

*На правах рукописи*



**Ковалева Ксения Сергеевна**

**СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ  
КАМФОРЫ, ФЕНХОНА И ДЕГИДРОАБИЕТИЛАМИНА**

(02.00.03 – органическая химия)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН).

Научный руководитель:

**Яровая Ольга Ивановна**

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (НИОХ СО РАН)

Официальные оппоненты:

**Трусова Марина Евгеньевна**

доктор химических наук, профессор  
Директор исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ТПУ ФГАОУ ВО Национального Исследовательского Томского Политехнического Университета

**Яремёнко Иван Андреевич**

кандидат химических наук  
Старший научный сотрудник лаборатории исследования гомолитических реакций № 13 ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ)

Защита состоится «11» декабря 2020 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д003.049.01 при ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, проспект Акад. Лаврентьева, 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН и на сайте <http://web.nioch.nsc.ru/>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации по адресу <http://vak.ed.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 9, ученому секретарю диссертационного совета Д003.049.01; e-mail: [dissovet@nioch.nsc.ru](mailto:dissovet@nioch.nsc.ru). Автореферат разослан «03» ноября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор химических наук



Лузина  
Анатольевна

Ольга

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы**

Проблема синтеза новых биологически активных веществ для создания на их основе специфических лекарственных средств в области социально-значимых заболеваний является одной из важнейших задач современной органической и медицинской химии. Одним из наиболее перспективных путей при разработке новых фармакологически значимых агентов является использование в качестве стартовых веществ доступных соединений природного ряда. К числу природных веществ, представляющих большую значимость в качестве стартовых платформ, относятся соединения терпенового ряда, имеющие в своем остове первичные аминогруппы. Химические модификации таких природных веществ могут приводить к созданию фармакологически ценных библиотек новых агентов, имеющих различные азотсодержащие фрагменты. В то же время, коммерчески доступных соединений терпенового ряда, имеющих первичную аминогруппу практически нет. В представленной работе в качестве исходных блоков для дальнейших химических модификаций были использованы гидразоны доступных бициклических монотерпеноидов (+)-камфоры и (-)-фенхона и производное смоляной кислоты – (+)-дегидроабиетиламин.

Поиск биологической активности обусловлен выбором социально значимых заболеваний. Так, коллектив исследователей из отдела медицинской химии ЛФАВ НИОХ СО РАН имеет большой опыт в области поиска новых эффективных средств, обладающих широким спектром противовирусной активности. Вирусы вызывают огромное количество опасных заболеваний, среди которых СПИД, птичий грипп, натуральная оспа, атипичная пневмония, геморрагические лихорадки различной природы и такие «рядовые» заболевания, как грипп, ОРВИ, краснуха. Несмотря на то, что за последние десятилетия удалось добиться значительного прогресса в деле разработки антивирусных агентов, сертифицированных для лечения вируса иммунодефицита человека, герпес вируса, вируса гепатита и респираторных вирусов, антивирусная химиотерапия пока практически бессильна перед целым рядом инфекций, вызываемых вирусами. Анализ текущей глобальной пандемии новой коронавирусной инфекции 2019-2020 годов (COVID-19), вызванной вирусом SARS-CoV-2, подтверждает, что наблюдается достоверное увеличение заболеваемостью вирусными инфекциями, в том числе относящимися к группе особо опасных. В представленной работе было проведено исследование биологических свойств синтезированных агентов в отношении вируса гриппа, вируса осповакцины и Хантаан вируса, являющегося возбудителем геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).

Другим направлением, на которое направлены усилия, является поиск новых агентов, перспективных в области терапии онкологических заболеваний. Современные направления поиска эффективных средств при онкозаболеваниях не ограничиваются только синтезом новых цитотоксических агентов, а могут быть сконцентрированы на создание веществ, позволяющих увеличить эффективность

уже допущенных к использованию лекарств. В этой области особенное внимание привлекают ингибиторы ферментов репарации ДНК, позволяющие значительно усилить эффект противоопухолевой химиотерапии. Коллектив исследователей из ЛФАВ НИОХ СО РАН совместно с сотрудниками ИХФБМ СО РАН и НГУ имеет значительный задел по разработке новых эффективных ингибиторов фермента репарации TDP1 и изучению влияния данных ингибиторов одновременно с известными химиотерапевтическими средствами на опухолевые клетки разного типа.

### **Степень разработанности темы**

Существует большое количество методов, позволяющих модифицировать первичную аминогруппу, в том числе получать гетероциклические фрагменты. Хорошо изучена возможность получения алифатических азотсодержащих циклов, также широко распространен синтез ароматических гетероциклов, производных пиррола. Изучены разнообразные пути получения ароматических гетероциклов, содержащих более одного гетероатома: имидазолов, оксазолов, триазолов, тетразолов и др. Несмотря на это, в современной литературе крайне мало примеров применения известных методов создания гетероциклов с использованием в качестве стартовых молекул соединений терпенового ряда. Это может быть связано либо с низкой доступностью природных субстратов, имеющих первичную аминогруппу, либо со сложностью выделения и установления строения конечных продуктов.

### **Цель работы**

Цель представленного исследования: дизайн и синтез библиотек новых агентов на основе простых реакций доступных соединений терпенового ряда и анализ их биологических свойств в отношении вирусов Хантаан, гриппа, осповакцины и ферментов репарации ДНК. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- синтез алифатических N-гетероциклических производных на основе гидразонов камфоры и фенхона;
- создание библиотеки N-ацилпроизводных, имеющих в своей структуре каркасный природный фрагмент и различные алифатические, ароматические и гетероароматические структурные блоки;
- разработка методов синтеза конъюгатов каркасных бициклических природных соединений с полициклическими оксизоиндольными кислотами, изучение особенностей строения синтезированных агентов;
- изучение трехкомпонентной реакции соединений, имеющих первичную аминогруппу, формальдегида и алифатических тиоспиртов в синтезе насыщенных N-гетероциклов;
- синтез производных дегидроабиетиламина, имеющих фармакофорные фрагменты мочевины, тиомочевины и гетероциклические блоки;

- проведение анализа биологических свойств синтезированных соединений, выявление соединений-лидеров, обладающих целевой активностью.

### **Научная новизна**

С применением трехкомпонентной конденсации первичного амина, формальдегида и 2-меркаптоэтанола разработан метод синтеза, не описанного ранее в литературе 1,5,3-оксатиазепанового гетероциклического фрагмента. Подобраны оптимальные условия реакции. Впервые получены 1,5,3-оксатиазепановые и 1,5,3-дитиазепановые производные на основе моно- и дитерпеноидов, имеющих в структуре первичную аминогруппу. Показана возможность синтеза пиперидиновых, пирролидиновых, азепановых и изоиндолиновых производных монотерпеноидов взаимодействием гидразонов каркасных кетонов с доступными дигалогенидами алифатического и ароматического строения. Отработаны методы получения соединений, содержащих в структуре дитерпеновый дегидроабиетиновый структурный блок и фармакофорные гетероциклические группировки 2-иминотиазолидин-4-она, 2-иминотиазолидин-4-тиона, 2-тиоксоимидазолидин-4-она и роданина. Значительно расширены синтетические возможности соединений терпенового ряда, а именно: производных камфоры, фенхона и дегидроабиетиламина.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Предложен новый подход к синтезу азотсодержащих гетероциклических производных на основе гидразонов монотерпеноидов.

Синтезирована обширная библиотека N-ацилгидразонов камфоры и фенхона с алифатическими, ароматическими и гетероциклическими заместителями. Впервые установлено, что полученные соединения обладают широким спектром противовирусной активности, в частности, в отношении вирусов гриппа, осповакцины и вируса Хантаан.

Разработана и оптимизирована синтетическая схема, позволяющая получать ранее не описанные в литературе N-замещенные 1,5,3-оксатиазепаны.

Реализованы синтетические процедуры, позволяющие получать производные дегидроабиетиламина, включающие в структуру соединения группировки мочевины, тиомочевины, 2-иминотиазолидин-4-она, 2-иминотиазолидин-4-тиона, 2-тиоксоимидазолин-4-она и роданина, алифатические азотсодержащие пяти-, шести- и семичленные циклы. Показана возможность одностадийного синтеза изоиндолинонового производного на основе дегидроабиетиламина и одибромксилола.

В ходе исследования обнаружен новый структурный класс ингибиторов фермента репарации ДНК TDP1 – азотсодержащие производные смоляных кислот. Впервые показано, что полученные соединения являются эффективными ингибиторами TDP1 и способны проявлять синергетический эффект с противоопухолевым препаратом темозоломидом на клетках глиобластомы.

На часть практически важных результатов получены патентные свидетельства.

## Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением современных методов органического синтеза, в частности, реакций конденсации, нуклеофильного замещения, тионирования, гомогенного и гетерогенного катализа. Разделение реакционных смесей и выделение продуктов реакций в индивидуальном виде осуществлялись методами колоночной хроматографии, перекристаллизации и вакуумной перегонки. Для идентификации структуры продуктов реакций использовался набор физико-химических методов анализа, таких как мультаядерная ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, РСА, поляриметрия, ИК-спектроскопия.

## Основные положения, выносимые на защиту

1. Новый подход к синтезу пирролидинового, пиперидинового, азепанового и индолинового фрагмента на основе гидразонов бициклических монотерпеноидов.
2. Способ синтеза нового класса гетероциклов: N-замещенных 1,5,3-оксатиазепанов.
3. Методика синтеза конъюгатов монотерпеноидов камфоры, норкамфоры и фенхона и эпоксиизоиндолов, содержащих карбоксильную функцию.
4. Способ получения производных дегидроабиетиламина, включающих в остов фрагмент мочевины, тиомочевины, 2-иминотиазолидин-4-она, 2-иминотиазолидин-4-тиона, 2-тиоксоимидазолидин-4-она и роданина, алифатические азотсодержащие пяти-, шести- и семичленные циклы.
5. Новый класс эффективных ингибиторов ортопоксвирусов и вируса Хантаан на основе гидразонов камфоры и фенхона.
6. Обнаружение нового класса ингибиторов фермента репарации ДНК Тирозил-ДНК Фософодиэстеразы 1, проявляющего свойство увеличения эффективности темозоломида в отношении опухолевых клеток глиобластомы *in vitro* и *in vivo*.

