

На правах рукописи



Филимонов Александр Сергеевич

**ДИЗАЙН И СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ
В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИЛ-ДНК-
ФОСФОДИЭСТЕРАЗ 1 И 2, ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК
ЧЕЛОВЕКА**

1.4.3. Органическая химия

1.4.16 Медицинская химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Новосибирск – 2024

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:

Лузина Ольга Анатольевна

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории физиологически активных веществ, НИОХ СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Катаев Владимир Евгеньевич

доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук, г. Казань

Платонова Яна Борисовна

кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории катализа и газовой электрохимии, Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, г. Уфа

Защита состоится «06» декабря 2024 г. в 11:30 на заседании диссертационного совета 24.1.192.02, созданного на базе НИОХ СО РАН по адресу: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИОХ 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: <https://vak.minobrnauki.gov.ru/main>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах, заверенные печатью, просим отправлять по адресу: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9, Новосибирский институт органической химии, ученому секретарю диссертационного совета 24.1.192.02; e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Лузина Ольга
Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК относится к важным направлениям современной фармакологии и является одним из путей увеличения эффективности терапии онкологических заболеваний, особенно для борьбы с лекарственно-устойчивыми опухолями. Перспективными мишенями для лечения онкологических заболеваний являются тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 и 2 (TDP1 и TDP2), которые играют ключевую роль в удалении повреждений ДНК, образующихся при ингибировании топоизомераз 1 и 2, соответственно, клинически важными противоопухолевыми препаратами (иринотекан, топотекан, этопозид, доксорубин), а также задействованы в удалении повреждений ДНК, вызванных другими противоопухолевыми препаратами.

Спектр описанных в литературе ингибиторов TDP1 широк, включает синтетические, природные и полусинтетические соединения, но эффективность большинства из них невысока. Хотя зачастую изученные соединения подавляют активность TDP1 в низких микромолярных или субмикромолярных концентрациях, некоторые классы соединений были исключены из дальнейших исследований и разработок из-за отсутствия синергического или сенсibiliзирующего эффекта или из-за высокой цитотоксичности. Только несколько соединений были протестированы на животных моделях, и для еще меньшего количества веществ доказано, что они сенсibiliзируют опухоли у мышей к противораковому препарату - топотекану. Поэтому поиск новых ингибиторов TDP1 остается актуальной исследовательской целью.

Наиболее эффективные ингибиторы TDP1 ($IK_{50} = 0,026-1$ мкМ) были обнаружены среди производных вторичного метаболита лишайников усниновой кислоты **1** – соединения **2a** и **3** (рис. 1), сенсibiliзирующее действие которых в сочетании с ингибитором топоизомеразы 1, топотеканом подтверждено в экспериментах на культурах клеток. Важно, что для производных **2a** и **3** впервые в мировой практике была продемонстрирована способность значительно усиливать противоопухолевый и антимастиатический эффект топотекана *in vivo*. Опубликованные данные безусловно свидетельствуют о высоком потенциале усниновой кислоты как платформы для создания высокоэффективных ингибиторов TDP1, однако, не в достаточной степени раскрывают влияние структуры отдельных частей молекул ингибиторов как на ингибирующую, так и на собственную цитотоксическую активность производных.

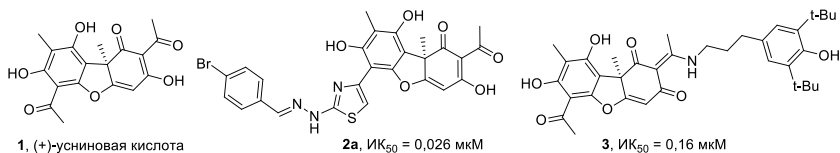


Рисунок 1.

Крайне немногочисленные известные ингибиторы TDP2 обладают или весьма умеренной активностью, или неудовлетворительными фармакокинетическими характеристиками, что делает необходимым поиск ингибиторов новых структурных типов. Кроме того, недавно обнаруженная способность TDP1 и TDP2 брать на себя функции друг друга делает высокоперспективным совместное применение селективных ингибиторов этих двух ферментов или создание агентов, способных одновременно ингибировать TDP1 и TDP2. На данный момент в литературе отсутствуют данные об ингибиторах TDP2 на основе усниновой кислоты.

Цель исследования: Синтез новых производных усниновой кислоты в качестве потенциальных ингибиторов ферментов репарации ДНК человека TDP1 и TDP2 и изучение влияния структурных модификаций на ингибирующую активность и цитотоксичность получаемых производных

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) С учётом литературных данных о реакционной способности усниновой кислоты и её производных, а также на основе анализа тематической литературы по ингибиторам TDP1 и TDP2 разработать дизайн новых производных усниновой кислоты - аналогов известных ингибиторов TDP1 и потенциальных ингибиторов TDP1 и/или TDP2.

2) Разработать подходы к синтезу новых производных усниновой кислоты и осуществить их синтез.

3) Осуществить анализ данных по ингибирующей активности в отношении TDP1 и TDP2, а также цитотоксичности новых производных усниновой кислоты.

Научная новизна: Синтезирован широкий ряд новых замещенных гидразонотиазолов на основе (+)- и (-)-усниновых кислот. Впервые синтезирован ряд тиазолов на основе усниновой кислоты, содержащих амидный или карбамидный заместитель в тиазольном кольце. Исходя из монотерпеновых аминов на основе усниновой кислоты синтезирован ряд новых енаминов по положению C11. Разработан новый подход к синтезу производных усниновой кислоты, содержащих енаминовую группу при C1 атоме углерода. Предложен подход к синтезу, а также синтезированы первые представители нового класса производных усниновой кислоты, модифицированные как по кольцу А (гидразонотиазольный заместитель), так и по кольцу С (енаминовая группа или

аннелированный пиразольный цикл). В качестве потенциальных ингибиторов TDP2 синтезирован ряд новых сульфидов, сульфоксидов, а также сульфонов на основе усниновой кислоты, содержащих гетероциклический заместитель при атоме серы.

Среди синтезированных соединений выявлены высокоэффективные низкотоксичные ингибиторы TDP1. Показано, что в ряду гидразоно- и амидотиазолов ингибирующая активность по отношению к TDP1 зависит от структуры заместителя в тиазольном цикле, а в ряду терпеноаминов несущественно зависит от структуры терпенового заместителя. Выявлены дуальные ингибиторы TDP1 и TDP2 в ряду производных усниновой кислоты класса сульфидов, гидразонотиазолов и производных, сочетающих гидразонотиазольный фрагмент с конденсированным с кольцом С пиразольным циклом. Выявлены структурные модификации усниновой кислоты, ведущие к повышению ингибирующей активности по отношению к тирозил-ДНК-фосфоэстеразам 1 и 2 и снижению собственной цитотоксичности соединений.

