Med. Chem.*, **42**(14), 2535 – 2541 (1999).
14. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990).
15. В. Г. Коляденко, В. И. Степаненко, И. И. Мавров и др., *Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем, методом полимеразной цепной реакции. (Метод. реком.)*, изд-во Национального мед. унив, Киев (1999).

Поступила 04.06.02