## Степень достоверности

Высокая достоверность изложенных в работе результатов обеспечена использованием современных физико-химических методов исследования структур и тщательностью проведения эксперимента. Строение всех впервые выделенных химических соединений подтверждено методами  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР, в том числе с привлечением спектров двойного резонанса  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , двумерных спектров гомоядерной  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  корреляции ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) и двумерных спектров гетероядерной  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  корреляции на прямых (C-H COSY,  $^1\text{J}$  C,H) и дальних константах спин-спинового взаимодействия (COLOC,  $^2,3\text{J}$  C,H), масс-спектрометрии высокого разрешения. Методом РСА подтверждена молекулярная структура для 6 новых соединений.

### **Личный вклад соискателя**

Представленные в работе результаты получены автором, при его непосредственном участии или под его руководством. Автором был проведен анализ литературных данных по тематике исследования, внесен основной вклад в формирование общего направления работы и постановку конкретных задач. Автором работы осуществлялись планирование и проведение химических экспериментов, интерпретация полученных экспериментальных данных, установление строения соединений на основе комплекса физико-химических данных и отнесение спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Также внесен существенный вклад в подготовку научных публикаций по теме исследования.

### **Публикации и апробация работы**

По теме диссертации опубликованы 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, тезисы 8 докладов на российских и международных конференциях, получено 2 патента на изобретение, получено 1 решение о выдаче патента на изобретение. Результаты работы апробированы на российских и международных конференциях различного уровня, в т.ч. в виде устных (3) и стендовых (4) докладов и заочного участия (1).

### **Структура диссертации**

Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 89 схем, 23 рисунка, 9 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка литературы.

### **Основное содержание работы**

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы, определены цели и задачи исследования, представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, и сформулированы положения, выносимые на защиту. Литературный обзор посвящен анализу данных по методам синтеза азотсодержащих гетероциклических соединений на основе первичной аминогруппы, а также способам введению в молекулу гетероциклических блоков на основе иминогруппы, группировок мочевины и тиомочевины. Из обзора следует, что синтез азагетероциклов на природных субстратах практически не изучен, и данное направление является актуальной задачей органической химии. Следующая глава посвящена описанию и обсуждению химических модификаций камфоры, фенхона и дегидроабиетиламина. Также приведены данные по биологической активности некоторых полученных соединений. Экспериментальная часть содержит методики синтеза обсуждаемых в работе соединений, а также спектральные и физико-химические данные, позволяющие установить структуры соединений.

#### **1. Химические трансформации камфоры и фенхона**

Стартовыми молекулами для синтеза были выбраны каркасные бициклические терпеноиды (+)-камфора и (-)-фенхон, из которых на первом этапе

работы по известным методикам были получены гидразоны **1** и **2** соответственно с отличными выходами 97-98% (схема 1).

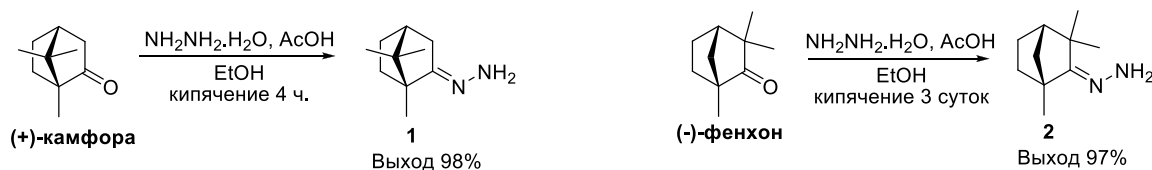


Схема 1

Нами было осуществлено взаимодействие гидразонов **1** и **2** с различными дигалогеналканами и *o*-дибромксилолом. Реакция представляет собой последовательное нуклеофильное замещение, в результате которого происходит замыкание цикла. С использованием данного подхода нами были получены соединения, содержащие пирролидиновый **3a** и **4a**, пиперидиновый **3b** и **4b**, азепановый **3c** и **4c**, и изоиндолиновый **3d** и **4d** фрагмент рядом с иминогруппой (схема 2).

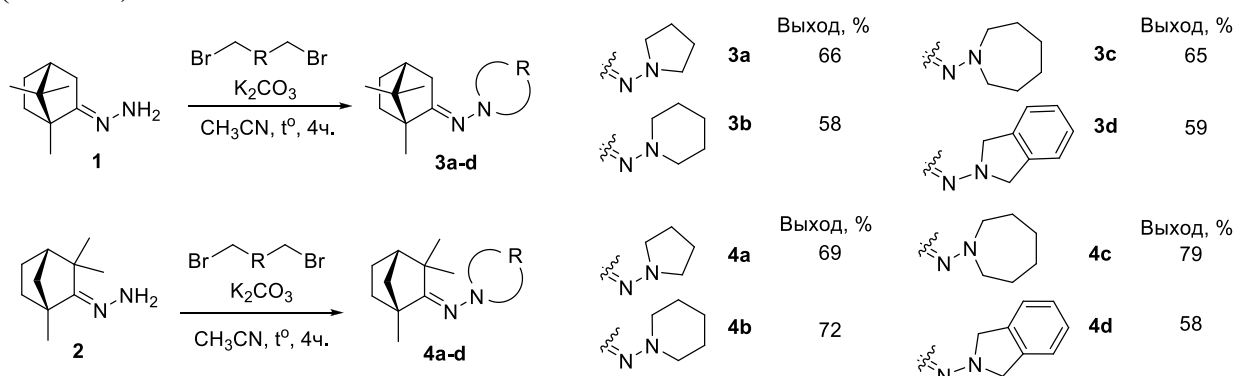


Схема 2

Для получения 1,5,3-дитиазепанового фрагмента в соединениях **5**, **6** была применена реакция конденсации формальдегида, 1,2-этандитиола и гидразонов **1**, **2** с добавлением 5 мольных %  $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (схема 3). Применение гидразонов в качестве исходных соединений в данного типа реакциях ранее не было описано. Для 1,5,3-дитиазепана **5** удалось получить кристалл, пригодный для РСА, структура приведена на рисунке.

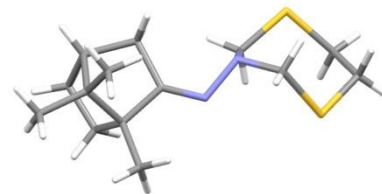
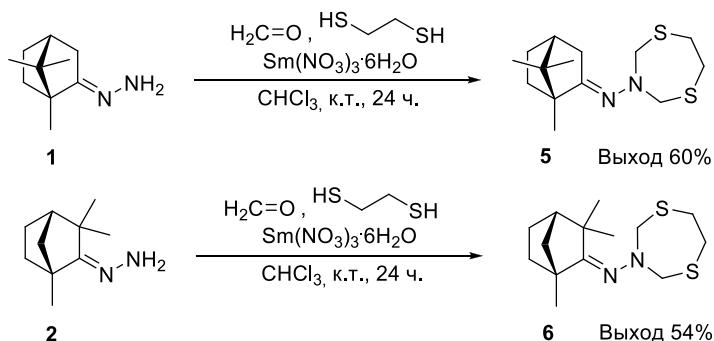
Структура соединения **5** согласно данным РСА.

Схема 3

Синтезирована библиотека соединений, принадлежащих к классу *N*-ацилгидразонов. Соединения **7a-g** включают в свой остов 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый структурный блок и алифатические,



ароматические и гетероароматические заместители при атоме азота (схема 4). Структура соединения **7f** дополнительно подтверждена с помощью РСА.

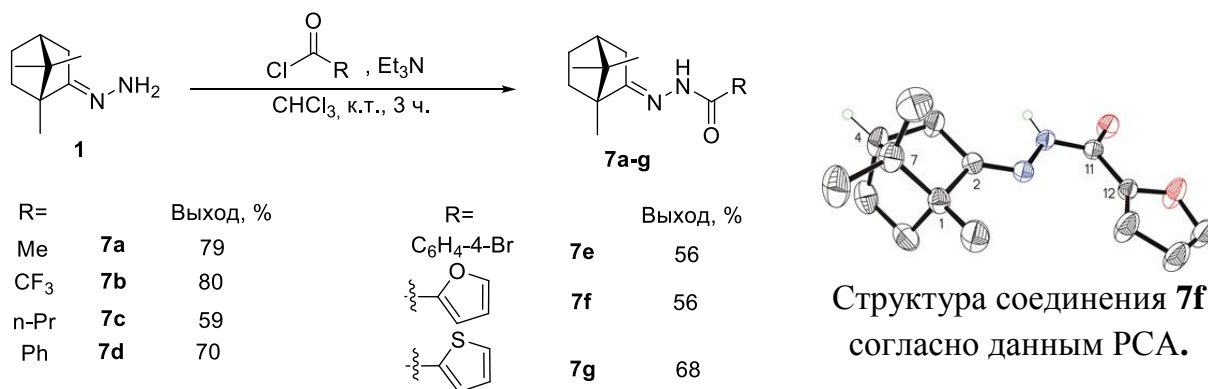


Схема 4

Также синтезирована библиотека производных на основе монотерпеноида фенхона. Проводилась реакция между гидразоном фенхона **2** и хлорангидридами соответствующих кислот в присутствии Et<sub>3</sub>N при комнатной температуре. В результате были выделены в индивидуальном виде N-замещенные гидразоны **8a-g** (схема 5).