Теоретическая и практическая значимость: Разработаны синтетические подходы к синтезу ранее не известных классов производных усниновой кислоты, с использованием которых могут быть получены библиотеки новых биологически активных соединений. Выявлены закономерности взаимосвязи структуры производных усниновой кислоты с их ингибирующей активностью в отношении тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2, а также цитотоксичностью соединений, что позволит прогнозировать и направленно менять эти свойства в будущих производных усниновой кислоты. Обнаружены высокоэффективные низкотоксичные ингибиторы TDP1, проявляющие активность в концентрациях вплоть до 10 нМ, усиливающие цитотоксический эффект топотекана в 2-6 раз. Для (R,E)-8-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-1-(4-бромфенил)-5,7-дигидрокси-3,4а,6-триметил-1,4а-дигидро-4Н-бензофуоро[3,2-f]индазол-4-она противоопухолевое и антиметастатическое действие при совместном применении с топотеканом было подтверждено в экспериментах *in vivo*. Впервые синтезированы производные усниновой кислоты, являющиеся эффективными дуальными ингибиторами TDP1 и TDP2. Предложены синтетические подходы, приводящие к снижению цитотоксичности производных усниновой кислоты.

Методология и методы исследования. В ходе данной работы проводился анализ и обобщение имеющихся и полученных данных по синтезу производных усниновой кислоты, структурам известных ингибиторов TDP1 и TDP2 и зависимости «структура-активность» для ингибиторов TDP1 и TDP2 на основе усниновой кислоты. В настоящей работе использовались существующие литературные методики синтеза целевых соединений, а также разработаны новые оригинальные методики с использованием классических методов органического

синтеза. Выделение и очистка продуктов осуществлялась методами экстракции, осаждения, колоночной хроматографии. Структуры полученных соединений подтверждали физико-химическими методами анализа: ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, элементный анализ, определение температуры плавления, рентгеноструктурный анализ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методы синтеза тиазолов на основе усниновой кислоты, содержащих амидный или карбамидный заместитель в тиазольном кольце.
2. Препаративно удобная методика синтеза гидразонотиазолов на основе усниновой кислоты.
3. Синтез енаминов усниновой кислоты с монотерпеновыми заместителями.
4. Метод синтеза производных усниновой кислоты, содержащих енаминную группу при C1 атоме углерода.
5. Синтез нового класса производных усниновой кислоты, модифицированных как по кольцу А (гидразонотиазольный заместитель), так и по кольцу С (с формированием енаминового или аннелированного пиразольного фрагментов).
6. Изучение зависимости «структура-ингибирующая TDP1/TDP2 активность/цитотоксичность» для полученных на основе усниновой кислоты производных.

Личный вклад соискателя заключался в поиске, анализе и обобщении литературных данных по теме диссертации. Автор принимал участие в разработке плана исследования, им или под его руководством осуществлены все химические эксперименты, выделение, очистка и подготовка соединений к физико-химическим методам анализа и биологическим испытаниям. Автор принимал участие в обработке и обсуждении полученных данных, а также осуществлял подготовку материалов к публикации в научных журналах, представлял доклады и отчеты по теме диссертации.

Степень достоверности обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением физико-химических методов исследования. Строение новых соединений доказано методами ^1H и ^{13}C ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения, элементного анализа, а также методами рентгеноструктурного анализа.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на следующих конференциях: «АПОХ-2018», МОБИ-ХимФарма2018; Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»; Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова; «МедХим-Россия 2019»; Первой всероссийской школе по медицинской химии для молодых ученых; 7th IESMC; «СТОС-2022»; «МедХим-Россия 2021»; «Синтетическая биология и

биофармацевтика – 2022»; VII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 50-летию академической науки на Урале «Техническая химия»; «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии» 2023; Всероссийской конференции «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней» 2023; «АПОХ-2024».

По теме работы опубликованы 8 статей в рецензируемых научных журналах, а также 17 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Структура диссертации. Работа изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 86 схем, 14 рисунков и 31 таблицу. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (139 литературных источников) и 9 приложений (стр. 146-158).

Благодарности. Автор выражает свою искреннюю благодарность научному руководителю д.х.н. Лузиной О.А., зав. Лаборатории физиологически активных веществ чл.-корр. РАН, проф. Салахутдинову Н.Ф., зав. Лаборатории направленных трансформаций природных соединений к.х.н. Суслову Е.В., а также сотрудникам Отдела медицинской химии НИОХ СО РАН. Отдельные слова благодарности автор хотел бы выразить д.х.н. Гатилову Ю.В. (НИОХ СО РАН), сотрудникам Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, под руководством д.х.н., акад. РАН, проф. Лаврик О. И., к.б.н. Поповой Н.А. и её сотрудникам (ИЦИГ), к.х.н. Хачатрян С. Х. (НИЦ Курчатовский институт), к.х.н. Можайцеву Е.С., а также сотрудникам Центра спектральных исследований НИОХ СО РАН

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту. «Литературный обзор» состоит из двух основных частей и включает рассмотрение препаративных методов модификации усниновой кислоты. «Обсуждение результатов» содержит результаты работы по синтезу аналогов известных ингибиторов TDP1, а также новых производных усниновой кислоты в качестве потенциальных ингибиторов TDP1 и TDP2, данные скрининга биологической активности полученных соединений и анализ взаимосвязи «структура – ингибирующая TDP1 и TDP2 активность и цитотоксичность». «Экспериментальная часть» содержит методики синтеза и физико-химические характеристики новых соединений.

1 Синтез ингибиторов TDP1 на основе усниновой кислоты

За основу дизайна ингибиторов TDP1 взяты соединения **2a** и **3** (рис. 1) как наиболее эффективные в качестве ингибиторов TDP1 соединения в ряду производных усниновой кислоты. Задачей данного этапа работы был синтез аналогов этих соединений, выявление зависимостей «структура-активность».

1.1 Синтез аналогов соединения **2a** с вариацией линкера между тиазолом на основе усниновой кислоты и арильным заместителем

Полученное ранее производное усниновой кислоты **2a**, содержащее в своем составе гидразонотиазольный фрагмент, проявляет высокую активность в отношении TDP1 с $IK_{50} = 0,026$ мкМ. Однако, производное **2a** обладает высокой цитотоксичностью. Литературные данные свидетельствуют, что в ряду фенилзамещённых тиазолов с гидразоновым, аминным линкерами и без линкера ингибирующая TDP1 активность снижается, что говорит о влиянии структуры линкера (возможно, длины и/или количества гетероатомов) на ингибирующую активность (рис. 2).

