

На правах рукописи



Соколова Анастасия Сергеевна

**СИНТЕЗ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
ПРОИЗВОДНЫХ КАМФОРЫ И БОРНЕОЛА**

(02.00.03 - органическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

НОВОСИБИРСК – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирском национальном исследовательском государственном университете».

Научный руководитель: **Салахутдинов Нариман Фаридович**
доктор химических наук, профессор,
НИОХ СО РАН, заведующий лабораторией

Официальные оппоненты: **Новиков Вячеслав Леонидович**
доктор химических наук, профессор,
ФГБУН Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
ведущий научный сотрудник

Говди Анастасия Иосифовна,
кандидат химических наук, ФГБУН Институт
химической кинетики и горения СО РАН,
научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт органической и
физической химии им. А. Е. Арбузова

Защита состоится «23» июня 2016 г. В 9³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.049.01 при ФГБУН Новосибирском институте 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 по адресу: <http://web.nioch.nsc.ru/>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки 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 Д 003.049.01; e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru.

Автореферат разослан « » мая 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук

Шульц Э.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Интерес исследователей к химическим превращениям терпеновых соединений обусловлен доступностью и оптической чистотой этого класса веществ. Предметом исследования настоящей работы являются химические модификации монотерпеноидов, содержащих в своем остове бицикло-[2.2.1]-каркасный фрагмент – (+)-камфора и (-)-борнеол. Данные терпеноиды в нативном виде активно используются в качестве лекарственных препаратов, однако химическим превращениям с целью получения биологически активных веществ не уделено должного внимания. В связи с этим синтез новых производных камфоры и борнеола представляет важную и актуальную задачу медицинской химии.

Целью работы является разработка способов синтеза новых производных (+)-камфоры и (-)-борнеола с разнообразным набором азотсодержащих функциональных групп для дальнейшего исследования биологической активности и установления взаимосвязи “структура-активность”.

Научная новизна работы.

- На основе (+)-камфоры разработаны способы синтеза большого ряда иминопроизводных камфоры – нового класса эффективных ингибиторов вируса гриппа типа А. Детальное изучение взаимосвязи “структура-активность” позволило обнаружить соединение-лидер – 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанол, проявившее максимальную вирусингибирующую активность в отношении вируса гриппа H1N1. Высокая противовирусная активность *in vitro* и *in vivo*, и низкая токсичность позволила приступить к доклиническим исследованиям данного соединения. В рамках доклинических исследований разработана и валидирована методика количественного определения 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в плазме крови.
- Впервые синтезированы симметричные четвертичные аммониевые производные (+)-камфоры с различной степенью экранирования атома азота и расстоянием между заряженными группами.
- Разработан подход к синтезу новых производных (-)-борнеола, включающих серу- и/или азотсодержащие гетероциклические фрагменты: пиперазиновый,

пирролидиновый, пиперидиновый, морфолиновый, 2-меркаптобензимидазольный, 2-меркаптобензоксазольный, 2-меркаптобензотиазольный, 3-меркапто-1,2,4-триазольный.

- Впервые получен ряд производных включающих циклобутановое кольцо и 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановые фрагменты.

Практическая значимость работы заключается в разработке новых способов синтеза ряда производных камфоры и борнеола, которые являются привлекательными для дальнейших фармакологических исследований. Сотрудниками НИИ Гриппа г. Санкт-Петербурга осуществлено тестирование *in vitro* синтезированных производных камфоры и борнеола и выявлены соединения с выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А. На наиболее активном соединении изучена активность на вирусах гриппа различного происхождения и серотипа. Предположен, вероятный механизм действия, который заключается в ингибировании вирусного белка гемагглютинаина, обеспечивающий способность вируса присоединяться к клетке-хозяина. Соединение-лидер находится на стадии доклинических исследований, выполняемых в рамках НИОКР «Доклинические исследования противовирусного лекарственного средства на основе иминопроизводного природного монотерпеноида» № 14411.2049999.19.085 от 22.10.14 (ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»). В лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН в результате экспериментов *in vivo* выявлены дикватернизированные производные камфоры, обладающие миорелаксантами активностью; среди производных α -труксиловой кислоты, содержащих бициклический фрагмент, обнаружены агенты с анальгетической активностью. На часть практически важных результатов получены 3 патента.

Апробация работы. Результаты выполненной работы обсуждались на семинарах Отдела медицинской химии, молодежных конкурсах научных работ НИОХ СО РАН. Отдельные части работы были доложены на международных конференциях: «Current Topics in Organic Chemistry» (Novosibirsk, June 6-10, 2011), Шестая Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием Менделеев-2012 (г. Санкт-Петербург, 3-6 апреля 2012 г),

50-я Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» МНСК-2012 (г. Новосибирск, 13-19 апреля 2012 г.), Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2013» (г. Москва, 8-12 апреля 2013 г), 3rd International Conference on Pharmaceutical Sciences (Tbilisi, Georgia, 29-31 May 2015), Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии (Крым, пгт Новый свет, 25-28 мая 2014), 2-nd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem-2015 (Novosibirsk, 5-10 July 2015), Youth Conference "Current Topics in Organic Chemistry" (Russia, Sheregesh, 21-27 March, 2015).

Публикации. По материалам диссертации в рецензируемых журналах опубликовано 5 работ, получено 3 патента.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 146 страницах и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, главы о фармакологических исследованиях, экспериментальной части, выводов, перечня используемых сокращений, списка литературы. Список цитируемой литературы включает 134 наименований. Диссертация содержит 8 таблиц, 22 рисунка и 69 схем. Литературный обзор включает в себя сведения о синтезе производных камфоры и борнеола, приводящие к биологически активным веществам.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Синтез иминопроизводных (+)-камфоры

Для создания библиотеки иминопроизводных (+)-камфоры нами были разработаны способы синтеза различных иминов. Показано, что взаимодействие (+)-камфоры с аминами имеющими не высокую температуру кипения (пропиламин, бутиламин, циклопропиламин) гладко проходит в микроволновой печи СЕМ (Discover® SP System) в присутствии $Ti(iOPr)_4$ в качестве дегидратирующего агента и приводит к соответствующим иминам **2-4**. При переходе к более тяжелым гомологам ($n \geq 4$) оптимальным условием синтеза иминов **5-10** является нагревание до кипения исходных реагентов без растворителя с использованием в качестве катализатора $ZnCl_2$ (схема 1). В случае октадекан-1-амина реакция протекает при кипячении исходных реагентов в толуоле в присутствии каталитического количества $BF_3 \cdot Et_2O$ с использованием насадки Дина-Старка.

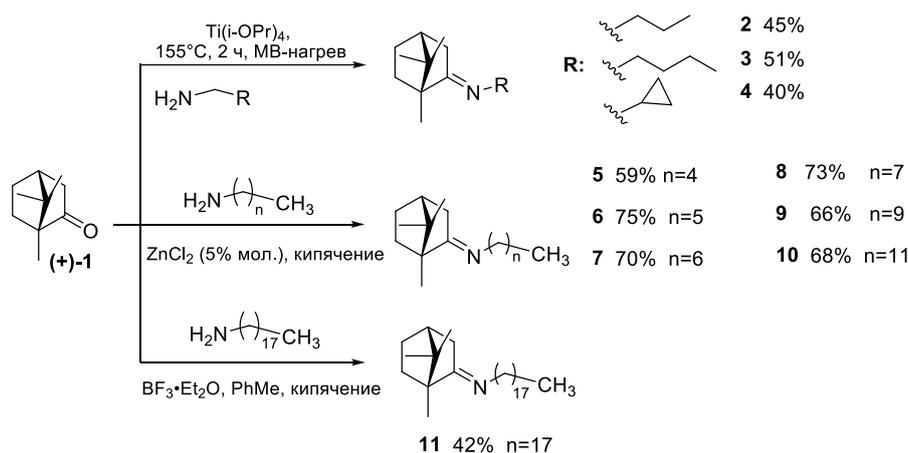


Схема 1

Введение гидроксильной группы может увеличивать как биоактивность так и растворимость соединения, поэтому нами осуществлено взаимодействие (+)-камфоры с рядом аминспиртов: 2-аминоэтанол, 3-аминопропанол-1 и 5-аминопентанол-1 в результате были получены иминопроизводные **12-14** (схема 2).