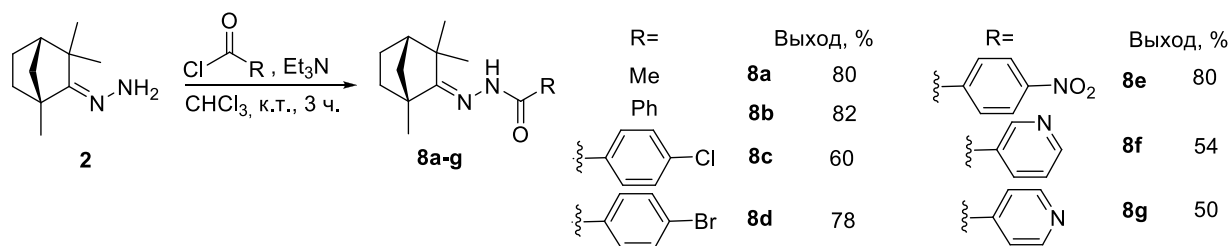


Схема 5

Конъюгаты монотерпеноидов и сложных азотсодержащих гетероциклических систем представляют интерес для медицинской химии. Выбор гетероциклических изоиндольных заместителей был обусловлен высоким биологическим потенциалом данного типа остовов. Изоиндолы и их гетероаннелированные производные проявили разнообразную биологическую активность, а именно, антибактериальную и противовирусную<sup>1</sup>. В представленной работе были синтезированы конъюгаты природных монотерпенов камфоры и фенхона с эпоксиизоиндолами, содержащими карбоксильную функцию. Наиболее эффективный метод синтеза включал в себя реакцию карбоксильной группы с этилхлороформиатом в присутствии триэтиламина с последующим введением *in situ* в реакцию гидразонов камфоры и фенхона **1** и **2** (схема 6). Предложенный подход позволял выделять целевые соединения **9a-t** с выходами 70-83% (рис. 1). Так как реакция протекает между оптически активной (+)-камфорой или (-)-фенхоном и рацемической смесью соответствующих кислот, в результате во всех случаях образовывалась смесь диастереомеров. Разделить диастереомеры колоночной хроматографией оказалось невозможным из-за их близких факторов

<sup>1</sup>Do Couto Maia R., Tesch R., Fraga C.A.M. Acylhydrazone derivatives: A patent review // Expert Opin. Ther. Pat. 2014. Vol. 24, № 11. P. 1161–1170.

удерживания, поэтому для последующих биологических исследований эти вещества использовались в виде смеси диастереомеров.

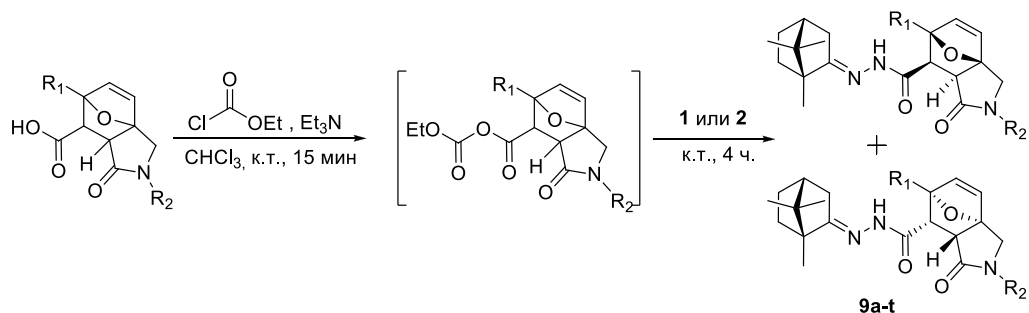


Схема 6

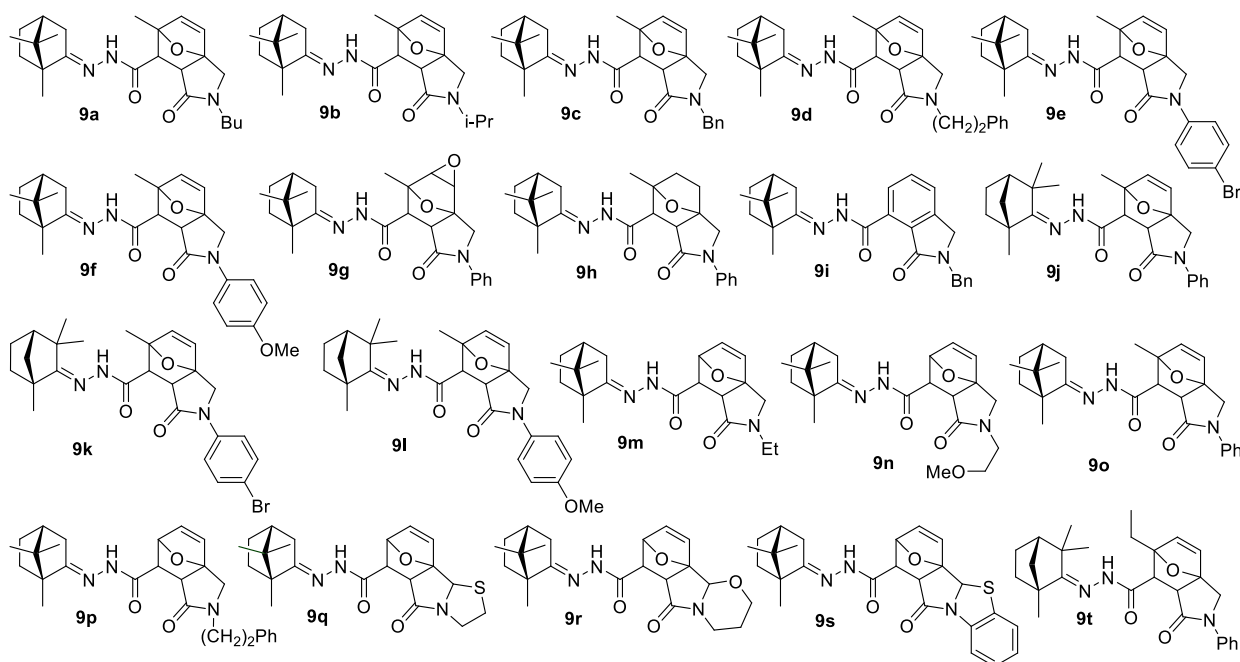


Рисунок 1

Значительные усилия были затрачены на установление строения полученных соединений. Структура веществ **9a-t** была уточнена с использованием комбинации 1D и 2D-методов ЯМР-спектроскопии (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC и HSQC-COSY), а в случае соединений **9n** и **9p** – дополнительно с помощью рентгено-структурного анализа. В ДМСO-*d*<sub>6</sub> при комнатной температуре растворы веществ **9a-t** представляют собой смеси четырех изомеров, два из которых (а и б, см. рис. 2) представляют собой диастереомеры, а два других (с и d) являются ротамерами по амидному фрагменту. Для однозначного подтверждения этого факта для соединения **9p** были проведены динамические эксперименты в датчике ЯМР спектрометра в температурном диапазоне от 30 до 110°C (рис. 2). Было продемонстрировано, что при температурах выше 50-60°C набор сигналов от четырёх веществ в спектрах <sup>1</sup>H ЯМР превращается в двойной набор сигналов, что является доказательством взаимного превращения ротамеров **a** ↔ **c** и **b** ↔ **d** при изменении температуры. Все четыре изомера имеют (*E*)-конфигурацию гидразонового фрагмента, что было установлено на основе 2D экспериментов NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC и HMBC. Описанные эксперименты были проведены для пар

диастереомеров **9p**, **9q** и **9r**. На рисунке 2 отображены структурные изомеры полученных N-ацилгидразонов и фрагмент спектра NOESY соединения **9p**.

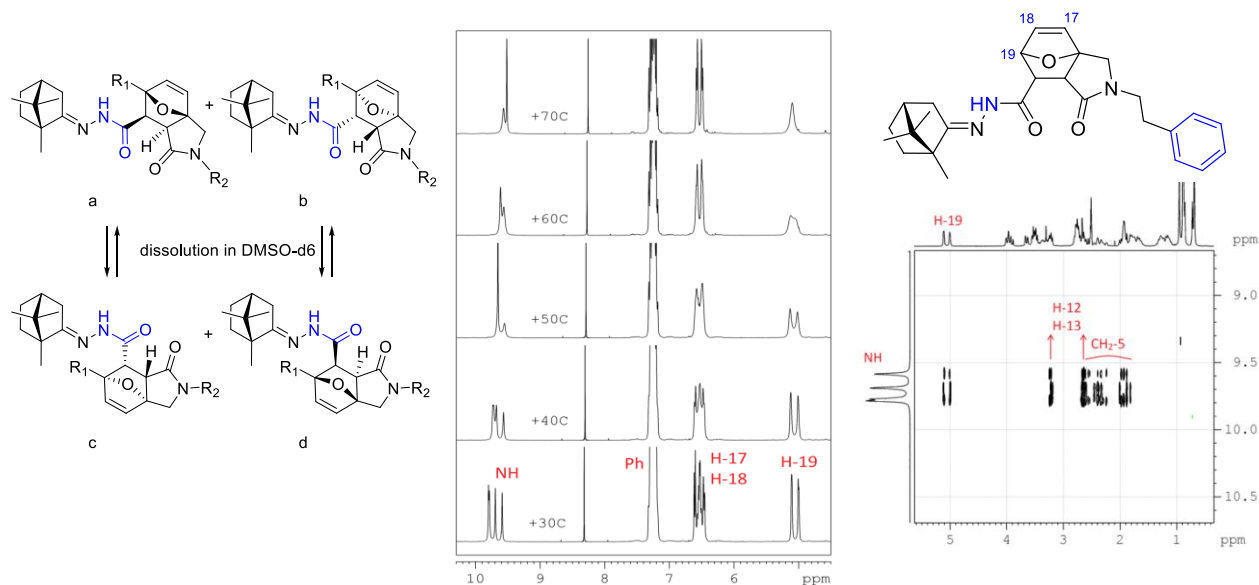


Рисунок 2

Несмотря на различные заместители у циклического атома азота, соединения **9p** и **9n** (рис. 3) являются изоструктурными и кристаллизуются в хиральной моноклинной пространственной группе P21 с четырьмя кристаллографически независимыми молекулами в элементарной ячейке. Однако эти четыре независимых молекулы представляют собой два разных диастереомера с конфигурацией асимметрических центров соответственно 1R, 4R, 3aR, 6S, 7R, 7aS и 1R, 4R, 3aS, 6R, 7S, 7aR в соотношении 1 : 1. Следовательно, кристаллы **9p** и **9n** (и, вероятно, все другие соединения этого ряда) представляют собой хиральные конгломераты. По-видимому, агрегированию молекул в димеры способствует формирование прочных водородных связей между различными диастереомерами.