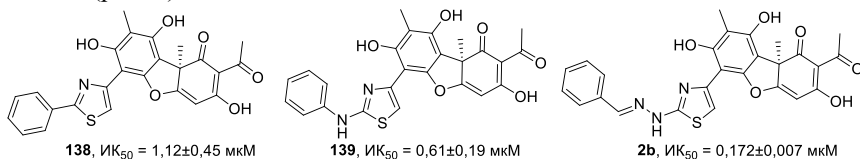


Рисунок 2

В качестве альтернативы гидразоновому линкеру может выступать амидный. и карбамидный – производные структуры **140** и **141** соответственно. Синтез целевых соединений был осуществлён исходя из (+)-14-бромусниновой кислоты (**+**)-**104** и соответствующих ацилтиомочевин или тиодимочевины.

Ацилтиомочевины **142a-e** были синтезированы исходя из соответствующих ароматических и гетероароматических кислот, выделение проводили путём высаживания водой и очищали при необходимости методом колоночной хроматографии. Выходы соединений **142a-e** варьировались от 25 до 45%.

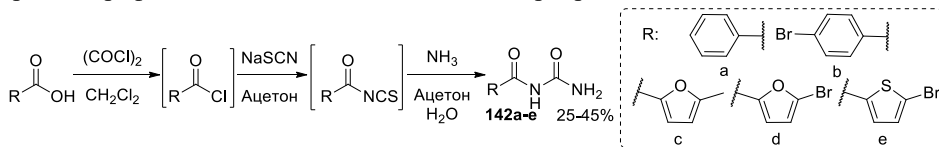


Схема 11

Синтез тиодимочевины **143** проводили по реакции фенилизотиоцианата с тиомочевинной в присутствии гидроксида натрия в смеси вода-ацетонитрил при комнатной температуре (схема 2). Продукт был получен с выходом 47% после колоночной хроматографии.

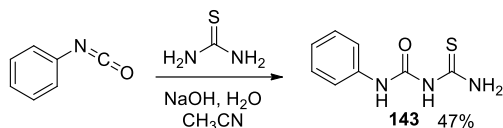


Схема 2

Реакцию (+)-бромусниновой кислотой **(+)-104** с соответствующими ацилмочевинами **142a-e** или тиодимочевьиной **143** проводили в метаноле при комнатной температуре (схема 3). Выход продуктов составил 82-95%.

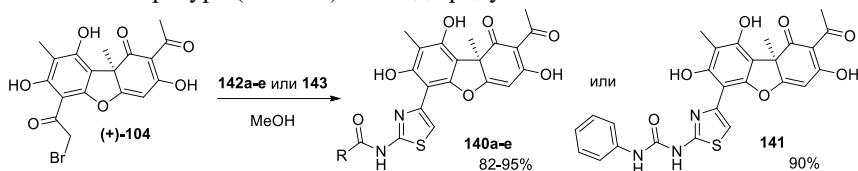


Схема 3

Все полученные на данном этапе тиазолы на основе усниновой кислоты как с амидным (соединения **140a-e**), так и с карбамидным (соединение **141**) заместителем обладают ингибирующей активностью в субмикромолярных и микромолярных концентрациях ($IK_{50} = 0,6-4,7$ мкМ; таблица 1). Анализ данных таблицы 1 позволяет отметить, что соединения, содержащие атом брома в заместителе (производные **140b,d,e**) имеют несколько большую активность в отношении TDP1, по сравнению с остальными соединениями.

Таблица 1

№	IK_{50} TDP1, мкМ	№	IK_{50} TDP1, мкМ
140a	$1,5 \pm 0,6$	140d	$0,9 \pm 0,4$
140b	$0,9 \pm 0,2$	140e	$0,6 \pm 0,4$
140c	$4,7 \pm 0,2$	141	$1,3 \pm 0,1$

В таблице 2 приведены данные об ингибирующей TDP1 активности тиазолов с амидным заместителем (соединения **140a,b**) в сравнении с аналогичными тиазолами, содержащими отличный по строению линкер. Анализ данных ингибирующей активности в ряду фенилзамещённых тиазолов **2b**, **140a**, **141** свидетельствует, что замена гидразонового линкера на амидный или карбамидный приводит к уменьшению ингибирующей активности на порядок. Такая же разница в активности наблюдается и в паре соединений **2a** и **140b**. При этом из данных таблицы 2 можно видеть, что снижение цитотоксичности соединения при переходе от гидразонового линкера (соединение **2a**) к амидному (соединение **140b**) незначительное, хотя эффект усиления действия топотекана сохраняется.

Таблица 2

№	ИК ₅₀ TDP1, мкМ	ЦК ₅₀ , MCF-7, мкМ	Усиление цитотоксического эффекта топотекана <i>in vitro</i> (MCF-7)
2b	0,172 ± 0,007	н/и	н/и
140a	1,5±0,6	н/и	н/и
141	1,3±0,1	н/и	н/и
2a	0,026 ± 0,011	1,69 ± 0,05	3
140b	0,9±0,2	5,8±1,1	4

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ряду синтезированных нами тиазолов на основе усниновой кислоты производные с гидразоновым линкером являются наиболее перспективным классом производных. Поэтому следующая часть работы была направлена на расширение библиотеки данного типа производных.

1.2 Синтез библиотеки производных усниновой кислоты, содержащих гидразонотиазольный фрагмент

С целью выявления зависимости ингибирующей TDP1 активности от структуры заместителя R в гидразоновом фрагменте производных общей структуры **2** библиотека соединений такого типа была расширена путем синтеза новых производных с варьированием заместителя в гидразоновом фрагменте молекулы. Методика синтеза описанных ранее гидразонотиазолов **2a,b** предполагает на первой стадии введение усниновой кислоты в реакцию бромирования, а также синтез широкого ряда тиосемикарбазонов альдегидов. Полученные тиосемикарбазоны взаимодействуют с 14-бромусниновой кислотой **104** с образованием целевых гидразонотиазолов.

Для синтеза новых гидразинотиазолов **148-150** было выбрано несколько классов альдегидов. Первый включает в себя гетероароматические альдегиды, содержащие один или два гетероатома – альдегиды на основе пиридина, тιοфена, фурана, пиррола, имидазола и индола. Такие соединения являются ближайшими аналогами ароматическим альдегидам, однако в их структуре могут присутствовать атомы, способные к созданию водородных связей с молекулой фермента. Например, снижение полуингибирующей TDP1 концентрации при замене арильного заместителя на гетарильный наблюдалось в ряду синтезированных нами амидотиазолов **140a-e** (таблица 1). Второй класс включает в себя ароматические альдегиды, содержащие протяженный заместитель, связанный с бензольным кольцом через метиленовую группу, что добавляет дополнительную степень вращательной свободы молекуле. Третий тип – монотерпеновые альдегиды. Монотерпеноиды слишком малы и слишком липофильны, чтобы ингибировать фермент самостоятельно, но они, согласно литературным данным, могут быть очень полезны для корректировки структуры

лиганда, чтобы он более плотно прилегал к активному центру фермента; это особенно верно для гибких ациклических лигандов, способных принимать любую желаемую конформацию. Для выявления зависимости «структура-активность» монотерпеновые альдегиды для синтеза выбирали как ациклические, так и моно- и бициклические. Для выявления влияния структуры используемого в качестве основы для синтеза дибензофуранового остова целевые гидразонотиазолы были синтезированы исходя как из (+)-усниновой кислоты, так и из её (-)-энантиомера.