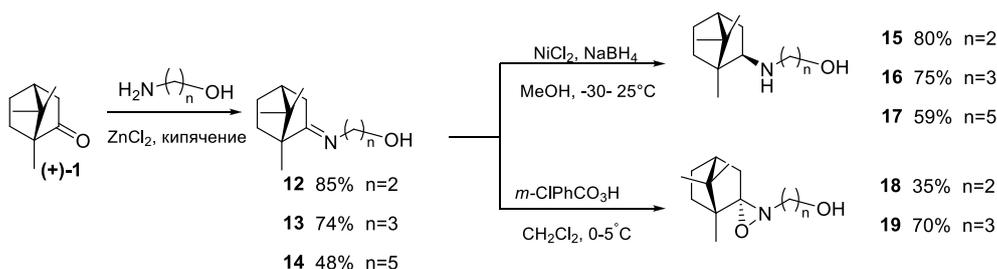


Схема 2

Иминогруппа в соединениях **12-14** была восстановлена с помощью системы $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$ в результате были выделены экзо амины **15-17**. Действием *m*-хлорнадбензойной кислотой при 0 °С на основания Шиффа **12-14** были получены транс-оксазиридины (схема 2).

Для расширенного изучения зависимости структура-активность, нами были получены иминопроизводные **20-36**, содержащие различные функциональные группы, ароматические и гетероароматические фрагменты. Так, получено соединение **20**, содержащее иминную и сложноэфирную группу; синтезированы производные, включающие дополнительную первичную либо третичную аминогруппу, фрагменты морфолина, циклогексана, а именно, продукты **21-26**; получен набор ароматических и гетероароматических иминов на основе камфоры **27-35**; синтезировано соединение, содержащее два фрагмента природного остова – **36** (схема 3).

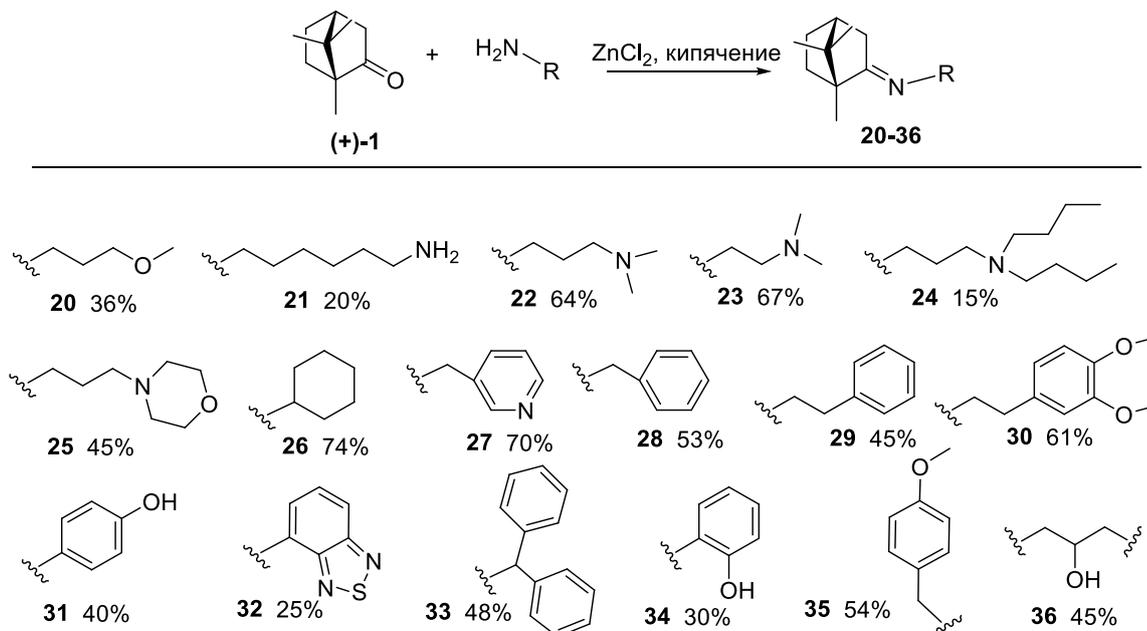


Схема 3

Строение всех соединений подтверждено данными масс-спектров высокого разрешения и данными ЯМР-спектров. Строение соединений **12** и **31** дополнительно подтверждено методом РСА.

Таким образом, взаимодействием (+)-камфоры с простыми алифатическими аминами, а также аминами, содержащими в своей структуре ароматические, гетероароматические фрагменты, дополнительные амино- и гидроксигруппы, получен большой набор соответствующих иминов. Показана возможность окисления и восстановления иминогруппы в некоторых синтезированных иминоспиртах.

Синтез аналогов 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола

Исследования биологической активности синтезированных соединений **2-36**, проведённые сотрудниками НИИ Гриппа г. Санкт-Петербурга в отношении вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09), показали их высокую эффективность как ингибиторов репродукции этого вируса. Нами было выбрано соединение-лидер, основываясь на следующих критериях: высокая противовирусная активность, низкая токсичность и достаточно хорошая растворимость. По совокупности данных критериев таким соединением оказалось иминопроводное **12**, полученное на основе (+)-камфоры и аминоэтанола.

Далее, нами проведено более детальное исследование зависимости структура-активность. При создании новых лекарственных веществ, имеющих хиральные центры, следует иметь в виду, что различные энантиомеры могут обладать различным, и даже противоположным биодействием. Поэтому необходимо было синтезировать энантиомер соединения – лидера **12** – соответствующий имин на основе (-)-камфоры **36**. Также провели варьирование природного остова, где в качестве исходных монотерпеноидов были выбраны монотерпеноиды, представленные на рисунке 1. Кроме того, для изучения влияния природного остова на биологическую активность в качестве модельного кетона был выбран циклогексанон **41**.

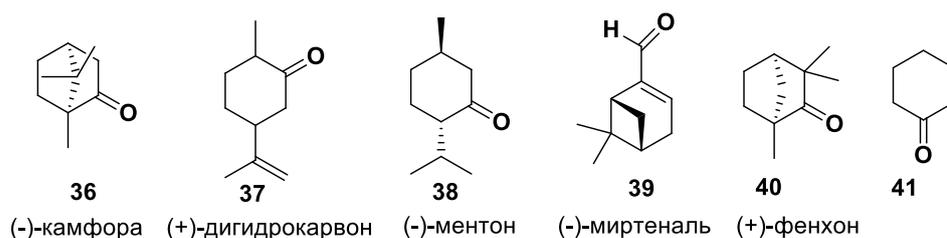


Рисунок 1

Имин **42** на основе (-)-камфоры был синтезирован альтернативным путем при взаимодействии исходных реагентов в среде $\text{Si}(\text{OEt})_4$. (-)-Миртеналь вступает в реакцию с аминоэтанолом при комнатной температуре в присутствии безводного Na_2SO_4 в результате получен имин **43**. Попытки ввести (+)-дигидрокарвон, (-)-ментон, (+)-фенхон во взаимодействие с аминоэтанолом оказались безуспешными. При

исследовании реакции аминоэтанола с циклогексаноном обнаружено, что превращение протекает с образованием спирооксазилидина **44** (схема 4).