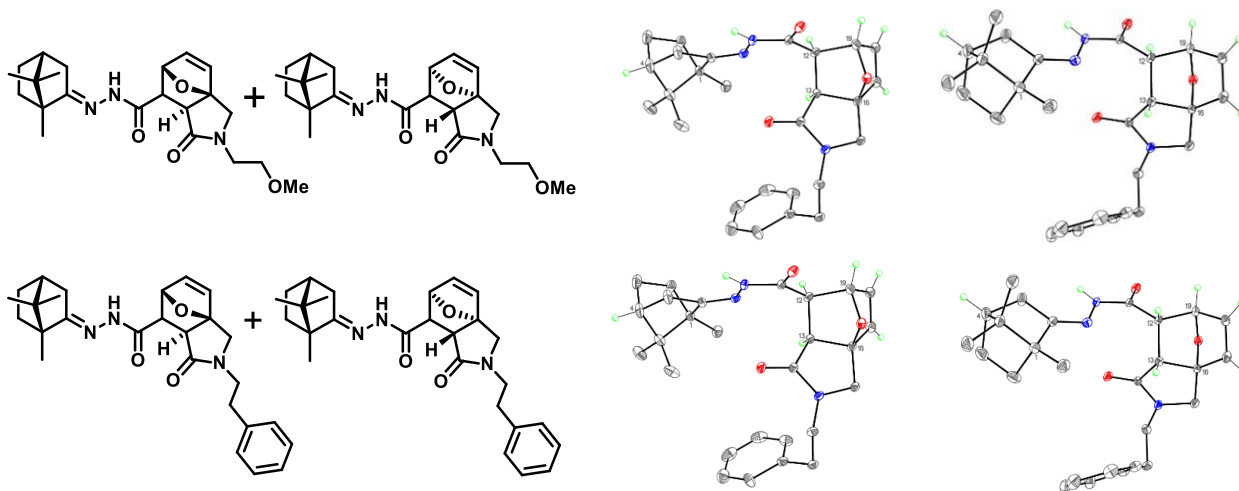


Рисунок 3

Таким образом, в результате химических модификаций гидразонов камфоры и фенхона, нам удалось получить значительную библиотеку производных каркасных монотерпенов, включающую ранее не описанные N-гетероциклические фрагменты и N-ацилгидразоны различного строения. Для соединений, содержащих

оксоиндольные фрагменты, проведена значительная работа по выяснению строения полученных веществ.

## 2. Химические трансформации дегидроабиетиламина

Для получения алифатических пяти-, шести-, и семичленных азотистых гетероциклов проводилась реакция циклизации дегидроабиетиламина **10** с алифатическими дигалогеналканами различного строения. Было показано, что при взаимодействии дегидроабиетиламина **10** с 1,4-дибромбутаном образуется соединение **11a**, содержащее пирролидиновый фрагмент, при взаимодействии с 1,5-дибромпентаном – соединение **11b**, содержащее пиперидиновый фрагмент, а при взаимодействии с 1,6-дибромгексаном – азепановый **11c**. При кипячении бис-(2-бромэтилового) эфира в ацетонитриле с дегидроабиетиламином **10** получено морфолинсодержащее производное **11d** (схема 7). Также было показано, что проведение реакции с использованием микроволновой активации при температуре 110°C позволяет существенно сократить время реакции – с 4-5 часов до 1 часа.

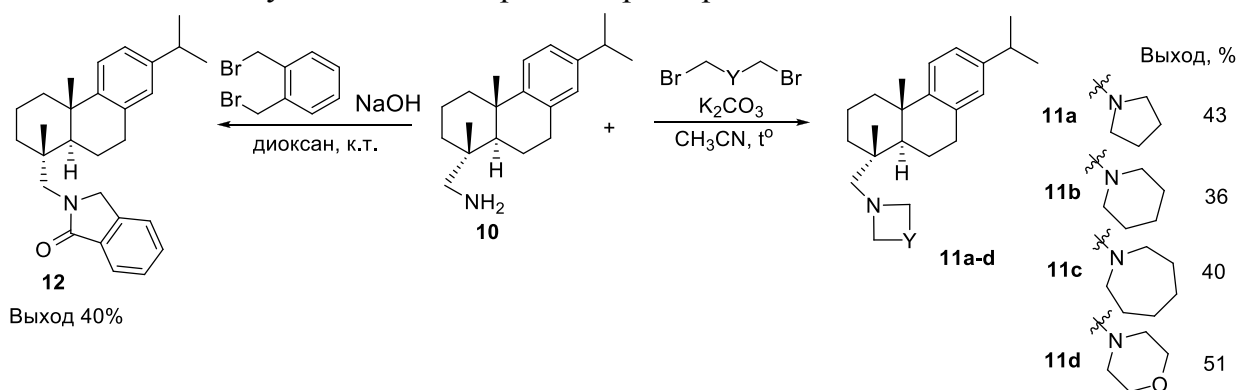


Схема 7

По аналогии с предыдущими превращениями, ожидалось, что взаимодействие ортодибромксилола с дегидроабиетиламином в тех же условиях (кипячение в ацетонитриле) будет приводить к образованию соединения с изоиндолиновым фрагментом. Однако, по данным ГХМС нами наблюдалось образование в смеси еще одного соединения, имеющего молекулярный пик  $M^+$  385, соответствующего изоиндольному производному. Выделить в индивидуальном виде из реакционной смеси вышеупомянутые соединения не удалось. Проведение данной реакции в диоксане в присутствии NaOH привело, в качестве основного продукта, к соединению **12**, содержащему изоиндолиновый фрагмент, выделенному нами методом колоночной хроматографии (схема 7). Можно предположить механизм для реакции дегидроабиетиламина и о-дибромксилола, включающий изначально образование изоиндолинового фрагмента и последующее его окисление в реакционной смеси. Эта версия также согласуется с тем фактом, что доля продукта **12** в реакционной смеси увеличивается при длительном стоянии, а при дополнительной очистке диоксана от перекисей на  $Al_2O_3$  продукта не наблюдается.

Реакция конденсации формальдегида, 1,2-этандитиола и дегидроабиетиламина **10** была применена для получения соединения **13** с 1,5,3-

дитиазепановым фрагментом. Реакция проводилась при комнатной температуре в хлороформе с добавлением 5-10 мольных % катализатора  $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  с образованием соединения **13** (схема 8).

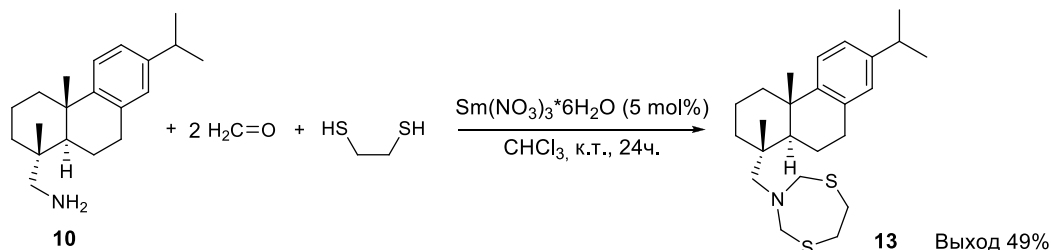


Схема 8

По аналогии с предыдущей реакцией, нами была предложена синтетическая схема, позволяющая получить 1,5,3-оксатиазепановый фрагмент на основе первичной аминогруппы. Данный класс соединений ранее в литературе не был описан. На модельной реакции формальдегида, 2-меркаптоэтанола и 3-диэтиламинопропиламина **14g** нами было изучено влияние  $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$  и  $\text{SnCl}_4$  на конверсию в реакционной смеси. Указанные соли переходных и редкоземельных металлов были добавлены в реакционную смесь в количестве 5 мольных %, ход реакции отслеживали с помощью ГХ/МС спустя 20 часов. Наибольшее процентное содержание целевого гетероциклического продукта **15g** по данным ГХ/МС было зафиксировано при использовании 5 мольных %  $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (96%),  $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$  (92%) и  $\text{CoCl}_2$  (91%). В дальнейших опытах нами были использованы оптимальные условия с использованием нитрата самария (III) в качестве катализатора. Нами был получен набор 1,5,3-оксатиазепанов **15a-l** с различными алифатическими, ароматическими и гетероароматическими заместителями у атома азота. В результате работы было показано, что при взаимодействии первичных аминов, 2-меркаптоэтанола и формальдегида селективно происходит образование ранее не описанного 1,5,3-оксатиазепанового фрагмента (схема 9).

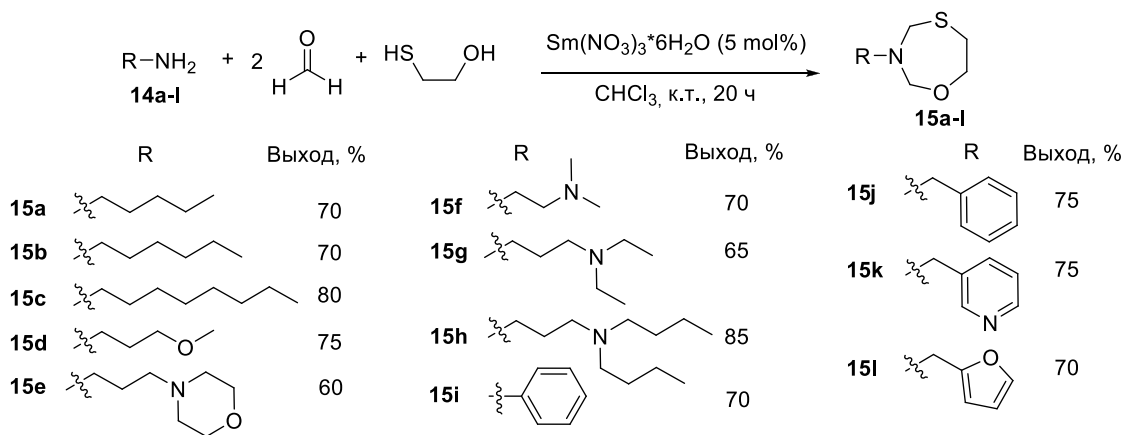


Схема 9

С использованием оптимизированной методики синтеза было получено и выделено в индивидуальном виде соединение **16**, структура подтверждена методами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии (схема 10).