Синтез тиосемикарбазонов **145-147** осуществляли путем реакции выбранных альдегидов с избытком тиосемикарбазида в этаноле при кипячении. В результате было получено 36 тиосемикарбазонов с выходами 60-97%.

Методика, использованная ранее для синтеза гидразинотиазолов **2a,b** на основе усниновой кислоты, была нами модифицирована путем замены этанола на метанол, что позволило выделять целевые соединения **145-147** путём осаждения образующегося продукта из реакционной смеси, и привело к увеличению их выхода и чистоты (схема 4). В случае синтеза тиазолов **148a-c** с пиридиновым циклом, продукты были получены осаждением бромоводородной кислотой с получением соответствующих гидробромидов, что было подтверждено элементным анализом.

Тиазолы с гетероароматическими и ароматическими заместителями **148a-q** и **149a-k** были получены на основе как (+)- так и (-)-усниновой кислоты. Согласно данным по ингибирующей активности производных **148a-q** и **149a-k** (таблица 3) влияние выбранного энантиомера усниновой кислоты не оказывает однозначного влияния на ингибирующую TDP1 активность получаемых производных. Поэтому тиазолы с терпеновым заместителем были синтезированы с использованием одного энантиомера – (+)-усниновой кислоты. Всего на данном этапе работы было получено 64 новых соединения.

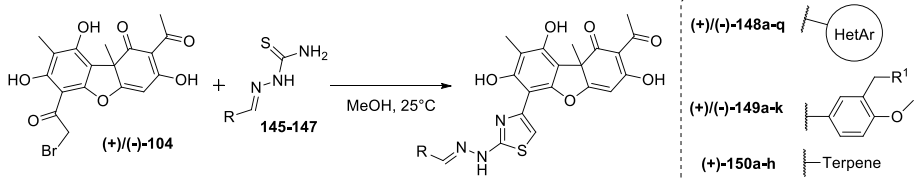


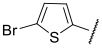
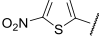
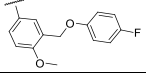
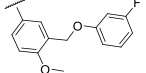
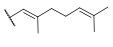
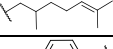
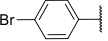
Схема 42

Гидразонотиазолы с гетероциклическим или протяженным ароматическим заместителем проявили ингибирующую TDP1 активность, преимущественно лежащую в диапазоне концентраций 10-180 нМ. Полуингибирующая концентрация наиболее активных соединений оказалась сопоставимой по сравнению с активностью производного **2a** (табл. 3). Наиболее высокую

ингибирующую активность (большую, чем гидразонотиазол **2a**) проявили соединения **150a,b**, полученные на основе цитраля и цитронеллала.

Для ряда наиболее перспективных соединений (производные **148f,g**, **149a,b** и **150a,b**) была измерена цитотоксичность, а также изучено синергическое действие на цитотоксический эффект топотекана. Выбранные тиазолы оказались слаботоксичными в отношении линии клеток рака шейки матки HeLa ($IC_{50} > 20$ мкМ). Данные производные усиливали цитотоксическое действие топотекана в отношении линии клеток HeLa в 2-7 раз.

Таблица 3

№	R	(+)–энантиомер		(–)-энантиомер	
		ИК ₅₀ , нМ	ЦК ₅₀ , мкМ HeLa	ИК ₅₀ , нМ	ЦК ₅₀ , мкМ HeLa
148f		88 ± 3	80	43 ± 1	80
148g		70 ± 4	20	142 ± 4	20
149a		26 ± 8	>100	54 ± 3	>100
149b		26 ± 4	>100	78 ± 3	>100
150a		10,3±0,4	40	н/д	н/д
150b		16,4±0,1	90	н/д	н/д
2a		26 ± 11	26	н/д	н/д

Таким образом, в результате скрининга биологической активности библиотеки синтезированных нами гидразонотиазолов удалось выявить соединения с ингибирующей активностью в отношении TDP1, превышающей активность соединения-прототипа **2a**, и низкой цитотоксичностью. Сохранение усиливающего действие топотекана эффекта при использовании этих соединений в тестах *in vitro* позволяет рассматривать их как перспективные для разработки агентов вспомогательной терапии ряда опухолевых заболеваний.

1.3 Синтез аналогов соединения 3 с вариацией структуры заместителя в енаминовом фрагменте

Основываясь на том факте, что введение терпенового фрагмента привело к повышению ингибирующей активности в ряду гидразонотиазолов **148-150**, мы использовали данный подход к дизайну ингибиторов TDP1 для синтеза аналогов второго соединения на основе усниновой кислоты, взятого в качестве прототипа - енамина **3** (рис. 1).

Единственным известным способом введения такого фрагмента в структуру усниновой кислоты является реакция с различными аминами в этиловом спирте, при этом реакция проходит региоселективно по C¹¹ карбонильной группе. Целевые енамины **151a-e** были получены путем реакции (+)-усниновой кислоты с рядом терпеновых аминов в этаноле при комнатной температуре (схема 5). Производные **151a-e** были выделены с выходами 33-75% после колоночной хроматографии.

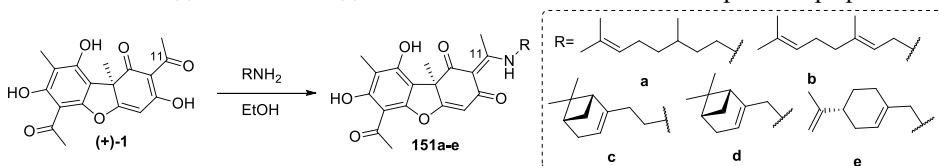


Схема 5

Для выявления зависимости ингибирующей TDP1 активности от структуры соединений, в частности от положения терпенового фрагмента по отношению к дибензофурановому ядру, нами были синтезированы енамины, терпеновый заместитель в которых отдалён от остова усниновой кислоты через линкер. В качестве линкера был выбран мостик на основе γ -аминоасляной кислоты (ГАМК). Для того, чтобы уменьшить количество стадий синтеза целевых соединений **154a-e**, был выбран следующий порядок проведения реакций: на первом этапе была проведена реакция (+)-усниновой кислоты с γ -аминоасляной кислотой в этаноле при нагревании, затем полученное производное **153** вводили в реакцию с рядом терпеновых спиртов в присутствии EDC (схема 6). Целевые енамины **154a-e** были выделены с выходами 45-69% после колоночной хроматографии.