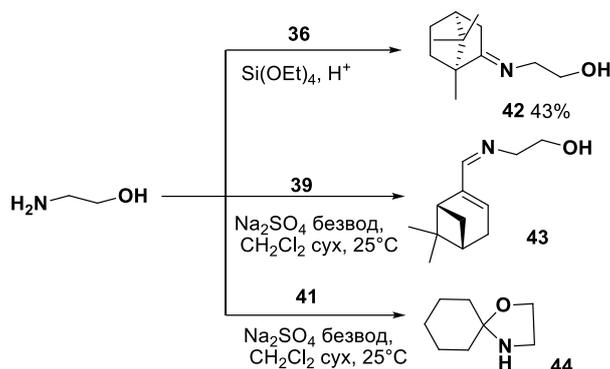


Схема 4

Следующим шагом при изучении соотношения структура-активность была модификация гидроксильной группы соединения лидера **12**. Так, был получен метиловый эфир **45** и сложные эфиры **46** и **47**. Метилирование проводили диазометаном, который генерировали действием щёлочи на нитрозометилмочевину. Превращение иминоспирта **12** в метиловый эфир **45** сопровождается побочными реакциями, чем объясняется умеренный выход продукта реакции. Ацетат **46** получен взаимодействием уксусного ангидрида с иминоспиртом **12**. Сложный эфир **47** синтезирован из хлорангирида коричной кислоты и иминоспирта **12** в присутствии Et₃N и ДМФА (схема 5).

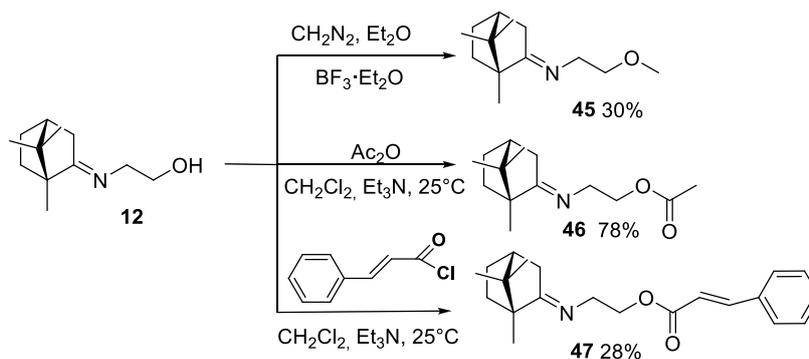


Схема 5

В результате исследования ингибирования репродукции вируса гриппа синтезированных производных **42**, **43** и **45-47** выявлено, что модификация остова и гидроксильной группы приводит к снижению противовирусной активности.

Синтез симметричных дииминов на основе (+)-камфоры

Взаимодействием (+)-камфоры с рядом алифатических дииминов в условиях азеотропной отгонки воды и в присутствии каталитических количеств BF₃·Et₂O

получены соответствующие основания Шиффа **48 a-e** в качестве основных продуктов (схема 6).

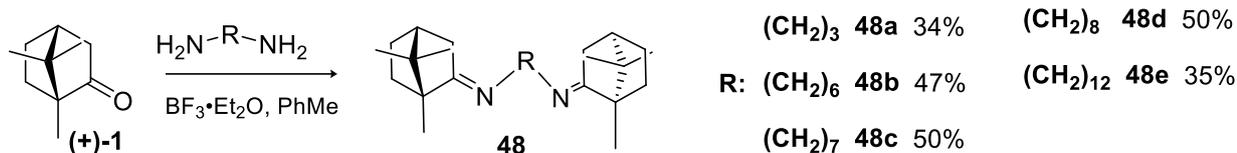


Схема 6

Нагревание (+)-камфоры с ароматическими диаминами: 4,4'-метилendiанилином и 4,4'-оксидианилином аминами в присутствии эквимолярного количества $\text{Si}(\text{OEt})_4$ привело к дииминам **49 a,b**. Ввиду низкой реакционной способности ароматических аминов также были выделены аминоимины **50 a,b** (схема 7).

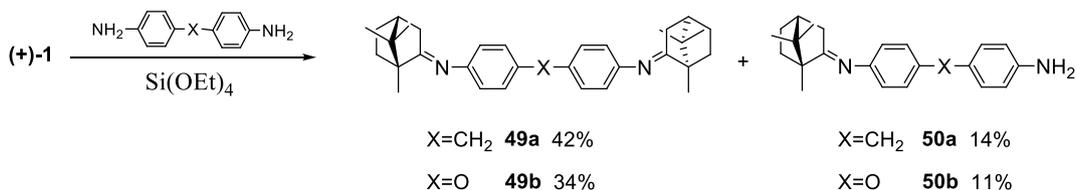


Схема 7

Три представителя алифатических диимinov **48 b,c,e** и ароматические диимины **49 a, b** были восстановлены в соответствующие экзо, экзо - диамины **51 a-e** (схема 8). Восстановление проводили с использованием системы $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$.

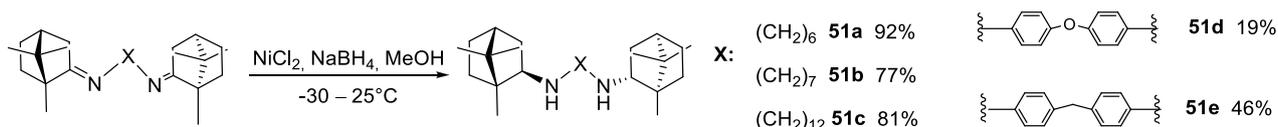


Схема 8

При этом восстановление ароматических диимinov проходило с низкой конверсией. С целью увеличения выхода целевых диаминов нами были рассмотрены другие восстановительные системы: $\text{LiAlH}_4/\text{TГФ}$, полиметилгидросилоксан (PMHS)/ ZnCl_2 , BH_3/L -пролин, восстановление водородом в проточном реакторе H-cube (ThalesNano). Высокая конверсия реакции восстановления ароматического диимина **49a** (70%) наблюдалась при использовании в качестве восстановительной системы комплекса пролина с дибораном, сгенерированным *in situ* с помощью NaBH_4/I_2 . Тем не менее, восстановление проходило не стереоселективно: по

результатам ЯМР образовывалась смесь стереоизомеров. В результате, подобранная ранее методика ($\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$), является наиболее эффективной и стереоселективной для восстановления ароматических дииминов на основе (+)-камфоры. Полученные диамины далее могут быть превращены в другие функциональные группы, например, третичные амины или четвертичные аммониевые соли.

В связи с высокой противовирусной активностью соединения **12** нами была проведена его димеризация, с помощью дихлорангидридов янтарной и адипиновой кислот. На схеме 9 представлен синтетический путь к целевым сложным эфирам **53 a-b**.