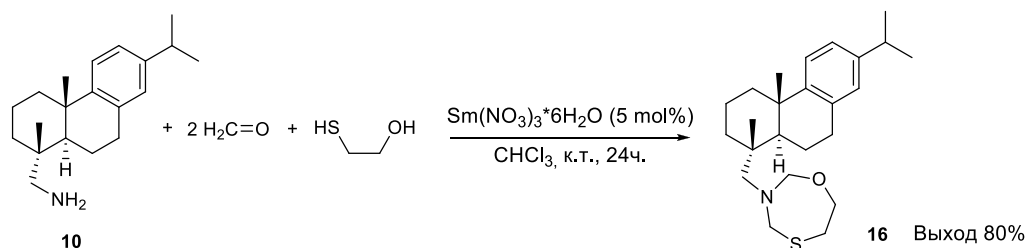


Схема 10

Мочевина и ее производные играют ключевую роль в медицинской химии и разработке лекарственных препаратов благодаря возможности карбамидной функции формировать стабильные водородные связи с белками и мишенями рецепторов. Такие взаимодействия мишень-молекула обуславливают специфическую биологическую активность и свойства. Взаимодействием дегидроабетиламина **10** с алифатическими и ароматическими изоцианатами и изотиоцианатами были получены соответствующие мочевины **17a-e** и тиомочевины **18a-d** с хорошими выходами 70–90% (схема 11).

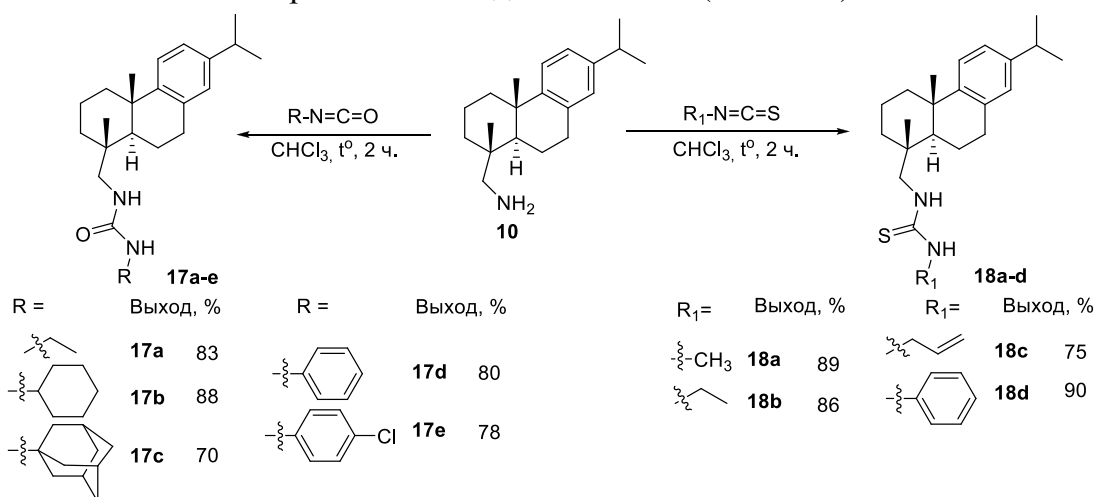


Схема 11

По аналогии с предыдущей реакцией проведено взаимодействие дегидроабетиламина с диизоцианатами. Получены производные, включающие в остов два фрагмента дегидроабетиламина и две группировки мочевины, соединенные линкером. Реакция проводилась в условиях, аналогичных указанным на схеме выше, выходы бисмочевин **19a-c** составили 80-90% (схема 12).

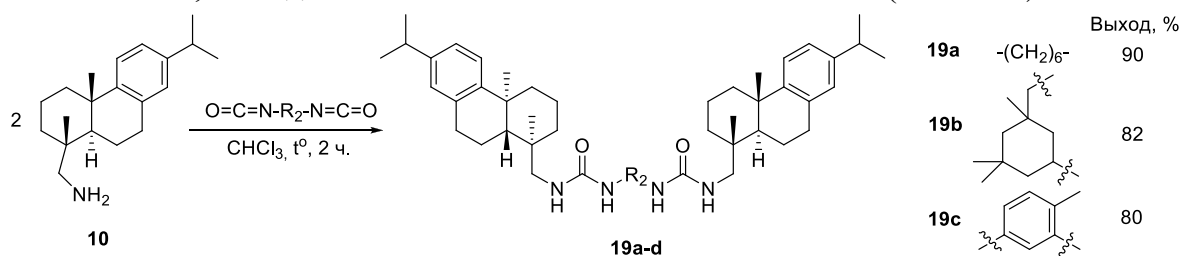


Схема 12

Синтезированные соединения **18a-d** представляют интерес не только с точки зрения изучения их биологической активности, но и с точки зрения возможностей проведения дальнейших трансформаций. Тиомочевины **18a-d** были введены в

реакцию с этилбromoацетатом, что привело к селективному формированию 2-иминотиазолидин-4-онов **20a-d** с выходами 70-95%. Под действием реагента Лавессона амидный фрагмент 2-иминотиазолидин-4-онов **20a-c** был превращен в тиоамидный, в результате чего были получены 2-иминотиазолидин-4-тионы **21a-c** с выходами 70-82% (схема 13).

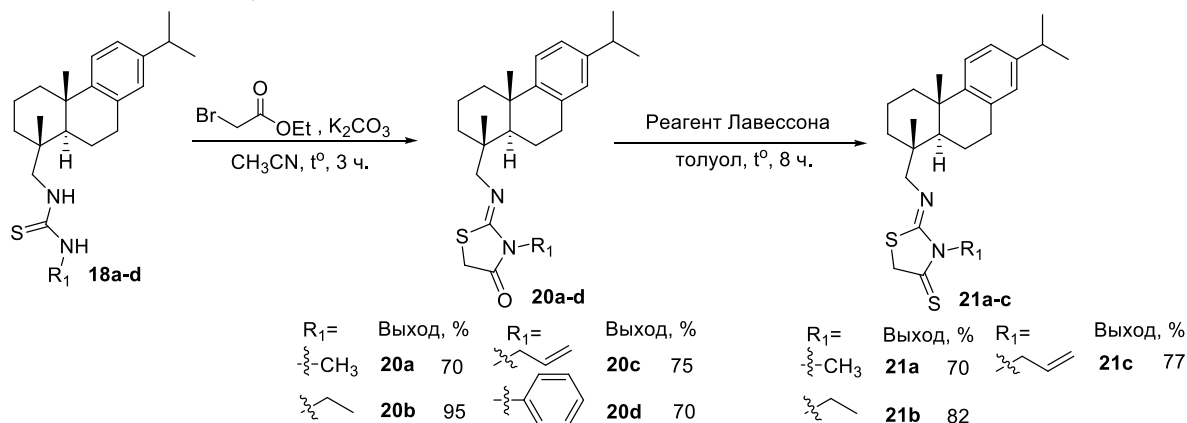


Схема 13

Для получения 2-тиоксоимидазолидин-4-онов **23a-c** проводилась реакция алкилирования дегидроабетиламина этилбromoацетатом с образованием соединения **22**. Затем при кипячении соединения **22** с различными изотиоцианатами происходило образование соответствующих 2-тиоксоимидазолидин-4-онов **23a-c** (схема 14).

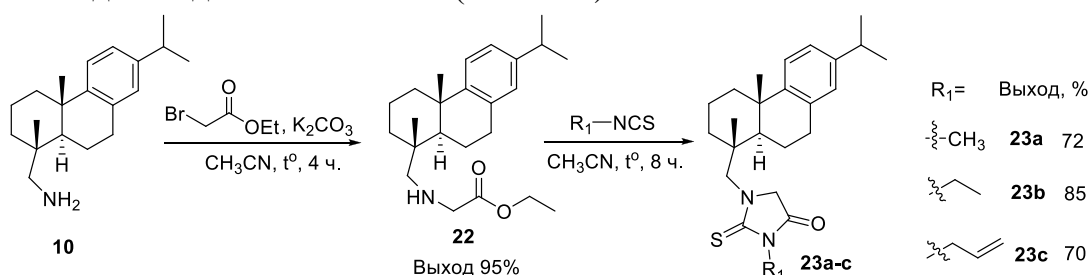


Схема 14

В последние годы роданины стали крайне важными структурными гетероциклическими блоками в области медицинской химии. Путем трехкомпонентной конденсации дегидроабетиламина, сероуглерода и малеинового ангидрида было получено производное **24**, включающее в остов роданиновый цикл и карбоксильную функцию (схема 15).

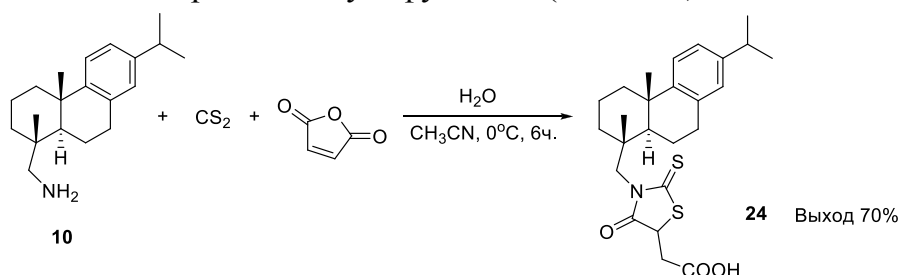


Схема 15

По результатам биологического скрининга в отношении фермента TDP1 наиболее перспективным соединением оказалось **17c**. Соединение обладает

способностью к ингибированию TDP1 в субмикромольных концентрациях, низкой токсичностью по отношению к клеточным линиям, а также способностью усиливать цитостатические свойства противоопухолевого препарата темозоломида в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*. Данный набор характеристик делает соединение **17c** крайне перспективным кандидатом для дальнейших исследований. В связи с этим, нами была поставлена задача синтезировать набор близких структурных аналогов мочевины **17c** для изучения связи структура-активность. Дизайн целевых производных представлен на рисунке 4 и включает в себя замену уреидного линкера, дитерпеновой и адамантановой частей.