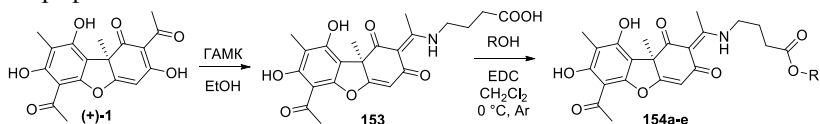


Схема 6

Производные **152a-e** проявили ингибирующую активность в отношении TDP1 в диапазоне концентраций полуингибирования 0,23-0,40 мкМ, что сопоставимо с активностью соединения **3** (ИК₅₀ = 0,16±0,04 мкМ). Интересно отметить, что полуингибирующая концентрация для аналогичных енаминов, содержащих линкер на основе ГАМК (соединения **154a-e**), оказалась на несколько порядков меньше. Полуцитотоксическая концентрация в отношении к линии клеток HeLa всех наиболее активных енаминов (соединения **154a-d**) оказалась больше 50 мкМ, что сравнимо с цитотоксичностью соединения **3** (>50 мкМ). Также данные производные показали усиливающий цитотоксическое действие топотекана в отношении линии клеток HeLa в 2-3 раза.

1.4 Изучение реакции усниновой кислоты с аммиаком

Как показывает анализ цитотоксической активности енаминов на основе усниновой кислоты, в том числе полученных в ходе данной работы, введение енаминового фрагмента приводит к соединениям с низкой цитотоксичностью. Это может быть связано с уменьшением протонифорной активности, которая в свою очередь зависит от кислотности гидроксильной группы OH^3 в структуре трикарбонильной системы кольца С усниновой кислоты. Так как в кольце С присутствует ещё две карбонильные группы, которые могли бы реагировать с N-нуклеофилами, мы исследовали возможность введения енаминового фрагмента в положение, отличное от C^{11} .

Согласно литературным данным, при взаимодействии усниновой кислоты с избытком водного аммиака (20%) в смеси бензол-этанол при кипячении с обратным холодильником происходит образование енамина **155** с выходом 82%. Строение соединения было подтверждено методом РСА. Нами была проведена аналогичная реакция с варьированием растворителей. Оказалось, что при проведении реакции в метаноле, этаноле, ДМСО, ДМФА, ацетонитриле и бензоле происходит образование ожидаемого продукта реакции – соединения **155**. Однако, при проведении реакции в воде образуется не только соединение **155**, но и новое производное. Согласно спектрам ЯМР ^1H и ^{13}C для нового соединения была предложена структура **156**, в которой енаминоный фрагмент находится при атоме C^1 (схема 7).

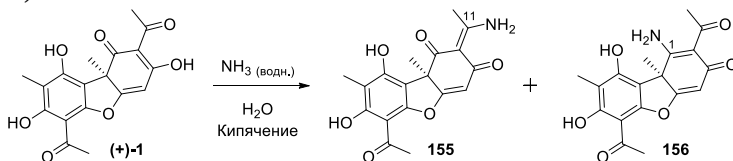


Схема 7

Было отмечено, что соотношение продуктов данной реакции зависит как от количества аммиака, так и от температуры проведения реакции. Так, относительное содержание енамина **156** в реакционной смеси повышается при повышении концентрации аммиака и при снижении температуры реакции. Однако, при проведении данной реакции в перечисленных выше органических растворителях при варьировании как количества аммиака, так и температуры реакции происходит образование исключительно производного **155**.

Подбор условий реакции показал, что взаимодействие (+)-усниновой кислоты со 125 экв. водного аммиака при охлаждении до $+9^\circ\text{C}$ приводит к образованию соединения **156** в качестве единственного основного продукта реакции с выходом 90%. Структура енамина **156** была подтверждена методом РСА. Енаминовая группа находится при C^1 атоме углерода.

Разработанные условия аминирования применили к тиазолу **2a**. Однако, при введении в реакцию аминирования гидразонотиазола **2a** реакция протекала исключительно по C¹¹ карбонильной группе (соединение **157**, схема 8) независимо от использованного растворителя, количества аммиака и температуры реакции.



Схема 8

Для выявления влияния заместителей в кольце А усниновой кислоты на данное превращение нами в реакцию с избытком водного аммиака при охлаждении вводилось более простое по структуре производное, модифицированное по кольцу А – фуранон **99**. Для фуранона **99** также, как и в случае усниновой кислоты, в данных условиях наблюдалось образование енаминовой группы при C¹ атоме углерода (соединение **158**, схема 9). При этом при проведении аналогичной реакции в спирте наблюдался ожидаемый продукт реакции аминирования C¹¹ карбонильной группы – енамин **159**. Продукты реакции были выделены с выходами, близкими к количественным.

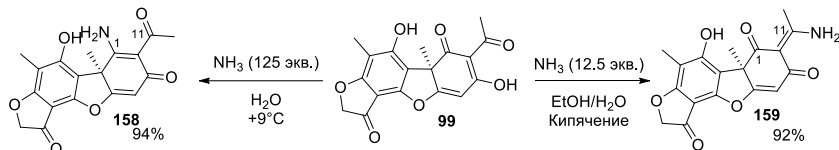


Схема 9

Аналогичные закономерности наблюдались и в случае реакции производного **100a**, в котором, в отличие от фуранона **99**, присутствует сопряженный заместитель. При проведении реакции в этаноле происходило аминирование C¹¹ карбонильной группы (соединение **160**, схема 10), в то время как при реакции в воде и при охлаждении наблюдалось образование производного **161**. Реакции протекали с количественными выходами.

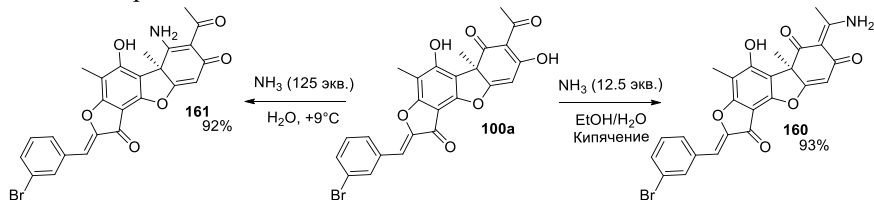


Схема 10

Таким образом, было показано, что направление реакции аминирования зависит от структуры вводимого в реакцию производного усниновой кислоты.

Изучение механизма региоселективного аминирования является вопросом для дальнейших исследований.