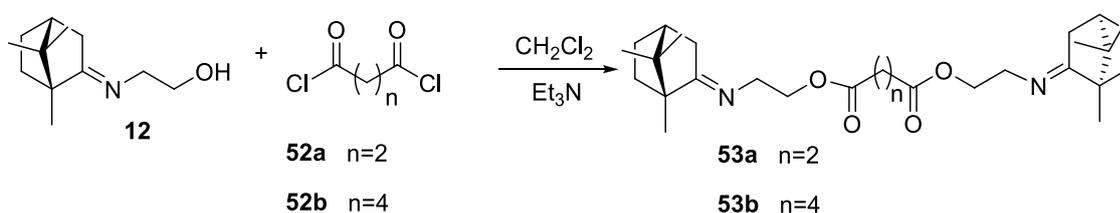


Схема 9

Таким образом, нами была синтезирована группа дииминов на основе (+)-камфоры; подобраны оптимальные условия для стереоселективного восстановления синтезированных дииминов в экзо-экзо-диамины; на основе 2-(1,7,7-триметилбicyclo[2.2.1]гептан-2-илиден)аминоэтанола **12**, проявившего высокую противовирусную активность, синтезированы симметричные сложноэфирные производные.

Синтез дикватернизованных производных камфоры

Для синтеза целевых соединений на первом этапе получен третичный амин **54** взаимодействием (+)-камфоры с N,N-диэтилэтан-1,2-диамином в условиях азеотропной отгонки воды в толуоле в присутствии $\text{VF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ с выходом 90%. Для получения симметричных “димерных” молекул в качестве линкеров использовали дигалогениды алифатического строения с разной длиной цепи и пара-ксилилен дибромид. В результате получили ряд симметричных азотсодержащих производных камфоры, имеющих заряженный атом азота **55 a-g**. Действием на иминоамин **54** йодистым метилом или бромистым этилом были синтезированы монокватернизованные соли **56** и **57** (схема 10).

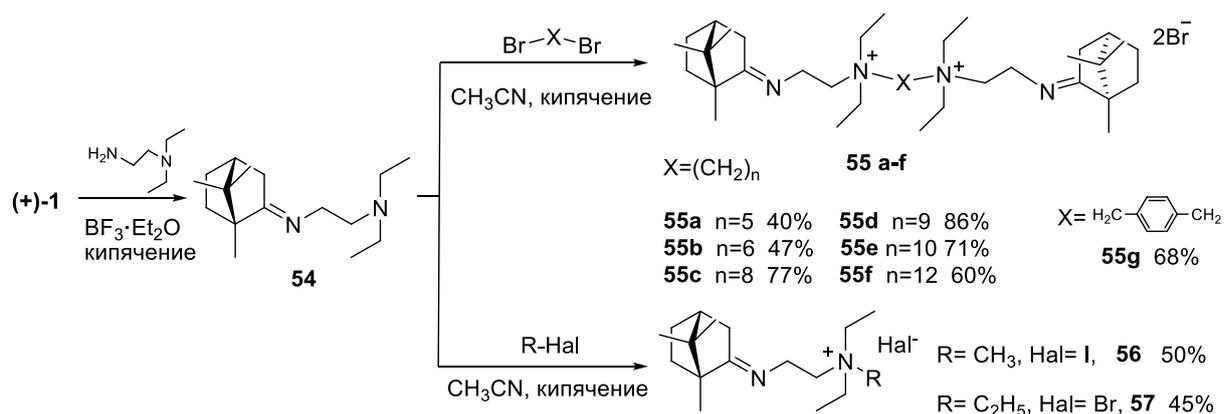


Схема 10

Исследование миорелаксантной активности на мышцах, проведенное сотрудниками лаборатории фармакологии НИОХ СО РАН показало, что из ряда соединений **55 a-g** только продукт **55g**, содержащий *para*-замещенное ароматическое кольцо в линкерной цепочке, в дозах 10 мг/кг и 15 мг/кг способен вызывать мышечное расслабление у животных.

С целью изучения влияния экранированности заряженного атома азота на биологическую активность исследуемых соединений нами в качестве другой стартовой молекулы было выбрано производное **23**, содержащее третичную аминогруппу. Взаимодействием амина **23** с *para*- и *meta*-ксилилен дибромидом были получены соответствующие соли **58**, **59** (схема 11).

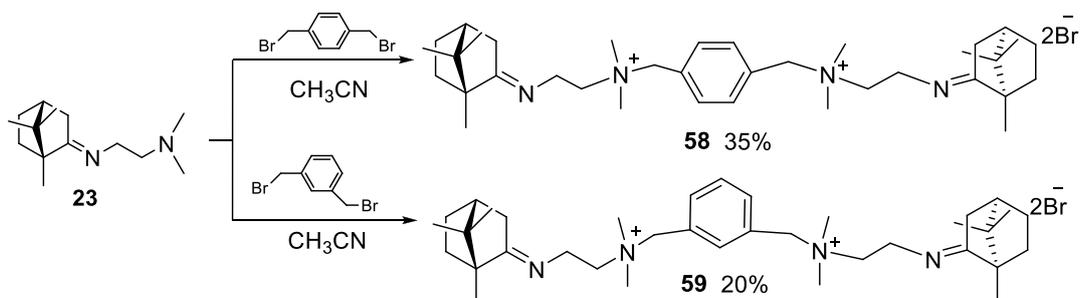


Схема 11

Альтернативным способом получения дикватернизованных производных камфоры является метилирование симметричных диаминов. Так, нами было проведено метилирование аминов **51 b,c** диметилсульфатом до третичных аминов **60 b,c**, которые были очищены с помощью колоночной хроматографии. Затем метилированием йодистым метилом получили дикватернизованные соли **61 b,c** в индивидуальном виде (схема 12).

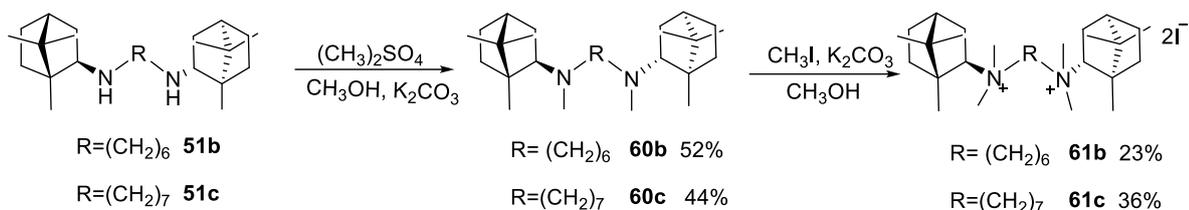


Схема 12

Таким образом, впервые осуществлен синтез димерных аммониевых производных (+)-камфоры с различной степенью экранирования и расстоянием между заряженными атомами азота.

Синтез азотсодержащих гетероциклов (-)-борнеола

Синтез целевых азотсодержащих гетероциклов (-)-борнеола (**-62**) представлен на схеме 13. На первой стадии взаимодействием (-)-борнеола с хлорангидридами хлоруксусной и хлорпропионовой кислот были получены соответствующие α - и β -хлорсодержащие эфиры **63**, **64**. Последующее алкилирование гетероциклических N-нуклеофилов галогенсодержащими эфирами **63**, **64** привело к гетероциклическим производным **65-80** с высоким выходом.