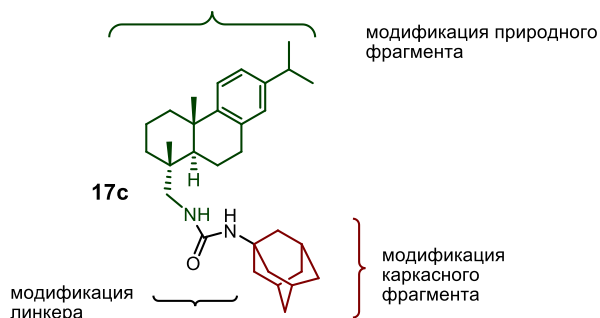


Рисунок 4

В качестве альтернативных терпеновых блоков были использованы нордегидроабиетиновый и норабиетиновый. Также в синтезированной библиотеке присутствуют 2 вида каркасных фрагментов – 1-адамантановый и 2-адамантановый. В качестве линкеров были испробованы группировки мочевины, тиомочевины, амидный и тиоамидный.

Соединение **25** получено при кипячении дегидроабиетиламина **10** с цианатом калия. Для получения соединений **26a-c** дегидроабиетиламин **10** вводился в реакцию с 2-адамантил изоцианатом и 1- и 2-адамантилизоотиоцианатами. Все продукты выделены в индивидуальном виде с помощью колоночной хроматографии (схема 16).

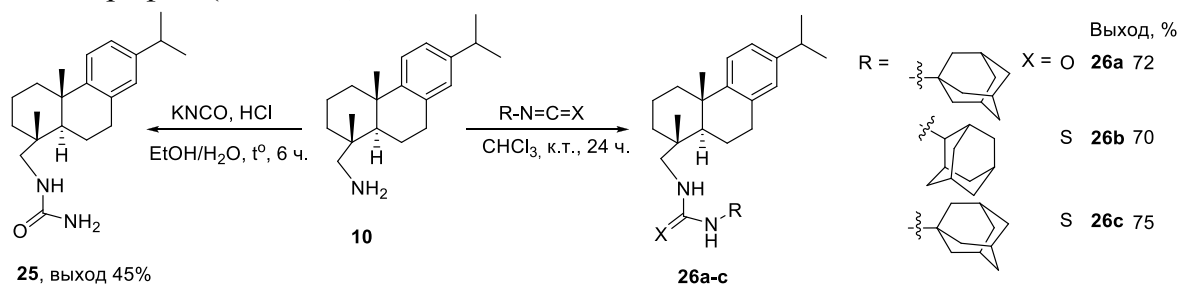


Схема 16

Для получения соединений, включающих в остов нордегидроабиетиновый и норабиетиновый структурные блоки, была предложена синтетическая схема 17. Изоцианаты нордегидроабиетиновой **29** и норабиетиновой **28** кислоты вводились в реакцию с 1- и 2-адамантиламинами. В результате были получены мочевины **28a-b** и **30a-b** с хорошими выходами от 80 до 90%, имеющие в линкере на одну  $\text{CH}_2$  группу меньше, чем в агенте **17c**.



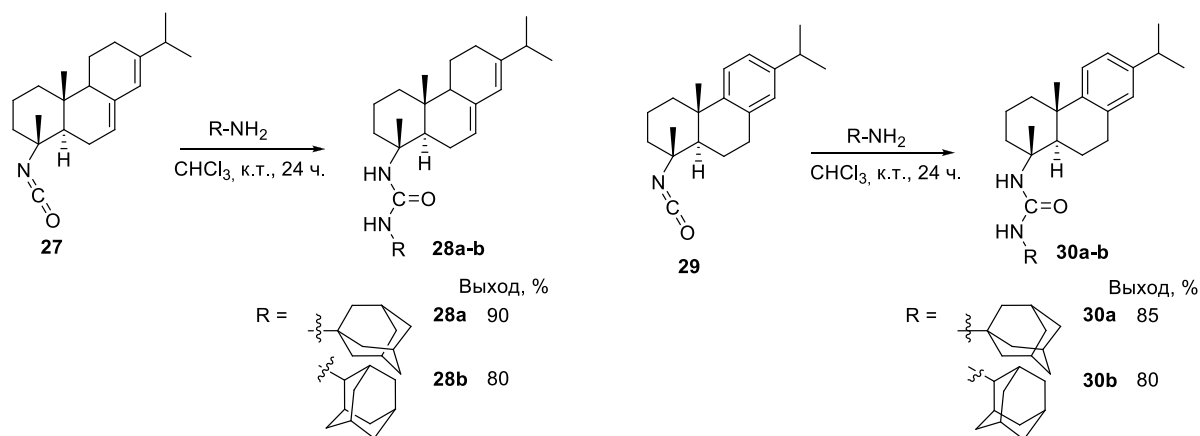


Схема 17

Еще одним вариантом структурно схожего линкера являются амидная и тиаомидная группировки. Целевые амиды **31a-b** были получены при кипячении дегидроабетиламина с хлорангидами 1- и 2-адамтанкарбоновых кислот в ацетонитриле в присутствии триэтиламина (схема 18). Для замены амидного линкера на тиаомидный соединение **31a** кипятили в ксилоле с реагентом Лавессона, что привело к образованию соединения **32a**.

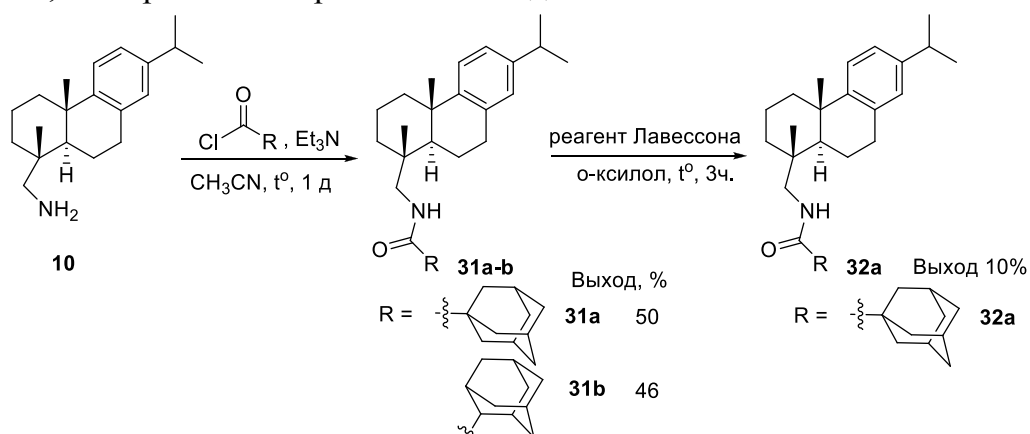


Схема 18

### 3. Изучение биологической активности синтезированных соединений

Для синтезированных в данной работе производных камфоры и фенхона был проведен первичный скрининг в отношении вирусов осповакцины, гриппа и вируса Хантаан. Для соединений **7b-g** и **9m-s** была изучена их противовирусная активность в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 совместно с коллегами из НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург. Умеренную активность проявило соединение **9o**, для которого  $IC_{50}=22\pm 4$  мкМ,  $SI=12$ . Биологическое тестирование в отношении вируса осповакцины *in vitro* было проведено в сотрудничестве с коллегами из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Кольцово. Были протестированы N-ацилгидразоны камфоры и фенхона **7a-g**, **8b-e** и **9m-s**. Наиболее эффективными ингибиторами вируса осповакцины оказались соединения **7d-e**, **8b-e**, **9g**, **9o** (рис. 5). Соединения **7d-e**, **8b-e** представляют собой N-ацилгидразоны камфоры и фенхона с арильными заместителями и значение  $IC_{50}$  для них находилось в диапазоне 0.2-11.1 мкМ, а

индекс селективности в диапазоне от 26 до >465. При этом в рамках данной библиотеки веществ, наибольшую активность проявило соединение **8с**, синтезированное на основе гидразона фенхона **2** и 4-хлорбензойной кислоты. Все протестированные соединения данного типа проявили значительные противовирусные свойства, что говорит о высоком потенциале данного класса для создания лекарственных препаратов для борьбы с ортопоксвирусными инфекциями. Соединения **9g**, **9o** являются конъюгатами камфоры и эпоксиизоиндолов и для них индексы селективности составили 97 и 89 соответственно.

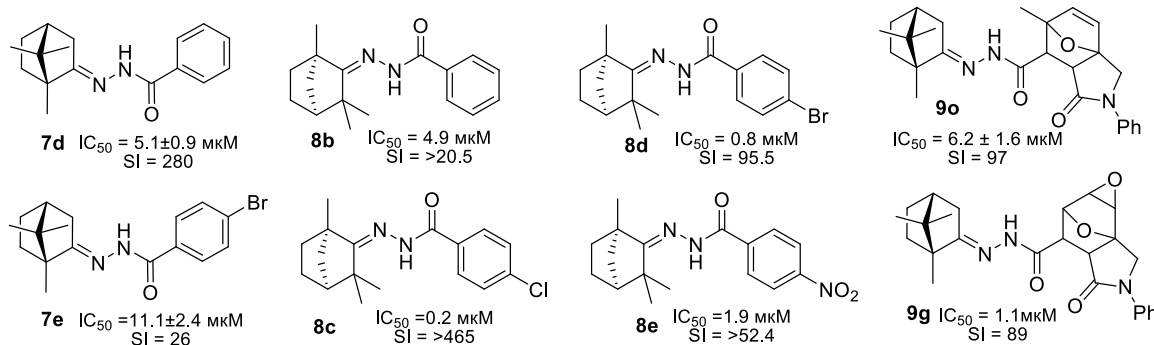


Рисунок 5

Для синтезированной библиотеки N-ацилгидразонов **9a-t** и соединения **7d** был проведен первичный скрининг в отношении вируса Хантаан, штамм 76-188, совместно с коллегами из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Важно отметить, что данная система тестирования была впервые разработана для поиска ингибиторов вирусов Хантаан в рамках совместной работы и ранее в нашей стране такие исследования не проводились. Полученные данные по активности синтезированных соединений в отношении вируса Хантаан показали, что агенты **9a,c,f,h,j,l,o** проявили специфическую противовирусную активность, при этом, вещество **9j**, синтезированное нами на основе гидразона фенхона, оказалось значительно эффективнее препарата сравнения триазавирина (рис. 6). Анализ результатов позволил нам сделать вывод о том, что для проявления целевой активности необходимо наличие заместителя в узловом атоме углерода изоиндольного фрагмента, а также, что введение дополнительных заместителей в N-фенильное кольцо снижает активность и увеличивает токсичность веществ.

