

Утверждаю

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Новосибирский институт
органической химии
им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения
Российской академии наук
д.ф.-м.н., профессор



Е.Г. Багрянская

«16» июня 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НIOX CO PAH).

Диссертация Хорошуновой Юлии Владиславовны «Синтез и реакции нитроксильных радикалов пирролидинового ряда со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами в ближайшем окружении радикального центра» выполнена в Лаборатории азотистых соединений НIOX CO PAH.

В период подготовки диссертации соискатель Хорошунова Ю.В. работала в НIOX CO PAH в Лаборатории азотистых соединений в должности лаборанта с февраля 2017 г. по сентябрь 2019 г., затем в должности младшего научного сотрудника с сентября 2019 г. по настоящее время.

В июне 2019 года Хорошунова Ю.В. окончила Новосибирский Государственный Университет, Факультет Естественных Наук по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» (кафедра органической химии), с сентября 2019 г. по настоящее время обучается в аспирантуре НГУ (приказ о зачислении 1546-2 от 03.08.2019 г.).

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. Новосибирским Государственным Университетом (НГУ).

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого Совета НIOX CO PAH (протокол № 15 от 24 ноября 2020 г.).

Научный руководитель – к.х.н., доцент Кирилук Игорь Анатольевич, занимает должность заведующего Лабораторией азотистых соединений НИОХ СО РАН.

Отзыв рецензента к.х.н., старшего научного сотрудника Лаборатории многоспиновых координационных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН) Толстикова Святослава Евгеньевича на диссертационную работу – положительный.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Хорошуновой Ю.В. посвящена разработке подходов к получению нитроксильных спиновых меток, сочетающих высокую устойчивость к восстановлению с высокими временами спиновой релаксации и пригодных для проведения измерений в живых системах. Разработаны способы синтеза пирролидиновых нитроксильных радикалов, содержащих один или два спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановых фрагмента в α -положениях к нитроксильной группе. Исследованы реакции полученных радикалов (или их диамагнитных предшественников) по гидроксигруппе: активация ОН-группы к нуклеофильному замещению, окисление гидроксиметильного фрагмента в карбоксильную группу, ацилирование и алкилирование ОН-группы. Показано, что функционализация нитроксильных радикалов со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами возможна через ацилирование и алкилирование ОН-групп. С помощью этих превращений получены спиновые метки, способные присоединяться к биомолекулам через ацилирование или азид-алкиновое циклоприсоединение, и сочетающие высокую устойчивость к восстановлению с повышенными временами спиновой релаксации.

Актуальность темы

Одним из основных подходов к исследованию пространственной структуры белков, нуклеиновых кислот, их комплексов, а также к изучению их динамики является метод спиновых меток в сочетании со спектроскопией ЭПР. Самым распространённым типом спиновых меток являются метки на основе нитроксильных радикалов. К настоящему моменту наибольшей популярностью в структурной биологии пользуется импульсная технология ЭПР PELDOR (DEER, ПЭЛДОР, импульсный двойной электрон-электронный резонанс), применяемая для измерения расстояний между фрагментами биомолекул путём селективного введения нескольких (двух и более) спиновых меток и последующего попарного исследования их спин-спинового взаимодействия. Помимо определения пространственного строения, получаемая информация позволяет изучать фолдинг белков и конформационные перестройки биомолекул, происходящие при их взаимодействии с

другими молекулами или клеточными структурами, что открывает уникальные перспективы для исследования процессов, протекающих непосредственно в живых клетках. Однако проведение исследований *in cell* накладывает на спиновые метки жёсткие требования: используемые в качестве спиновых меток нитроксильные радикалы должны обладать высокой устойчивостью к восстановлению и высокими временами спиновой релаксации. При переходе от рутинно использующихся тетраметильных нитроксильных радикалов к тетраэтильным удаётся достигнуть резкого роста устойчивости, однако времена релаксации таких радикалов остаются невысокими. Переход к спироциклическим нитроксидам приводит к росту времён спиновой релаксации, но по устойчивости такие радикалы существенно уступают тетраэтильным аналогам. Поэтому поиск структур, которые могли бы одновременно сочетать в себе устойчивость к восстановлению с высокими временами спиновой релаксации, представляется достойной и крайне актуальной задачей.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Найден удобный, эффективный и легко масштабируемый способ синтеза 1,8-бис[гидроксиметил]-6-азадиспиро[4.1.4.2]тридекан-6-оксила, стартовыми соединениями для которого служат коммерчески доступные 4-хлорбутирилхлорид и 5-бромпентен-1.