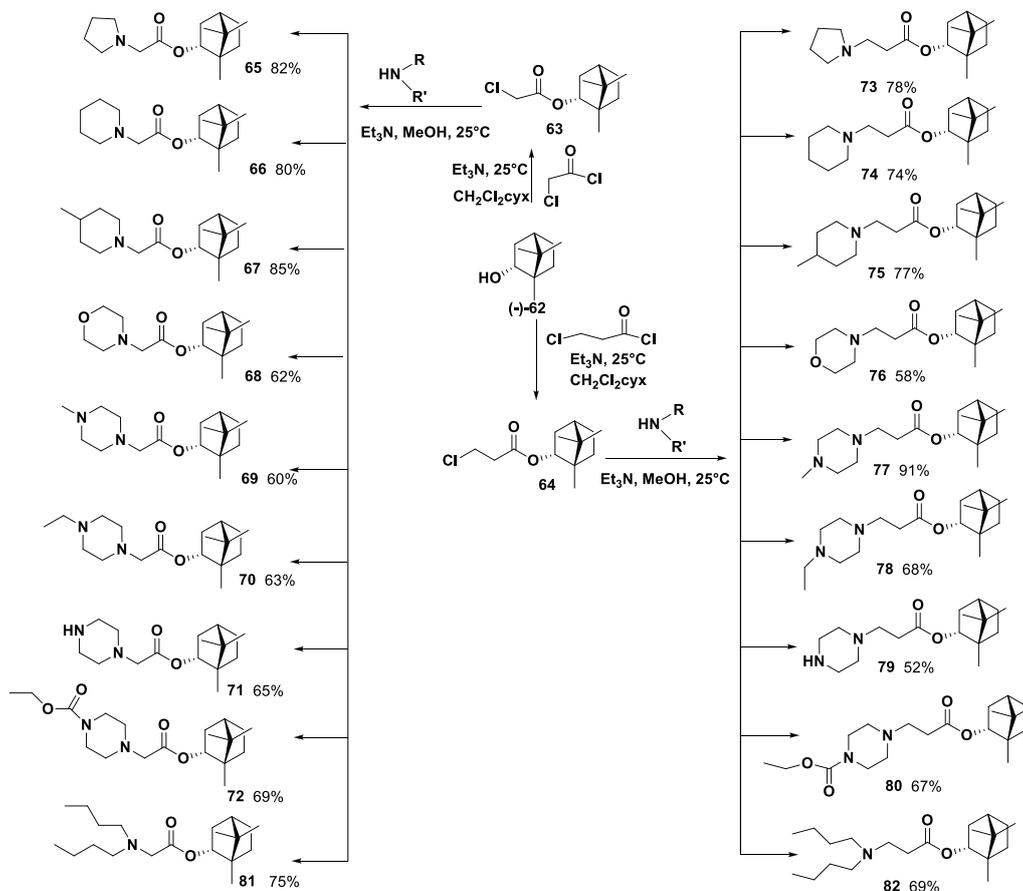


Схема 13

Кроме того, в реакцию с галогенсодержащими эфирами **63**, **64** был введен алифатический амин – дибутиламин в результате были выделены азотсодержащие производные **81** и **82**. Найденные для реакции с азотсодержащими гетероциклами оптимальные условия проведения процесса (MeOH, Et₃N, 25°C) оказались эффективными и для реакции с дибутиламином (схема 13).

В качестве азотсодержащих гетероциклов также были выбраны тиазолидин-2,4-дион и триазол. Нуклеофильное замещение атома хлора в β-хлорпропаноате борнеола **64** в реакции с 1,2,4-триазолом и тиазолидин-2,4-дионом при использовании указанной выше методики (MeOH, Et₃N, 25°C) не происходило. (1S)-эндо(-)-борнил-3-(2,4-диоксотиазолидин-3-ил)пропаноат **83** удалось получить нагреванием соединения **64** с диазабициклоундеценом (ДБУ) в ацетонитриле. Аналогично было получено производное 1,2,4-триазола **84** с выходом 45% (схема 14).

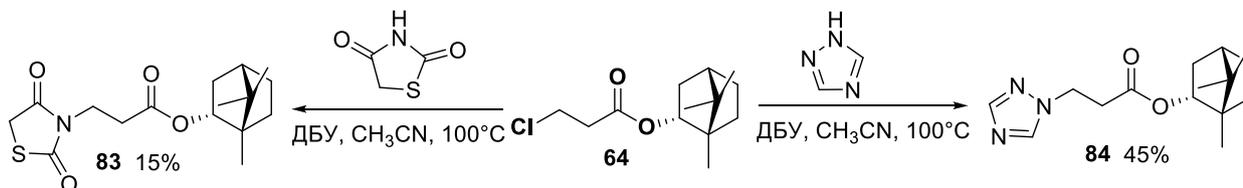


Схема 14

Синтез гетероциклических производных (-)-борнеола, на основе трансформаций 2-меркаптобензимидазола и его аналогов

Реакция хлорацетата борнеола **63** с 2-меркаптобензотиазолом **85** гладко протекает при комнатной температуре в ацетоне и при использовании K₂CO₃ в качестве основания. Отметим что, аналогичное превращение с 2-меркаптобензоксазолом **86** и 2-меркаптобензимидазолом **87** в данных условиях не приводит к соответствующим продуктам. Наилучшие результаты алкилирования были достигнуты с использованием системы *изо*-пропанол-водный раствор KOH (18 М). Так, нагреванием хлорацетата борнеола **63** с тиолами **86** и **87** удалось получить соответствующие гетероциклы **89**, **90** (схема 15).

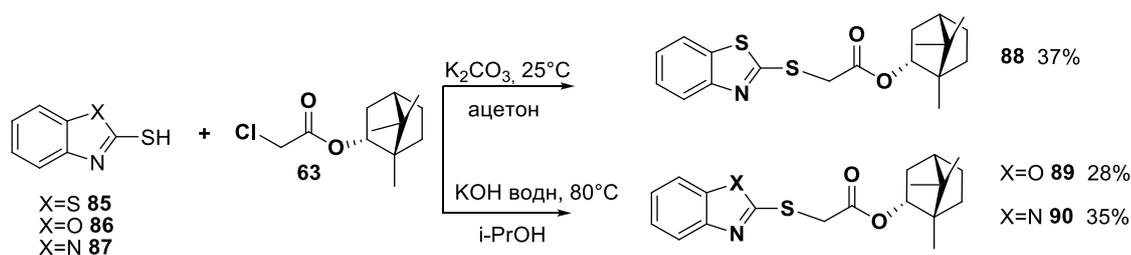


Схема 15

В случае 3-хлорпропаноата борнеола **64**, взаимодействие с 2-меркаптобензотиазолом **85** и 2-меркаптобензоксазола **86** проходит в ацетоне при слабом нагревании и приводит к образованию двух продуктов S- и N-алкилирования (схема 16). По данным спектров ЯМР ^1H соотношение **91a** и **91b** примерно 1:1, соотношение в случае **92a** и **92b** 0.5:1. Сложные эфиры **91 a-b** и **92 a-b** были выделены колоночной хроматографией и охарактеризованы в индивидуальном виде.

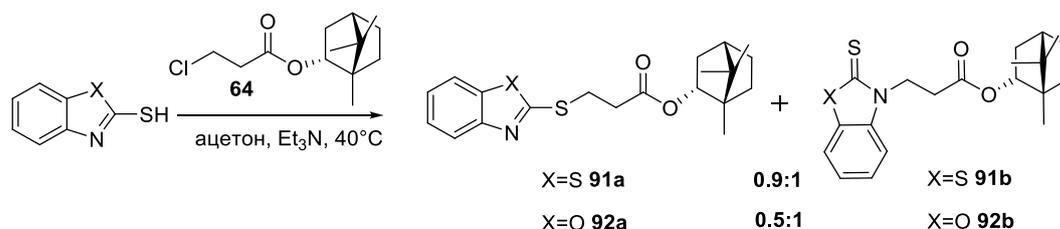


Схема 16

Реакция алкилирования 2-меркаптобензимидазола **87** хлоридом **64** в условиях, описанных выше (ацетон, Et_3N), протекает с невысокой конверсией. Заметно увеличить конверсию и выход удалось заменой растворителя на ацетонитрил, а основания – на диазобициклоундецен (ДБУ). При этом образование продукта S-алкилирования не наблюдалось, замещение проходило исключительно по обоим атомам азота с образованием димерного продукта **93** (схема 17).