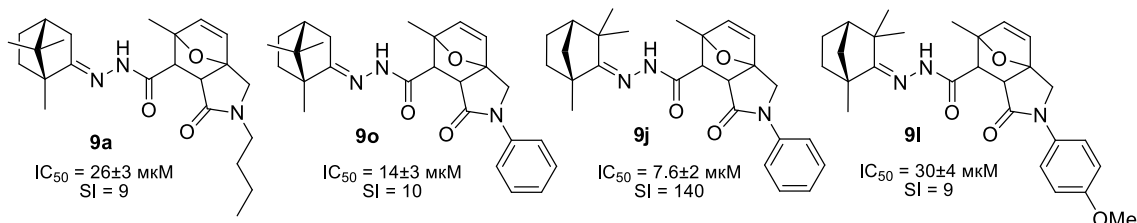


Рисунок 6

Ингибиторные свойства синтезированных соединений **17a-e**, **18a-d**, **19a-c**, **20a-d**, **23a-c**, **24** в отношении фермента TDP1 изучались совместно с коллегами из ИХБФМ СО РАН. Для соединений **17a-e** и **18a-d**, принадлежащих к классу мочевины и тиомочевины значения  $IC_{50}$  не зависят существенно от выбора

структурного блока мочевины или тиомочевины, но коррелируют со строением заместителя у азота уреидной группировки. Соединения **17a**, **18a**, **18b** с небольшими метильными или этильными заместителями продемонстрировали более высокие значения  $IC_{50}$  (1.49-3.7 мкМ). Соединения с ароматическими или большими по размеру алифатическими заместителями ингибируют фермент в концентрациях на порядок меньших (0.10-0.95 мкМ). Наиболее эффективно ингибировать фермент TDP1 продемонстрировало соединение **17c**, включающее в остов объемный адамантановый фрагмент, а также бисмочевины **19a-c**, для которых  $IC_{50}$  составили 0.09-0.19 мкМ. Гетероциклические производные дегидроабиетиламина 2-иминотиазолидин-4-оны **20a-d**, 2-тиоксоимидазолидин-4-оны **23a-c** и роданин **24** проявили также значительную активность в концентрациях 0.19-1.14 мкМ. 2-Иминотиазолидин-4-тионы **21a-c** не удалось проверить в отношении TDP1 из-за их низкой растворимости в воде и ДМСО. Для гетероциклических производных наблюдалась аналогичная закономерность – снижение фермент ингибирующей концентрации при увеличении размера заместителя у азота. Совместно с исследователями НМП ИМПЗ НГУ были определены цитотоксические концентрации для вышеперечисленных соединений. Было показано, что соединения-лидеры **17c**, **19a-b** (рис. 7) не проявили токсичности ( $CC_{50} > 100$  мкМ) на различных клеточных линиях (U-937, U-87MG, MDA-MB, SK-Mel8, A-549, WI-38, MCF7, T98G и SNB19).

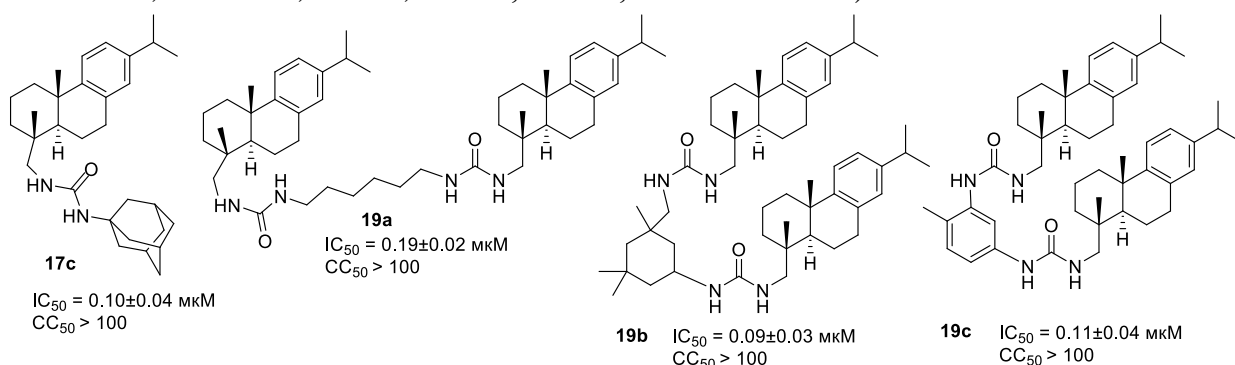


Рисунок 7

Учитывая низкую цитотоксичность синтезированных ингибиторов TDP1, их комбинации с противораковым агентом темозоломидом могут повысить эффективность терапии глиобластомы без увеличения ее токсичности. Чтобы проверить эту гипотезу, мы оценивали цитотоксический эффект ингибиторов TDP1 и темозоломида (применяемых индивидуально или в комбинации) на клеточных линиях глиобластомы человека U-87MG и SNB-19. Мы использовали нетоксичные концентрации мочевины **17c** и **19a-c** (100 мкМ и 75 мкМ) и различные концентрации TMZ (от 1250 мкМ до 2500 мкМ). Жизнеспособность клеток в присутствии комбинаций оценивали с помощью МТТ тестирования.