Впервые изучены трансформации нитроксильных радикалов со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановым фрагментом и их предшественников – аминов, алкоксиаминов, ацилоксиаминов – в условиях активации ОН-группы к реакциям нуклеофильного замещения (через реакцию Аппеля и мезилирование). Показано, что во всех случаях вместо продуктов замещения ОН-группы происходит внутримолекулярное алкилирование, которое может сопровождаться перегруппировкой. Так в случае *N*-незамещённых производных происходит внутримолекулярное алкилирование по атому азота с образованием четырёхчленного цикла; в случае *N*-алкокси- и *N*-ацилоксипроизводных – за внутримолекулярным алкилированием по атому азота следует перегруппировка с образованием изомерных октагидроциклопента[с]азепинов; в случае *N*-оксила – восстановление радикала с последующим алкилированием по атому кислорода. Предложены возможные механизмы образования в данном процессе производных азепана и 3,3-диметилгексагидро-1*H*,6*H*-циклопента[с]пирроло[1,2-*b*]изоксазола. На примере последовательности превращений «внутримолекулярное алкилирование в 2,2-диметил-6-гидроксиметил-1-азаспиро[4.4]нонane по атому азота – *N*-метилирование – Гофмановское расщепление четвертичной аммониевой соли» продемонстрирован *новый* способ получения производных азепана.

Впервые изучено окисление нитроксильных радикалов и их предшественников (аминов, алкоксиаминов) со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами по CH_2OH -фрагменту, и получены соответствующие производные, содержащие сложноэфирную, карбоксильную, амидную группы. Обнаружено, что нитроксильные радикалы, содержащие спиро-(2-метоксикарбонил)циклопентановые фрагменты в α -положении к группе $\text{N-O}\cdot$ склонны к изменению конфигурации метиновых асимметрических центров.

Показано, что функционализация нитроксильных радикалов со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами возможна через ацилирование и алкилирование OH -групп. С использованием этих реакций *впервые* получены спиновые метки, сочетающие высокую устойчивость к восстановлению с высокими временами спиновой релаксации.

Обнаружено *новое* превращение, которое сопровождает окисление вторичных аминов, содержащих спиро-(2-ацетилоксиметил)циклопентановые фрагменты в α -положении к группе $\text{N-O}\cdot$, в соответствующие нитроксильные радикалы под действием МСРВА и приводит к продукту формального дегидрирования спироциклопентанового кольца; предложен возможный механизм данного превращения.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы применялись современные методы органического синтеза. Разделение реакционных смесей, выделение и очистка соединений осуществлялись методами колоночной хроматографии, экстракции, вакуумной перегонки и перекристаллизации. В работе использовались физико-химические методы установления структуры и чистоты химических соединений: ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, элементный и рентгеноструктурный анализ.

Степень достоверности. Высокая достоверность изложенных в работе результатов обеспечена использованием современных физико-химических методов исследования структур, тщательностью проведения экспериментов и их воспроизводимостью. Строение всех впервые синтезированных веществ доказано методами ИК-, УФ-, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, элементного анализа, в некоторых случаях и данными РСА. Достоверность результатов подтверждается независимой экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

Диссертационная работа соответствует специальности 1.4.3 органическая химия.

Результаты работы могут быть использованы в научно-исследовательской практике НИОХ СО РАН, а также в лабораториях других научных организаций: Институте

Международный Томографический Центр СО РАН (г. Новосибирск), Институте Химической Кинетики и Горения СО РАН (г. Новосибирск), Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН (г. Новосибирск), Институте Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва), Федеральном Исследовательском Центре Химической Физики им. Н.Н. Семёнова РАН (г. Москва).

Полнота опубликования результатов. По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых международных изданиях и тезисы 18 докладов на российских и международных конференциях.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Khoroshunova Yu.V., Morozov D.A., Taratayko A.I., Gladkikh P.D., Glazachev Yu.I., Kirilyuk I.A. Synthesis of 1-Azaspiro[4.4]nonan-1-oxyls via Intramolecular 1,3-Dipolar Cycloaddition // Beilstein J. Org. Chem. – 2019. – V. 15. – N. 1. – P. 2036-2042.

2. Khoroshunova Yu.V., Morozov D.A., Taratayko A.I., Dobrynin S.A., Eltsov I.V., Rybalova T.V., Sotnikova Yu.S., Polovyanenko D.N., Asanbaeva N.B., Kirilyuk I.A. The Reactions of 6-(Hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1-azaspiro[4.4]nonanes with Methanesulfonyl Chloride or $\text{PPh}_3\text{-CBr}_4$ // Molecules. – 2021. – V. 26. – N. 19. – P. 6000.

3. Fehling P., Buckenmaier K., Dobrynin S.A., Morozov D.A., Polienko Yu.F., Khoroshunova Yu.V., Borozdina Yu., Mayer Ph., Engelmann J., Scheffler K., Angelovsky G., Kirilyuk I.A. The effects of nitroxide structure upon ^1H Overhauser dynamic nuclear polarization efficacy at ultralow-field // J. Chem. Phys. – 2021. – V. 155. – N. 14. – P. 144203.