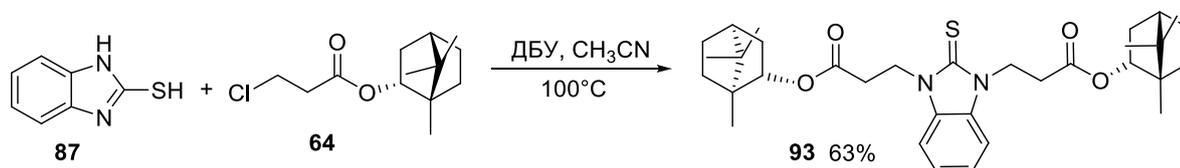


Схема 17

Проведено взаимодействие 3-хлорпропаноата борнеола **64** с 1,2,4-триазол-3-тиолом, в результате был выделен продукт S-алкилирования **94**, продукта замещения по атому азота не наблюдали (схема 18).

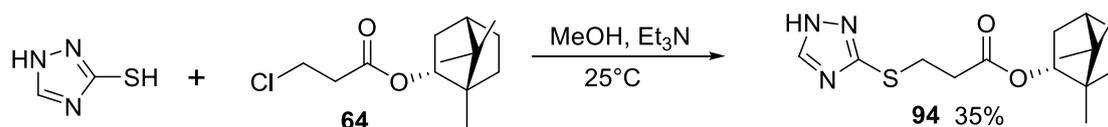


Схема 18

Таким образом, нами впервые осуществлен синтез производных (-)-борнеола, содержащих 2-меркаптобензимидазольный, 2-меркаптобензоксазольный, 2-меркаптобензотиазольный, 3-меркапто-1,2,4-триазольный фрагмент.

Синтез производных α -труксиловой кислоты, содержащих природный фрагмент борнильной структуры

Аналоги α -труксиловой кислоты – уникальная группа органических соединений, имеющих в своем остоле четырехчленное кольцо и проявляющих различные биологические активности. Нам удалось разработать простой и эффективный способ синтеза производных α -труксиловой кислоты, содержащих 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый фрагмент. В качестве соединений, содержащих борнильный фрагмент, были выбраны (-)-борнеол, 2-(1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден)аминоэтанол **12** и 1,7,7-триметил[2.2.1]гептан-2-амин (борниламмин).

α -Труксиловая кислота была получена фотокаталитической циклодимеризацией коричной кислоты. Ключевой стадией в синтезе соединений **98 а-е** является взаимодействие хлорангидрида α -труксиловой кислоты с различными аминами и спиртами. Альтернативным путем получен амид **99** конденсацией α -труксиловой кислоты с (+)-экзо-борниламином, используя реагент Мукайямы (схема 19). Строение всех соединений подтверждено данными масс-спектров высокого разрешения и данными ЯМР-спектров. Строение соединения **99** также подтверждено методом РСА.

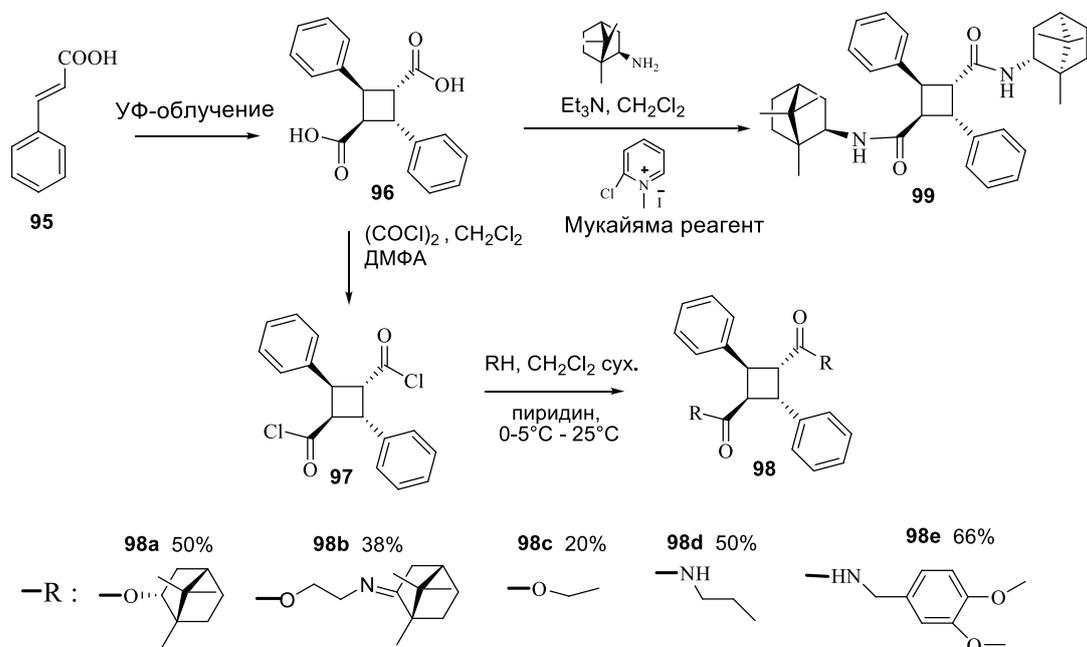


Схема 19

Синтезированные соединения **98 а-е**, **99** были исследованы сотрудниками лаборатории фармакологии НИОХ СО РАН на анальгетическую активность в тестах

«горячая пластина», «уксусные корчи». Выявлено, что соединения **98a** и **99** проявляют анальгетическую активность, в то время как исходная α -труксиловая кислота и производные **98 с-е**, не содержащие терпеновый фрагмент, такой активности не показали.

Таким образом, фотокаталитическая димеризация коричной кислоты и последующее взаимодействие с различными аминами и спиртами природной структуры является эффективным методом синтеза производных α -труксиловой кислоты – потенциальных анальгетических агентов.

Разработка и валидация аналитической методики количественного определения Камфецина в плазме крови

В связи с высокой противовирусной активностью *in vitro* и *in vivo* и низкой токсичностью, соединение **12** поступило на доклинические исследования. При проведении подобного рода исследований важным аспектом получения фармакокинетических данных является измерение концентрации лекарственных препаратов в биологических матрицах. Поэтому в рамках данного исследования перед нами была поставлена задача - разработать и валидировать аналитическую методику количественного определения соединения **12** в плазме крови. Для соединения **12** нами было предложено рабочее название – Камфецин (рисунок 2).

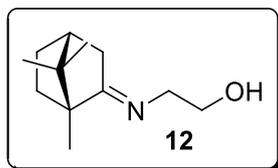


Рисунок 2. Структура Камфецина.

1. Подбор условий хроматографирования.

В рамках данной работы рассматриваются два метода анализа Камфецина в плазме крови: ВЭЖХ с УФ-детектированием и метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС).

Основным лимитирующим фактором применения ВЭЖХ для определения Камфецина является практически отсутствие поглощения в диапазоне излучения 190-700 нм и высокий предел обнаружения (>1000 нг/мл). Методом ГХ-МС удалось достичь предел обнаружения Камфецина в плазме крови 100 нг/мл, поэтому в качестве условий хроматографирования были выбраны следующие: газовый

хроматограф Agilent 7890А с квадрупольным детектором Agilent 5975С, режим регистрации индивидуальных ионов (SIM).