Для соединения **157** была изучена ингибирующая активность в отношении TDP1. Данные эксперимента показали, что полунингибирующая концентрация для производного **157** оказалась на порядок выше, чем для исходного гидразонотиазола **2a**. Поэтому следующим этапом работы стал синтез производных усниновой кислоты, сочетающих в себе как гидразонотиазольный заместитель, так и енаминовый фрагмент с объемным заместителем.

1.5 Разработка подходов к синтезу енаминов на основе производного усниновой кислоты с тиазольным циклом

Целевые соединения синтезировали исходя из производных с тиазольным циклом **2a** и **148f** (схема 11), опираясь на предположение, что обратный порядок сборки может быть более неудобным (в первую очередь из-за неоднозначности бромирования енаминов усниновой кислоты). В качестве аминной компоненты были выбраны те амины, модификация которыми усниновой кислоты по литературным данным приводила к усилению её ингибирующих в отношении TDP1 свойств и снижению токсичности - пара-броманилин и 1-амино-3-(3,5-ди-третбутил-4-гидроксифенил)пропан. Реакцию с аминами проводили в этаноле при кипячении, выделение проводилось методом колоночной хроматографии. Целевые енамины **162a-d** получены с высокими выходами (70-78%).

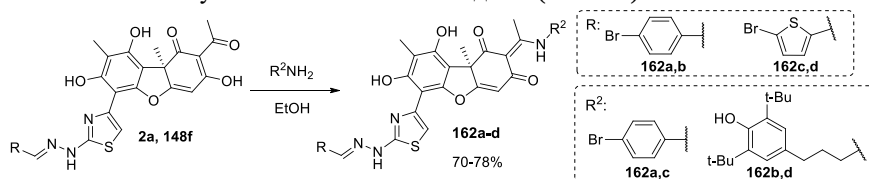


Схема 11

Полученные производные **162a-d** ингибируют TDP1 в концентрациях полунингибирования 0,12-5 мкМ (табл. 4). Из данных таблицы 4 можно заключить, что производные **162b,d**, содержащие ди-*трет*-бутилфенольный фрагмент, оказались более активными, чем производные с *п*-бромфенильным заместителем **162a,c**. Полученные соединения также показали низкий уровень цитотоксичности в отношении линий клеток HeLa, MCF-7 НЕК293А, MRC-5, НСТ-116, А-549 и Т98G – полуцитотоксическая концентрация > 30 мкМ. Наименее цитотоксичным соединением оказалось соединение **162b**, полуцитотоксическая концентрация которого превышала 100мкМ в отношении всех исследованных клеточных линий. Производное **162b** показало и наибольшее сенсibiliзирующее действие к цитотоксическому эффекту топотекана на линиях клеток HeLa, НСТ-116, А-549, MCF-7 – соединение усиливало эффект топотекана в 2-6 раз.

Таблица 4

№	ИК ₅₀ , мкМ	ЦК ₅₀ , мкМ	№	ИК ₅₀ , мкМ	ЦК ₅₀ , мкМ
162a	5±1	30-100	162c	1,0±0,4	47-100
162b	0,12±0,01	>100	162d	0,14±0,02	>100

Производное **162b** было выбрано для дальнейших исследований на животной модели. В качестве животной модели были выбраны мыши С57BL, которым была трансплантирована карцинома легкого Льюис. Результаты показали, что использование соединения **162b** в дозе 50 мг/кг в комбинации с топотеканом снижает вес опухоли до 57%, а также приводит к значительному снижению числа метастазов при его пероральном введении. При этом введение соединения **162b** в качестве моноагента не приводит ни к снижению веса опухоли, ни к снижению числа метастазов.

2 Синтез дуальных ингибиторов TDP1 и TDP2 на основе усниновой кислоты

Поскольку данных о синтезе ингибиторов TDP2 на основе усниновой кислоты в литературе нет, то дизайн соответствующих ингибиторов мы разрабатывали, основываясь на предположении, сделанном на основе литературных данных, о том, что повышению ингибирующей TDP2 активности способствует введение в структуру ингибитора насыщенных атомами азота гетероциклов.

Среди производных усниновой кислоты выявлены довольно эффективные ингибиторы TDP1, поэтому вполне реализуемым становится поиск дуальных ингибиторов TDP1 и TDP2, что актуально в свете тех данных, что TDP1 и TDP2 способны брать на себя функции друг друга.

2.1 Синтез сульфидов, сульфоксидов и сульфонов на основе усниновой кислоты

Бромусниновая кислота **104** является удобным исходным веществом для введения гетероциклических фрагментов, так как атом брома может быть замещен рядом S-нуклеофилов с получением соответствующих сульфидов **163**, которые далее могут быть окислены до соответствующих сульфоксидов **164** или сульфонов **165**. (схема 12).

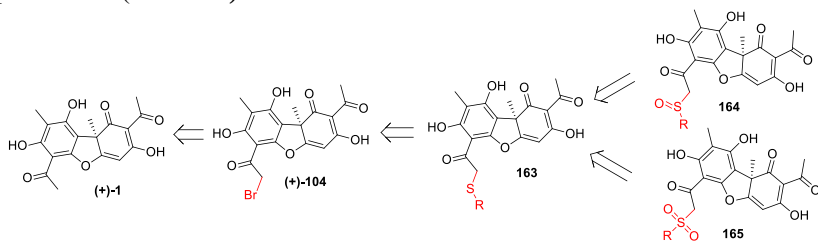


Схема 12

(+)-Бромусниновую кислоту (+)-**104** вводили в реакцию с выбранными тиолятами натрия в метаноле, продукты при необходимости очищали методом колоночной хроматографии. В результате было получено пятнадцать тиоэфиров на основе (+)-усниновой кислоты, десять из которых (соединения **163a,c,f,j,l,m,o**) ранее не были описаны.

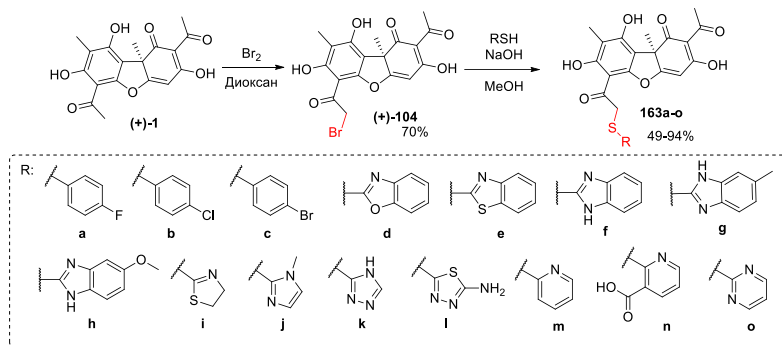


Схема 13

Синтез сульфоксидов **164** был осуществлен путем реакции соответствующих тиоэфиров **163** с водной перекисью водорода (30%) в присутствии ванадилацетилацетоната ($\text{VO}(\text{AcAc})_2$) в качестве катализатора (схема 83). Реакции проводили при комнатной температуре с использованием избытка (1.5 – 2 экв.) перекиси водорода в качестве окислителя. В результате проведения данной реакции происходило образование смеси диастереомерных сульфоксидов **164** в соотношении 1:1 (по данным спектров ^1H ЯМР). С использованием данных условий были получены диастереомерные смеси (1:1) сульфоксидов **164c** и **164l** с выходами 65% и 78% соответственно. Однако, для остальных тиолятов реакция протекала очень медленно, в большинстве случаев не достигая 50%-ной конверсии даже через неделю и даже при повышении температуры.