Материалы диссертационной работы представлены на конференциях:

1. Ю.В. Хорошунова, Д.А. Морозов, И.А. Кирилюк. Синтез пространственно затрудненных нитроксильных радикалов ряда пиперидина и пирролидина с использованием реакции внутримолекулярного 1,3-дипольного циклоприсоединения. Всероссийская молодежная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»: Сборник тезисов. – Новосибирск-Шерегеш, 9-16 марта 2018 г. - с. 90.

2. Ю.В. Хорошунова. Синтез пространственно затрудненных нитроксильных радикалов ряда пирролидина, содержащих спироциклические фрагменты. Материалы 56-ой Международной научной студенческой конференции, химия, 22-27 апреля 2018 г., Новосибирск, - с. 131.

3. S.A. Dobrynin, D.A. Morozov, I.F. Zhurko, A.I. Taratayko, Yu.V. Khoroshunova, S.S. Kutseykin, Yu.I. Glazachev, E.V. Zaytseva, I.A. Kirilyuk. Towards Bio-reduction-Resistant Nitroxides. International Conference SPCT-2018 Spin Physics, Spin Chemistry and Spin Technology: Book of Abstracts. – September, 10-15, 2018 Novosibirsk, Russia. – p. 32.

4. Ю.В. Хорошунова, Д. А. Морозов, А. И. Таратайко, И. А. Кирилук. Внутримолекулярная реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения 2-(4-пент-1-ил)нитронов пирролидинового ряда в синтезе нитроксильных радикалов. WSOC 2019. Научная конференция: Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней. Школа-конференция молодых ученых: Органическая химия: традиции и современность: Сборник тезисов. – 18-21 января 2019 г., пансионат МГУ Красновидово, - с. 96.
5. Хорошунова Ю.В. Синтез и модификации нитроксильных радикалов со спиро-2'-гидроксиметилциклопентановым фрагментом. Материалы 57-ой Международной научной студенческой конференции, химия, 14-19 апреля 2019 г., Новосибирск, - с. 60.
6. Ю.В. Хорошунова, Д.А. Морозов, А.И. Таратайко, Ю.И. Глазачев, И.А. Кирилук. Синтез конформационно жестких спиновых меток на основе нитроксильных радикалов ряда пирролидина. V Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии МОБИ-ХимФарма2019, Сборник тезисов докладов. - 15-18 сентября 2019, Судак, Крым, – с.103.
7. Yu.V. Khoroshunova, D.A. Morozov, A.I. Taratayko, Yu.I. Glazachev, I.A. Kirilyuk. Conformationally rigid pyrrolidine nitroxides: synthesis and transformations. The 13th Japanese-Russian International Workshop on Open Shell Compounds and Molecular Spin Devices, Book of Abstracts. - November 10-13, 2019, Awaji Island, Hyogo, Japan, P.19.
8. Хорошунова Ю.В., Морозов Д.А., Кирилук И.А. Функционально замещённые спироциклические нитроксильные радикалы для гиперполяризации ядер в биологических системах. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2021 секция «Химия»: Материалы конференции. – 12-23 апреля 2021 г., МГУ, Москва, - с. 755.
9. Хорошунова Ю.В., Морозов Д.А., Кирилук И.А. Синтез функционально замещенных конформационно жестких пирролидиновых нитроксильных радикалов. Международный семинар, посвященный 90-летию со дня рождения профессора Л.Б. Володарского: Сборник тезисов. – 7 июня 2021 г., Новосибирск, - с. 21.
10. Хорошунова Ю.В., Морозов Д.А., Кирилук И.А. Необычные превращения 6-(гидроксиметил)-2,2-диметил-1-азаспиро[4.4]нонанов. Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии»: Тезисы докладов. – 9-11 июня 2021 г., Новосибирск, - с. 113.
11. Хорошунова Ю.В., Морозов Д.А., Кирилук И.А. Реакции 6-(гидроксиметил)-2,2-диметил-1-азаспиро[4.4]нонанов с MsCl и $\text{CCl}_4\text{-PPh}_3$. Всероссийский конгресс по химии

гетероциклических соединений КОСТ-2021: Сборник тезисов. 12-16 октября 2021 г., г. Сочи, - с. 383.

12. P. Fehling, A. Pavicevich, A. Korenic, S. Dobrynin, D. Morozov, Y. Khoroshunova, J. Engelmann, K. Buckenmaier, K. Scheffler, G. Angelovski, I. Kirilyuk, M. Mojovich, P. Anjus, Yu. Borozdina. Nanosized free radicals for the use as contrast and hyperpolarization agents in ultralow-field and high-field MRI. 16th European Molecular Imaging Meeting - EMIM 2021 Gottingen, Germany, 24-27 August, p. 807.