2. Подбор условий пробоподготовки

Для достижения наиболее полного извлечения Камфецина из плазмы крови, было проведено варьирование условий пробоподготовки. Так, проведены эксперименты с высаливанием, добавлением детергентов, изменением рН среды. Однако значительно улучшить степень извлечения не удалось. В результате была выбрана следующая процедура пробоподготовки: осаждение белков метанолом, экстракция препарата в этилацетат.

Таким образом, нами была разработана аналитическая методика количественного определения Камфецина в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии и соответствующая процедура пробоподготовки.

3. Валидация методики определения Камфецина в плазме крови

Валидацию методики проводили по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образца.

3.1 Селективность.

Селективность определяли путем анализа 6 различных образцов плазмы крови. Все образцы проверены на отсутствие интерференций на времени удерживания Камфецина. Таким образом, подтверждена селективность разработанной аналитической методики.

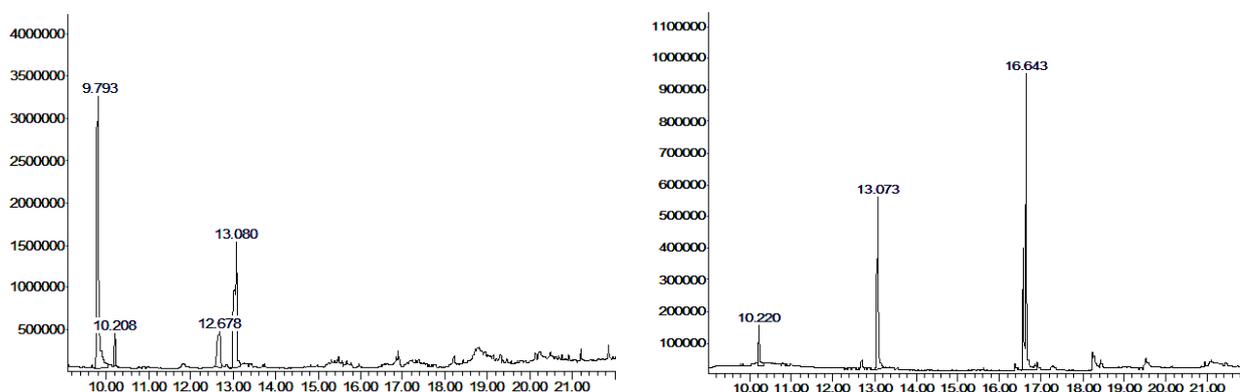


Рисунок 3. Хроматограмма плазмы, содержащей раствор стандартного образца Камфецина с концентрацией 100 нг/мл, время удерживание Камфецина 12.6 мин. (слева). Хроматограмма холостого образца плазмы, не содержащей раствор стандартного образца Камфецина (справа).

3.2 Линейность

Для построения калибровочной прямой проводили анализ 5 образцов плазмы с добавлением стандартного раствора Камфецина до получения концентраций 0.1 мкг/мл, 0.5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 1.5 мкг/мл, 2 мкг/мл. На рисунке 3 приведена зависимость площади пиков хроматограммы от концентрации вещества. Критерий приемлемости – квадрат коэффициента корреляции линейной зависимости вида « $y=a \cdot x+b$ » должен быть не менее 0.99. Полученные результаты удовлетворяют данному критерию, значение квадрата коэффициента корреляции составляет 0.9977.

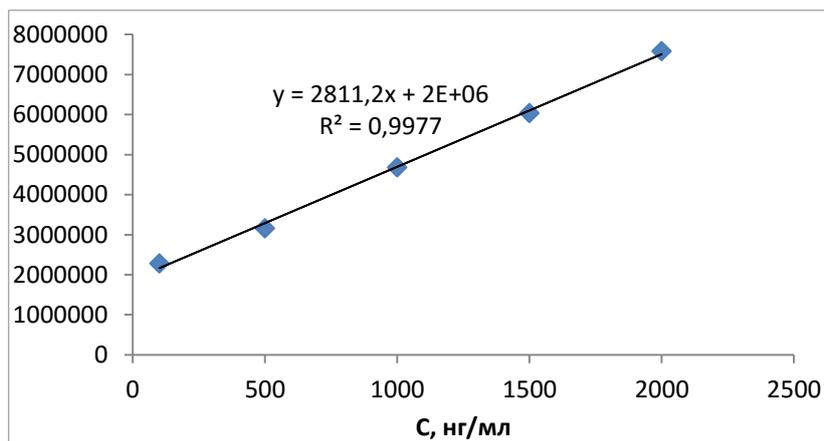


Рисунок 4. Зависимость площади пика хроматограммы от концентрации камфецина в плазме (С).

Таким образом, подтверждена линейность аналитической методики в диапазоне концентраций от 0.1 мкг/мл до 2.0 мкг/мл. Рассматриваемый диапазон пригоден для количественного определения Камфецина в биологической среде.

3.3 Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности проводили анализ трех образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора Камфецина до получения концентраций: 0.1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл. Исследования проводили в течение первого дня (intra-day) и второго дня (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Правильность и прецизионность методики

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл)		Найдено (нг/мл), среднее значение		RSD, % (n=3)		ε, %	
	*	**	*	**	*	**	*	**
100	114.9	88.1	104	103.2	14.4	12.8	4	3.2
	87.6	108.5						
	110,5	113.1						
1000	1021.7	1143.4	1038.4	1116.8	1.39	2.4	3.8	11.7
	1044.9	1118.7						
	1048.5	1088.4						
2000	1766.3	1942.1	1805.7	1991.1	3.4	3.4	9.7	0.4
	1773.7	1962.8						
	1877	2068.3						

*- правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла

** - правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами

Как видно из таблицы 1 полученные значения относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %) варьируются от 0.4% до 14.4%, что удовлетворяет критерию приемлемости методики. Отклонения не должны превышать 15% для всех калибровочных точек, кроме точки на нижнем пределе количественного определения, для которой отклонения не должны превышать 20%. Таким образом, предложенная аналитическая методика обладает достаточной прецизионностью и правильностью.

3.4 Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация Камфецина в плазме, для которой возможно количественное определение со значением RSD и ε не более 20%. Предел количественного определения методики составил 100 нг/мл.

3.5 Перенос

Перенос оценивался введением холостого образца после анализа образцов с концентрацией 2000 нг/мл. Критерий приемлемости: перенос сигнала от

определяемого вещества в холостой образец после стандарта с высокой концентрацией не должен превышать 20% от величины нижнего предела количественного определения. На хроматограмме холостого образца показано отсутствие пика Камфецина после анализа образца с концентрацией 2000 нг/мл, соответствующей 100% калибровочной кривой. Следовательно, перенос отсутствует.

3.6 Стабильность

Для изучения стабильности Камфецина анализировали по 3 пробы на двух уровнях концентраций. Показано, что изменение содержания аналита в образце в процессе хранения относительно свежеприготовленных образцов не превышает допустимый предел 15%.

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения Камфецина в плазме крови методом ГХ/МС. Данная методика обладает достаточной чувствительностью, правильностью и селективностью для определения субстанции в плазме крови. Методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, стабильность, перенос.

Выводы

1. Разработаны способы синтеза биологически активных иминов на основе (+)-камфоры. Определено соединение-лидер – 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанол, проявивший максимальную вирус-ингибирующую активность. Сочетание высокой противовирусной активности *in vitro* и *in vivo* с низкой токсичностью позволило приступить к доклиническим исследованиям данного соединения. В рамках детального изучения зависимости структура - противовирусная активность синтезированы аналоги данного соединения. Показано, что все три основных структурных блока в молекуле, а именно 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый остов, иминогруппа и алифатический радикал важны для проявления высокой противовирусной активности.