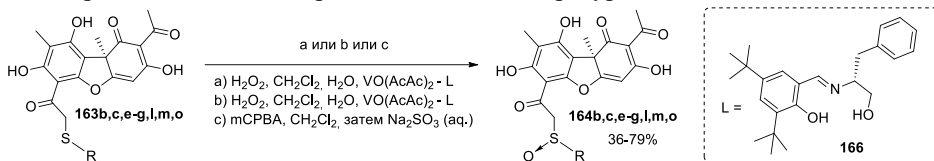


Схема 14

Для повышения конверсии было предложено добавить в реакционную среду хиральный лиганд **166**, который ранее использовался для хирального окисления тиоэфира **163b**. Использование лиганда не только существенно ускорило реакцию, которая протекала в данных условиях, за 3-4 часа, но и привело в ряде случаев к изменению соотношения содержания диастереомерных сульфоксидов. Таким способом были получены сульфоксиды **164b,e,m,o** с выходами 50-79%.

Соединения **164f,g** были получены путем окисления соответствующих сульфидов **163f,g** эквимольным количеством *m*-хлорнадбензойной кислоты с выходами 46% и 34% соответственно. Окисление производных **163a,d,h,k,n** как под действием перекиси водорода, так и *m*-хлорнадбензойной кислотой приводило к многокомпонентной и трудноразделимой смеси продуктов реакции.

Для окисления сульфидов **163** до соответствующих сульфонов **165** была проведена реакция с избытком *m*-хлорнадбензойной кислоты в хлористом метиле при перемешивании реакционной смеси на ледяной бане (схема 15). По завершении реакции добавлялся водный насыщенный раствор сульфита натрия для выведения из реакции избытка окислителя. Сульфоны **165a-c,e,h,j,m** были выделены с выходами 25-81% после колоночной хроматографии. В случае реакции окисления тиозэфиров **163f,g,l** происходило образование соответствующих сульфоксидов в виде смеси диастереомеров. Окисление сульфидов **163d,i,k,n** сопровождалось образованием трудноразделимой смеси продуктов реакции.

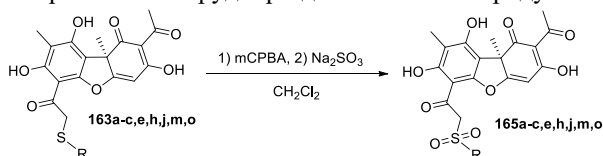


Схема 15

В результате был синтезирован широкий ряд сульфидов, сульфоксидов и сульфонов на основе (+)-усниновой кислоты. Синтезированные сульфиды **163** и сульфоксиды **164** преимущественно показали активность в отношении TDP1 в нижнем микромолярном диапазоне концентраций, за исключением сульфоксидов **164c,g,l**, для которых наблюдалось значительно более высокие значения ИК₅₀ по сравнению с теми же показателями сульфидов. Производные ряда сульфонов **165** преимущественно демонстрировали активность в отношении TDP1 более низкую, чем соответствующие тиозэфир **163** и сульфоксиды **164**. Исключение составило соединение **165m**, которое оказалось на порядок активнее соединений **163m** и **164m**.

Таким образом, предложенный подход позволил получить первые производные на основе усниновой кислоты, являющиеся эффективными ингибиторами TDP2 с концентрациями полунгибирования в диапазоне 138-380 мкМ. Однако, явной зависимости ингибирующей Tdp2 активности производных от степени окисления атома серы не было обнаружено.

2.2 Синтез пиразолов на основе производных усниновой кислоты, содержащих гидразонтиазольный фрагмент

Ещё одним препаративным способом введения дополнительных гетероциклических фрагментов в структуру усниновой кислоты является

формирование конденсированного с кольцом С дибензофурана пиразольного цикла. Также известно, что такая модификация однозначно приводит к снижению собственной цитотоксичности соединений. Для синтеза потенциальных ингибиторов TDP2 введение пиразольного цикла осуществляли исходя из гидразонотиазолов **2a** и **148f** (схема 16), которые уже содержат в своем составе гетероциклический фрагмент, а также являются перспективным классом ингибиторов TDP1.

Для синтеза целевых соединений гидразонотиазолы **2a** и **148f** вводили в реакцию с выбранными гидрохлоридами ароматических гидразинов в этаноле при комнатной температуре в присутствии пиридина (схема 16). Производные **168a,b** и **169a,b** были выделены с выходами 35-45% после колоночной хроматографии.

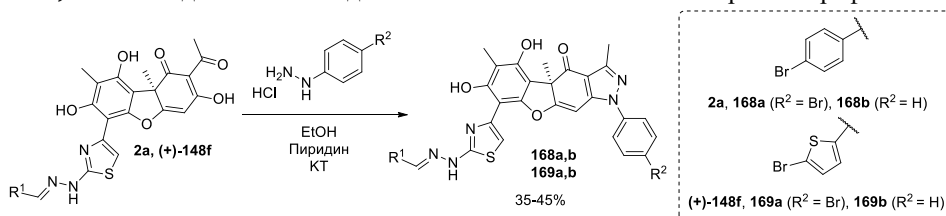


Схема 16

Все синтезированные с использованием данного подхода соединения **168a,b** и **169a,b** ингибировали TDP1 в субмикромольном диапазоне концентраций (табл. 5). Полученные соединения также проявили активность в отношении TDP2, подавляя активность фермента на 80 – 20 % в концентрации 500 мкМ. При этом более активными оказались соединения **168a** и **169a**, содержащие 4-бромфенильный заместитель в пиразольном цикле.