13. K. Buckenmaier, P. Fehling, S. Dobrynin, D. Morozov, Y. Borozdina, J. Engelmann, Y. Polienko, Y. Khoroshunova, K. Scheffler, G. Angelovski, I. Kirilyuk. The effects of nitroxide structure upon Overhauser dynamic nuclear polarization efficacy at ultralow-field. 16th European Molecular Imaging Meeting - EMIM 2021 Gottingen, Germany, 24-27 August, 1023.

14. D.A. Morozov, Yu.F. Polienko, I.F. Zhurko, S.A. Dobrynin, Yu.V. Khoroshunova, D.G. Trofimov, D.A. Parkhomenko, Yu.I. Glazachev, E.G. Bagryanskaya, I.A. Kirilyuk. Highly stable nitroxide spin labels for biophysical research. V Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов», МОСМ 2021, Сборник тезисов - г. Екатеринбург, Россия, 8-12 ноября 2021 г.

15. Д.А. Морозов, Ю.Ф. Полиенко, И.Ф. Журко, С.А. Добрынин, Ю.В. Хорошунова, Д.А. Пархоменко, Ю.И. Глазачев, Е.Г. Багрянская, И.А. Кирилук. Пространственно затруднённые нитроксильные радикалы: синтез и модификации. Всероссийская молодежная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии» СТОС-2022: Сборник тезисов, Шерегеш, Россия, 20-26 марта 2022, – с. 43.

16. Хорошунова Ю.В., Морозов Д.А., Кирилук И.А. Превращение соединений с 6-гидроксиметил-1-азаспиро[4.4]нонанным остовом в производные азепана. Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» СПОХ-2022, 12-14 сентября 2022, Академгородок, Новосибирск, Сборник тезисов, с.76.

17. Д.А. Морозов, Ю.В. Хорошунова, С.А. Добрынин, Ю.И. Глазачев, И.А. Кирилук. Пространственно затрудненные нитроксильные радикалы пирролинового и пирролидинового ряда как основа спиновых меток нового поколения. Всероссийская конференция "Органические радикалы: фундаментальные и прикладные аспекты", г. Москва, 15-16 декабря 2022 г.

18. Ю.В. Хорошунова, Д.А. Морозов, Ю.И. Глазачев, Д.А. Кузнецов, Т.В. Рыбалова, Е.Г. Багрянская, И.А. Кирилук. Устойчивые к восстановлению спиновые метки с высоким временем релаксации. Всероссийской научной конференции «Современные проблемы

органической химии» СПОХ-2023: сборник тезисов. – 26-30 июня 2023 г., Новосибирск, – с.72.

Вклад соискателя в публикации. Вклад соискателя в синтетическую часть статей 1 и 2 является основным и заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении синтеза всех новых соединений, доказательстве их строения соединений на основании спектральных данных, анализе экспериментальных данных и обсуждении результатов. В статье 3 соискателем синтезированы два нитроксильных радикала из ряда исследуемых нитроксильных моно- и бирадикалов.

Все представленные в диссертационной работе результаты, включая экспериментальную работу по синтезу, выделению, очистке полученных соединений, а также по анализу и интерпретации данных физико-химических исследований выполнены автором лично. Автором был проведён анализ и обобщение литературных данных по тематике исследования, внесён основной вклад в формирование общего направления работы и постановку конкретных целей и задач исследования. При непосредственном участии соискателя осуществлялась подготовка научных публикаций по теме работы. Соискатель представлял доклады по теме диссертационной работы на научных конференциях. Опубликованные работы достаточно полно отражают содержание диссертационной работы.

Во время выполнения диссертационной работы Хорошунова Ю.В. проявила себя как самостоятельный и квалифицированный исследователь, являлась исполнителем грантов РФФИ (№ 17-03-01132 и 18-53-76003) и РНФ (№ 19-13-00235 и 23-23-00617), неоднократно была победителем конкурсов молодых учёных НИОХ СО РАН. Хорошунова Ю.В. руководила выполнением курсовой работы студентки 2-го курса ФЕН НГУ Горленко Елены Сергеевны в 2021 г.

Диссертационная работа «Синтез и реакции нитроксильных радикалов пирролидинового ряда со спиро-(2-гидроксиметил)циклопентановыми фрагментами в ближайшем окружении радикального центра» Хорошуновой Юлии Владиславовны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 органическая химия.

Заключение принято на заседании объединённого научного семинара Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Присутствовало на заседании 27 чел., в том числе 17 кандидатов наук и 6 докторов наук. Результаты голосования: «за» – 27, «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 10 от 16.06.2023 года.

Председатель семинара,
Зам. директора по научной работе
ННХ СО РАН, к.х.н.



Морозов Д.А.

Секретарь семинара,
к.х.н.

16.06.2023 г.

Оськина И.А.