2. Выполнена одна из важнейших химических задач доклинических исследований - разработана и валидирована методика количественного определения 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в плазме крови. Показано, что данная методика обладает достаточной чувствительностью и селективностью для определения данной субстанции в плазме крови. Методика валидирована по

следующим показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность, стабильность и перенос.

3. Получена библиотека C-2 симметричных дииминов на основе (+)-камфоры. Подобраны оптимальные условия для стереоселективного восстановления синтезированных дииминов в *экзо-экзо*-диамины. Впервые осуществлен синтез большого ряда димерных четвертичных аммониевых производных (+)-камфоры с различной степенью экранирования атома азота и расстоянием между заряженными группами.

4. На основе 2-хлорборнилацетата и 3-хлорборнилпропионата осуществлен синтез новых азотсодержащих гетероциклических производных (-)-борнеола. Исследована реакция взаимодействия 2-хлорборнилацетата и 3-хлорборнилпропионата с 2-меркаптобензоимидазолом и его аналогами. Изучена возможность алкилирования амбидентных нуклеофилов, как по атому азота, так и по атому серы. Установлено, что присоединение непредельной системы, образующейся из 3-хлорборнилпропионата под действием основания, протекает исключительно по атому азота.

5. Взаимодействием α -труксильной кислоты с различными аминами и спиртами, впервые получен ряд димерных производных, включающих циклобутановое кольцо и 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый фрагмент.

6. Сотрудниками НИИ Гриппа г. Санкт-Петербурга осуществлено тестирование *in vitro* синтезированных производных камфоры и борнеола и выявлены соединения с выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А. Изучение зависимости «структура-активность» соединений, отличающихся длиной, объёмом, электронными эффектами линкеров и заместителей, позволило выявить некоторые закономерности в специфической активности и токсичности данных соединений. В лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН в результате экспериментов *in vivo* выявлены дикватернизированные производные камфоры, обладающие миорелаксантной активностью; среди производных α -труксильной кислоты, содержащих бициклический фрагмент, обнаружены агенты с анальгетической активностью.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих сообщениях:

1. Sokolova, A. S., Yarovaya, O. I., Shernyukov, A. V., Pokrovsky, M. A., Pokrovsky, A. G., Lavrinenko, V. A., Zarubaev, V. V., Tretiak, T. S., Kiselev, O. I., Beklemishev, A.B., Salakhutdinov N. F. New quaternary ammonium camphor derivatives and their antiviral

activity, genotoxic effects and cytotoxicity // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – V. 21. – P. 6690-6698.

2. Sokolova, A. S., Yarovaya, O. I., Korchagina, D.V., Zarubaev, V. V., Tretiak, T. S., Anfimov, P.V., Kiselev, O. I., Salakhutdinov N. F. Camphor-based symmetric diimines as inhibitors of influenza virus reproduction // *Bioorg. Med. Chem.* – 2014. – V. 22. - № 7. – P. 2141 – 2148.

3. Sokolova, A.S., Yarovaya, O.I., Shernyukov, A.V., Gatilov, Yu.V., Razumova, Yu.V., Zarubaev, V.V., Tretiak, T.S., Pokrovsky, A.G., Kiselev, O.I., Salakhutdinov, N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – V. 105. – P. 263-273.

4. Соколова, А.С., Морозова, Е.А., Васильев, В.Г., Яровая, О.И., Толстикова, Т.Г., Салахутдинов, Н.Ф. Курареподобные производные камфоры и их биологическая активность // *Биоорганическая химия.* – 2015. – Т. 41. – № 2. – С. 203-211.

5. Zarubaev, V.V., Garshinina, A.V., Tretiak, T.S., Fedorova, V.A., Shtro, A.A., Sokolova, A.S., Yarovaya, O.I., Salakhutdinov, N.F. Broad range of inhibiting action of novel camphor-based compound with antihemagglutinin activity against influenza viruses in vitro // *Antiviral Research.* – 2015. – V. 120. – P. 126-133.

6. Патент РФ № 2520967. Симметричные диимины на основе камфоры - ингибиторы репродукции вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09) / Соколова А.С., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф., Третьяк Т.С., Киселев О.И., Зарубаев В.В. // опубликовано: 27.06.2014. Бюл. № 18.

7. Патент РФ № RU 2530554. Применение 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в качестве ингибитора репродукции вируса гриппа. / Яровая О.И., Соколова А.С., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Салахутдинов Н.Ф. // опубликовано: 10.10.2014 Бюл. № 28

8. Патент РФ № 2554934. Иминопроизводные камфоры – эффективные ингибиторы репродукции вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09) / Соколова А.С., Яровая О.И., Шернюков А.В., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Салахутдинов Н.Ф. // опубликовано 10.07.2015 Бюл. № 19.

Основные результаты диссертации доложены на отечественных и международных конференциях:

1. Sokolova A., Yarovaya O., Salakhutdinov N. Potential Curare-Like Compounds from Bis(camphoriliden)alkyldiamine. Book of Abstracts-c.195. «Current Topics in Organic Chemistry», Novosibirsk, Russia, June 6-10, 2011.

2. Соколова А.С. Синтез новых дикватернизованных соединений камфоры. Тезисы докладов Шестой Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием Менделеев 2012. Санкт-Петербург. – 3-6 апреля 2012 г. – С. 109.

3. Соколова А.С. Синтез новых бис-азотсодержащих производных камфоры. Тезисы докладов 50-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» МНСК-2012. Новосибирск. – 13-19 апреля 2012 г. – С. 55.

4. Соколова А.С. Синтез новых симметричных азотсодержащих производных камфоры. Тезисы докладов Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013». Москва. – 8-12 апреля 2013 г.

5. Соколова А.С., Яровая О.И., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Салахутдинов Н.Ф. Синтез аналогов 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиденаминоэтанола –

эффективного ингибитора вируса гриппа. Тезисы докладов Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической химии. Крым, пгт Новый свет – 25-28 мая 2014 г. – С. 142.

6. Yarovaya O.I., Sokolova A.S., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Camphor – as a new scaffold for antiviral agents. Book of Abstracts: 3rd International Conference on Pharmaceutical Sciences. Tbilisi, Georgia. – 29-31 May 2015. – P. 37.

7. Sokolova A., Semenova M., Yarovaya O., Salakhutdinov N. Synthesis of Heterocyclic Derivatives of Borneol as Potential Antiviral Agents. Book of abstracts of the 2-nd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem-2015. Novosibirsk, Russia. – 5-10 July 2015. – P.118

8. Соколова А.С., Яровая О.И., Зарубаев В.В., Салахутдинов Н.Ф. Синтез ингибиторов вируса гриппа на основе борнеола. Тезисы докладов Междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии-2015. Крым, пгт Новый свет – 27-30 сентября 2015 г. – С. 91.

9. Chukanov N., Dobrynin S., Dyan O.T., Zaikin P., Kilmetyev A., Morozov D., Mostovich E., Selivanova G., Sokol I., Sokolova A., Trofimova D., Usoltsev A., Vorob'ev A. Microwave-assisted organic synthesis with Anton Paar Monowave 300: NIOC SB RAS experience. Book of Abstracts: Youth Conference "Current Topics in Organic Chemistry", Sheregesh. – 21-27 March, 2015 – P. 42

10. Sokolova A., Yarovaya O., Salakhutdinov N. Biological Activity of New Camphor Derivatives. Book of Abstracts of the Siberian Youth Conference "Current Topics in Organic Chemistry", Sheregesh, Russia – 21-27 March, 2015 – P. 96