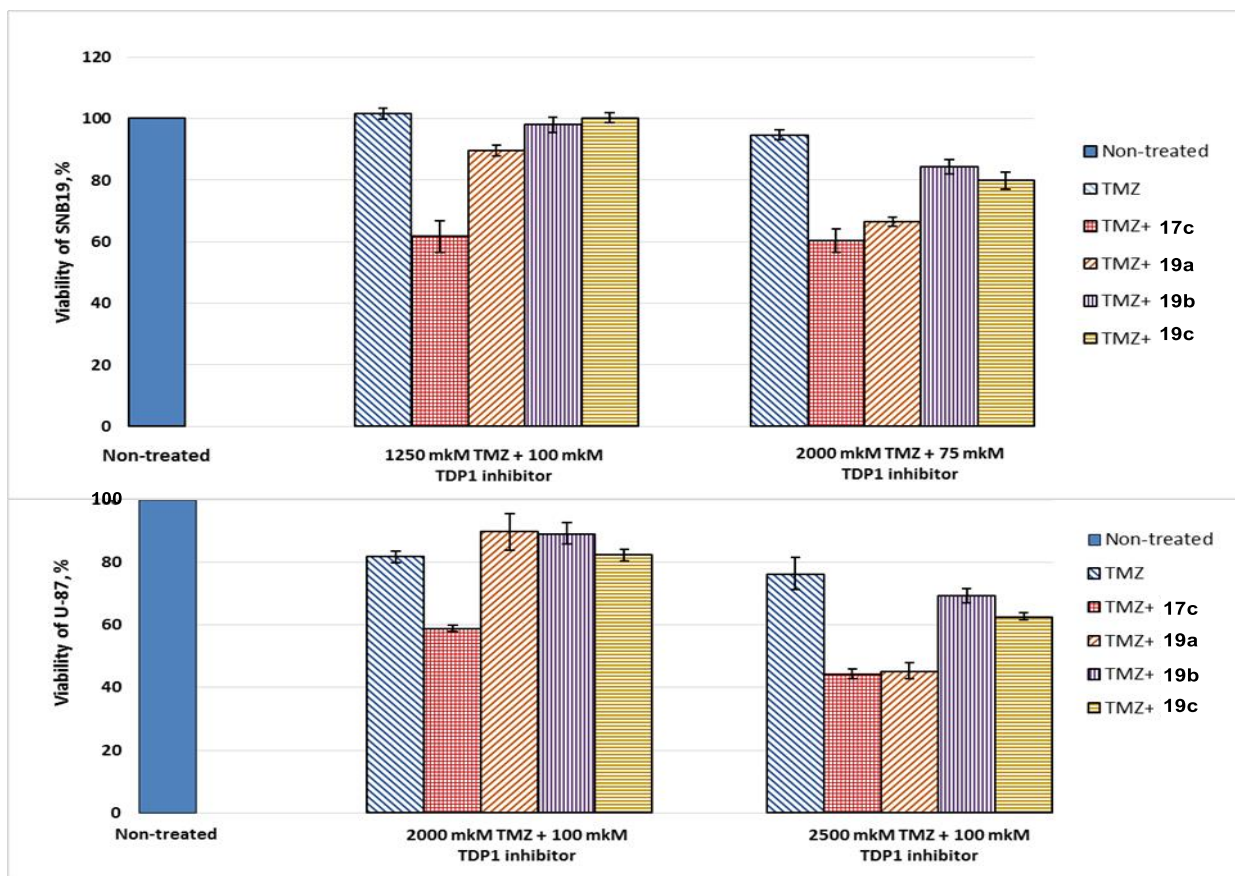


Рисунок 8

Комбинации TMZ с ингибиторами TDP1 в указанных концентрациях приводила к снижению жизнеспособности обеих клеточных линий глиобластомы по сравнению с монотерапией TMZ. К наибольшему увеличению цитотоксического эффекта приводили комбинации с соединениями **17c** и **19a**. Было показано, что использование данных ингибиторов достоверно способно увеличивать эффективность темозоломида *in vitro* до 40%. В продолжение исследования цитостатических свойств комбинаций новых ингибиторов TDP1 с темозоломидом были начаты работы по изучению действия наиболее активных агентов с использованием животных моделей. Данная работа была проведена совместно с сотрудниками SPF-вивария ИЦИГ СО РАН. Целью данного исследования являлась проверка эффективности соединений **17c** и **19a** в терапии *in vivo* на модели подкожной ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 иммунодефицитными мышам линии SCID. Уже на 6 сутки эксперимента во всех экспериментальных группах наблюдалось ингибирование роста опухоли. С этого дня и до окончания эксперимента объем опухолей оставался достоверно меньшим, чем в контроле. В группах агента **17c** в дозе 50 мг/кг и 5 мг/кг на 30 сутки эксперимента было отмечено достоверное отличие от группы с приемом только темозоломида  $X^2=5.56$ ,  $p<0.05$ . Таким образом, было впервые *in vitro* и *in vivo* показано увеличение эффективности темозоломида совместно с ингибитором фермента репарации TDP1 на клеточные линии глиомы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые показана возможность синтеза соединений, содержащих N-гетероциклы, взаимодействием гидразонов каркасных кетонов с доступными дигалогенидами алифатического и ароматического строения.
2. Синтезирована обширная библиотека N-ацилгидразонов камфоры и фенхона, обладающих широким спектром противовирусной активности, проведено изучение связи структуры соединений с проявляемой противовирусной активностью.
3. С применением трехкомпонентной конденсации первичного амина, формальдегида и 2-меркаптоэтанола разработан метод синтеза не описанного ранее в литературе 1,5,3-оксатиазепанового гетероциклического фрагмента.
4. Путем трехкомпонентной конденсации природных соединений, имеющих в структуре первичную аминогруппу, а именно, дегидроабиетиламина и гидразонов камфоры и фенхона, с формальдегидом и этандитиолом получены 1,5,3-дитиазепановые производные.
5. Изучена реакция алкилирования первичной аминогруппы дегидроабиетиламина дигалогеналканами; синтезирован набор новых гетероциклических производных, содержащих пирролидиновые, пиперидиновые, азепановые и морфолиновые фрагменты. Показано, что использование микроволновой активации позволяет сократить время проведения реакции.
6. Отработаны способы получения соединений, содержащих в структуре дитерпеновый дегидроабиетиновый структурный блок и фармакофорные группировки мочевины, тиочевины, иминотиазолидинона и тиоксоимидазолидинона. Впервые показано, что полученные соединения являются эффективными ингибиторами фермента репарации TDP1 и способны проявлять синергетический эффект с противоопухолевым препаратом темозоломидом на клетках глиобластомы.

### Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Kovaleva K.S.**, Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Zarubaev V.V., Shtro A.A., Orshanskaya Y.R., Salakhutdinov N.F. Synthesis of new heterocyclic dehydroabietylamine derivatives and their biological activity // Chem. Heterocycl. Compd. 2017. Vol. 53, № 3. P. 364-370.
2. **Kovaleva K.S.**, Yarovaya O.I., Fadeev D.S., Salakhutdinov N.F. One-pot synthesis of 1,5,3-oxathiazepanes via the three-component condensation of primary amines, formaldehyde and 2-mercaptoethanol // Tetrahedron Lett. 2017. Vol. 58, № 19. P. 1868-1870.
3. **Kovaleva K.S.**, Zubkov F.I., Bormotov N.I., Novikov R.A., Dorovatovskii P.V., Khrustalev V.N., Gatilov Y.V., Zarubaev V.V., Yarovaya O.I., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. Synthesis of d-(+)-camphor-based N-acylhydrazones and their antiviral activity // MedChemComm. 2018. Vol. 9, № 12. P. 2072-2082.
4. **Kovaleva K.**, Oleshko O., Mamontova E., Yarovaya O., Zakharova O., Zakharenko A., Kononova A., Dyrkheeva N., Cheresiz S., Pokrovsky A., Lavrik O., Salakhutdinov N. Dehydroabietylamine Ureas and Thioureas as Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1

Inhibitors That Enhance the Antitumor Effect of Temozolomide on Glioblastoma Cells // J. Nat. Prod. 2019. Vol. 82, № 9. P. 2443-2450.

5. **Kovaleva K.**, Mamontova E., Yarovaya O., Zakharova O., Zakharenko A., Lavrik O., Salakhutdinov N. Dehydroabietylamine-based thiazolidin-4-ones and 2-thioxoimidazolidin-4-ones as novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors // Mol. Divers. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10132-z>

**Результаты диссертации доложены на международных и всероссийских конференциях:**

6. **Ковалева К.С.**, Яровая О.И., Зарубаев В.В., Салахутдинов Н.Ф. Противовирусная активность новых производных дегидроабиетиламина. Сборник тезисов докладов 3-его междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике 2017 (МОБИ-ХимФарма 2017) Под редакцией К.В. Кудрявцева, Е.М. Паниной. 2017. С. 28.

7. **Ковалева К.**, Фадеев Д., Яровая О., Брызгалов А., Толстикова Т., Салахутдинов Н. Синтез 1,5,3-оксатиазепанов и их биологическая активность. Сборник тезисов докладов Всероссийской научной конференции «Современные проблемы органической химии». Новосибирск, 2017, С. 201.

8. **Kovaleva K.S.**, Yarovaya O.I., Fadeev D.S., Salakhutdinov N.F. One-pot synthesis of 1,5,3-oxathiazepanes via the three-component condensation. Abstr. book 26th ISHC Congress. 2017, P. 141, Regensburg, Germany.

9. **Kovaleva K.S.**, Yarovaya O.I., Ivanov A.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis of new heterocyclic camphor hydrazone derivatives. Book of abstract XXII International Conference on Organic Synthesis (22-ICOS). 2018, P. 316. Florence, Italy.

10. **Ковалева К.**, Яровая О., Мамонтова Е., Захаренко А., Захарова О., Олешко О., Кононова А., Черезис С., Салахутдинов Н. Синтез производных дегидроабиетиламина - нового класса ингибиторов TDP1. Сборник тезисов докладов Молодёжной научной школы-конференции "Актуальные проблемы органической химии" 2018, С. 137. Шерегеш, Кемеровская обл.

11. **Ковалева К.С.**, Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф. Синтез иминотиазолидионов и тиоксоимидазолинонов на основе дегидроабиетиламина в качестве ингибиторов Tdp1. Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней, сборник тезисов, 2019, С. 55. Красновидово, Россия.

12. **Kovaleva K.S.**, Oleshko O., Mamontova E., Yarovaya O., Zakharova O., Zakharenko O., Kononova O., Dyrkheeva N., Cheresiz S., Pokrovsky A., Lavrik O., Salakhutdinov N. The enhancement of the antitumor effect of temozolomide on glioblastoma cells by novel dehydroabietylamine derivatives, European Symposium on Organic Reactivity (ESOR 2019), P. 106.

13. **Kovaleva K.S.**, Ponomarev K., Yarovaya O., Oleshko O., Cheresiz S., Mamontova E., Zakharenko A., Zakharova O., Lavrik O., Pokrovsky A., Salakhutdinov N. Dehydroabietylamine bisureas as new tdp1 inhibitors increasing temozolomide and lomustine efficacy against glioblastoma multiforme», Asian Chemical Congress (ACC 2019), Тайвань, 8-12 декабря, 8-3, стр. 4.

**Патенты и заявки на патенты:**

14. Патент RU 2697409, 1-Адамантил-3-(((1R,4aS,10aR)-7-изопропил-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил)метил)мочевина, проявляющая ингибирующее действие в отношении фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека и увеличивающая активность темозоломида в отношении клеток глиобластомы // О.С. Олешко, **К.С. Ковалева**, О.И. Яровая, Е.М. Мамонтова, А.Л.

Захаренко, О.Д. Захарова, С.В. Чересиз, А.Г. Покровский, О.И. Лаврик, Н.Ф. Салахутдинов – опубл. 14.08.2019, Бюл. № 23.

15. Патент RU 2724882, 1,1'-(Гексан-1,6-диил)бис(3-(((1R,4aS,10aR)-7-изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил)метил)мочевина, проявляющая ингибирующее действие в отношении фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека и увеличивающая активность темозоломида в отношении клеток глиобластомы // **К.С. Ковалева**, О.С. Олешко, О.И. Яровая, Е.М. Мамонтова, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, С.В. Чересиз, А.Г. Покровский, О.И. Лаврик, Н.Ф. Салахутдинов – опубл. 26.06.2020, Бюл. № 18.

16. Заявка 2020108370 от 26.02.2020, N-Ацилгидразон фенхона с фрагментом эпоксиизоиндола, используемый в качестве ингибитора репродукции вируса Хантаан// О.И. Яровая, **К.С. Ковалева**, А.В. Зайковская, О.В. Пьянков, Ф.И. Зубков, Р.А. Максютков, Н.Ф. Салахутдинов - решение о выдаче патента на изобретение.

### Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.х.н. Яровой Ольге Ивановне за постановку актуальных задач исследования, помощь при проведении экспериментов и подготовке научных публикаций, а также за всестороннюю поддержку. Автор благодарит заведующего Лабораторией физиологически активных веществ член-корреспондента РАН, д.х.н., проф. Салахутдинова Наримана Фаридовича за постановку задач и создание в научном коллективе благоприятной атмосферы для проведения исследований. Автор благодарит центр коллективного пользования НИОХ СО РАН за предоставление физико-химических экспериментальных данных, а также выражает благодарность к.х.н. Шернюкову А.В., к.х.н. Фадееву Д.С. и к.х.н. Пешкову Р.Ю. за помощь в расшифровке спектров ЯМР. Автор благодарит к.х.н. Зубкова Ф.И. доцента РУДН г. Москва за помощь в проведении исследований конъюгатов терпеноидов и эпоксиизоиндолов. Автор благодарит коллег из Новосибирского Государственного Университета к.б.н. Черезиса С.В., асп. Олешко О.С. и член-корреспондента РАН д.м.н, проф. Покровского А.Г. за проведение исследования цитотоксических свойств синтезированных соединений и изучение синергетических эффектов производных дегидроабиетиламина с противоопухолевыми препаратами; заведующего ЦКП «SPF»-виварий, к.б.н., Завьялова Е.Л. за изучение данных эффектов *in vivo*. Автор выражает благодарность сотрудникам ИХБФМ к.б.н. Захаренко А.Л. и д.х.н., проф., академику РАН Лаврик О.И. за исследования ингибирующей активности синтезированных веществ в отношении TDP1; д.б.н. Зарубаеву В.В. сотруднику института Пастера г. Санкт-Петербург за исследования противовирусной активности в отношении вируса гриппа; коллективу вирусологов из ГНЦ «Вектор» - к.б.н. Пьянкову О.В., д.б.н. Шишкиной Л.Н., Бормотову Н.И. и к.б.н. Зайковской А.А. за изучение противовирусных свойств синтезированных соединений в отношении вирусов осповакцины и вируса Хантаан; Коневу В.Н. м.н.с. института катализа им. Борескова за помощь в получении изоцианатов смоляных кислот.