Таблица 5

№	ИК ₅₀ , TDP1, мкМ	Остаточная активность TDP2, % (500 мкМ ингибитора)
168a	0,34±0,01	80±20
168b	0,5±0,3	20±10
169a	0,34±0,1	80±30
169b	0,3±0,2	20±10

2.3 Ингибирующая активность гидразонотиазолов на основе усниновой кислоты в отношении TDP2

Для ряда полученных в данной работе гидразонотиазолов серий **148** и **149**, преимущественно содержащих гетероциклические мотивы, была изучена ингибирующая активность в отношении TDP2. В результате было выявлено несколько соединений, которые проявили ингибирующую TDP2 активность

(таблица 8). Среди наиболее эффективных ингибиторов TDP2 производные **148m,p** и **149i** с пиррольным, индольным и 3-(4-фторфенил)пиперазин-(4-метоксибензильным заместителями. Для этой выборки соединений обнаружилась явная зависимость ингибирующей TDP2 активности от строения стереоцентра (C^{9b}) усниновой кислоты. Заметную активность (ИК₅₀ = 6-9 мкМ) проявили производные именно (-)-энантиомера усниновой кислоты.

Таблица 6

№	Структура	R ¹	(+) -энантиомер		(-) -энантиомер	
			Tdp1 ИК ₅₀ , мкМ	Tdp2 ИК ₅₀ , мкМ	Tdp1 ИК ₅₀ , мкМ	Tdp2 ИК ₅₀ , мкМ
148m			0,188±0,003	>50	0,018±0,001	8±4
148p			0,026±0,006	>50	0,057±0,001	6±3
149i			0,080±0,007	>50	0,059±0,005	9±1

Заключение

1. Синтезирован ряд тиазолов на основе усниновой кислоты, содержащих амидный или карбамидный заместитель в тиазольном кольце. Показано, что такого типа соединения являются менее эффективными ингибиторами по сравнению с аналогами с гидразоновым заместителем. Расширен ряд гидразонотиазолов на основе усниновой кислоты. Обнаружены эффективные ингибиторы TDP1, действующие в наномолярном диапазоне концентраций полунгибирования и обладающие низкой цитотоксичностью.

2. Исходя из монотерпеновых аминов был синтезирован ряд новых енаминов на основе усниновой кислоты. Показано, что полученные соединения проявляют ингибирующую TDP1 активность в субмикромольном диапазоне концентраций, что сопоставимо с активностью известного соединения лидера в данном классе веществ. Показано, что ингибирующая активность данного типа производных несущественно зависит от структуры терпенового заместителя.

3. Впервые разработан подход к синтезу производных усниновой кислоты, содержащих енаминную группу при C1 атоме углерода. Показано, что региоселективность аминирования зависит как от условий проведения реакции, таких как температура, количество аммиака и используемый растворитель, так и строения периферии молекулы производного усниновой кислоты.

4. Предложен дизайн и осуществлён синтез нового класса производных усниновой кислоты, модифицированных как по кольцу А (гидразонотиазольный заместитель), так и по кольцу С (с формированием енаминового или аннелированного пиразольного фрагментов). Показано, что введение объемного заместителя в кольцо С гидразонотиазолов на основе усниновой кислоты способствует снижению ингибирующего действия в отношении TDP1, а также значительному снижению цитотоксичности получаемых соединений.

5. Предложен дизайн и осуществлён синтез дуальных ингибиторов TDP1 и TDP2 на основе усниновой кислоты. Обнаружены соединения, проявляющие, наряду с высокой активностью против TDP1, активность в отношении TDP2 в низком микромолярном диапазоне концентраций полунгибирования. Выявлено, что активность в отношении TDP2 зависит как от структуры заместителей, так и от конфигурации стереоцентра дибензофуранового остова усниновой кислоты.

Основное содержание диссертации изложено в публикациях

Статьи в журналах перечня ВАК

1. **A.S. Filimonov**, A.A. Chepanova, O.A. Luzina, A.L. Zakharenko, O.D. Zakharova, E.S. Ilina, N.S. Dyrkheeva, M.S. Kuprushkin, A.V. Kolotayev, D.S. Khachatryan, J. Patel, I.K. H. Leung, R. Chand, D.M. Ayine-Tora, J. Reynisson, K.P. Volcho, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik New Hydrazinotiazole Derivatives of Usnic Acid as Potent TDP1 Inhibitors // *Molecules*. – 2019. – V. 24(20). – P. 3711.
2. O. Luzina, **A. Filimonov**, A. Zakharenko, A. Chepanova, O. Zakharova, E. Ilina, N. Dyrkheeva, G. Likhatskaya, N. Salakhutdinov, O. Lavrik Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors // *J. Nat. Prod.* – 2020. – V. 83(8). – P. 2320-2329.
3. N.S. Dyrkheeva, **A.S. Filimonov**, O.A. Luzina, K.A. Orlova, I.A. Chernyshova, T.E. Kornienko, A.A. Malakhova, S.P. Medvedev, A.L. Zakharenko, E.S. Ilina, R.O. Anarbaev, K.N. Naumenko, K.V. Klabenkova, E.A. Burakova, D.A. Stetsenko, S.M. Zakian, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik New Hybrid Compounds Combining Fragments of Usnic Acid and Thioether Are Inhibitors of Human Enzymes TDP1, TDP2 and PARP1 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22(21). – P. 11336.
4. N.S. Dyrkheeva, **A.S. Filimonov**, O.A. Luzina, A.L. Zakharenko, E.S. Ilina, A.A. Malakhova, S.P. Medvedev, J. Reynisson, K.P. Volcho, S.M. Zakian, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik New Hybrid Compounds Combining Fragments of Usnic Acid and Monoterpenoids for Effective Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibition // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11(7). – P. 973.
5. **A.C. Филимонов**, А.А. Чепанова, М.А. Михайлова, О.А. Лузина, А.Л. Захаренко, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик Синтез новых производных усниновой кислоты и изучение их ингибирующей активности в отношении тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2 // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2023. – No. 6. – С. 718-727.
6. A.L. Zakharenko, N.S. Dyrkheeva, O.A. Luzina, **A.S. Filimonov**, E.S. Mozhaitsev, A.A. Malakhova, S.P. Medvedev, S.M. Zakian, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik Usnic Acid Derivatives Inhibit DNA Repair Enzymes Tyrosyl-DNA Phosphodiesterases 1 and 2 and Act as Potential Anticancer Agents // *Genes*. – 2023. – V. 14(10). – P. 1931.
7. **A. Filimonov**, O. Luzina, Yu. Gatilov, N. Salakhutdinov Regioselectivity Amination of Usnic Acid by Ammonia in Water // *Molbank*. – 2023. – V. 2023(2). – P. M1618.
8. T.E. Kornienko, A.A. Chepanova, A.L. Zakharenko, **A.S. Filimonov**, O.A. Luzina, N.S. Dyrkheeva, V.P. Nikolin, N.A. Popova, N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik Enhancement of the Antitumor and Antimetastatic Effect of Topotecan and Normalization of Blood Counts in Mice with Lewis Carcinoma by TDP1 Inhibitors - New Usnic Acid Derivatives // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – V. 25(2). – P. 1210.