

На правах рукописи



Мункуев Алдар Аюрович

**СИНТЕЗ ИНГИБИТОРОВ TDP1 И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ
АДАМАНТАНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛОВ,
СОДЕРЖАЩИХ МОНОТЕРПЕНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ**

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:

Сулов Евгений Владимирович

кандидат химических наук, заведующий лабораторией направленных трансформаций природных соединений, НИОХ СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Газизов Альмир Сабирович

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории элементарноорганического синтеза им. А.Н. Пудовика, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань

Калинин Станислав Алексеевич

кандидат химических наук, старший преподаватель Кафедры медицинской химии, Лаборатория синтеза биоактивных малых молекул, Институт Химии Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

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

Защита состоится «14» июня 2024 г. в 09:30 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. По мере увеличения продолжительности жизни населения развитых стран растёт и заболеваемость нейропатологиями, включая болезнь Альцгеймера. Однако, несмотря на возрастающую социальную значимость поиска лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных расстройств, до сих пор не существует методов лечения, предотвращающих развитие и прогрессирование нейродегенеративных заболеваний.

Ещё одной социально-значимой проблемой современной медицины является отсутствие эффективных и безопасных инструментов в терапии онкологических заболеваний. Приобретение лекарственной устойчивости и тяжёлые побочные эффекты химиотерапевтических препаратов снижают клиническую эффективность существующих на сегодняшний день способов лечения злокачественных новообразований. В связи с этим разработка новых более совершенных методов борьбы с нейродегенеративными и онкологическими заболеваниями является крайне актуальной задачей современной медицинской химии.

Одним из наиболее широко применяемых подходов к разработке новых потенциальных лекарственных препаратов является структурная модификация природных метаболитов. Монотерпеноиды и их производные обладают широким спектром проявляемой биологической активности, в числе которых находится противовирусная (1), анальгетическая (2), антипаркинсоническая (3), антимикобактериальная (4) и др. виды активности (рис. 1).

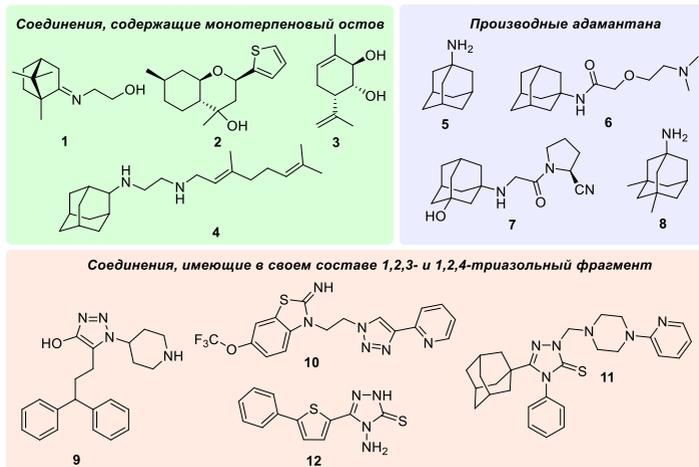


Рисунок 1.

Также широкое применение нашел подход, основанный на использовании известных строительных блоков (building blocks). Производные адамантана широко применяются в медицине. В рамках данного подхода значительный интерес представляют азотсодержащие гетероциклические соединения, в том числе производные 1,2,3- и 1,2,4-триазола, которые проявляют нейропротекторную (**9** и **10**), противовоспалительную (**11**), противоопухолевую (**12**) и другие виды активности (рис. 1).

Объединение этих направлений при синтезе соединений, сочетающих в своей структуре адамантановый, монотерпеновый и триазольный фрагменты, может привести к новым производным, обладающим ценными фармакологическими свойствами.

Первое направление данной работы связано с поиском новых ингибиторов фермента репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1), перспективной мишени для противоопухолевой терапии. Структурный дизайн соединений основан на литературных данных (соединения **13-16** на рис. 2). Выбор 1,2,4-триазоло-3-тиольного фрагмента связан со сходными по сравнению с сложноэфирной или (тио)амидной группами параметрами, отвечающими за связывание с мишенью, а также с результатами молекулярного моделирования¹.

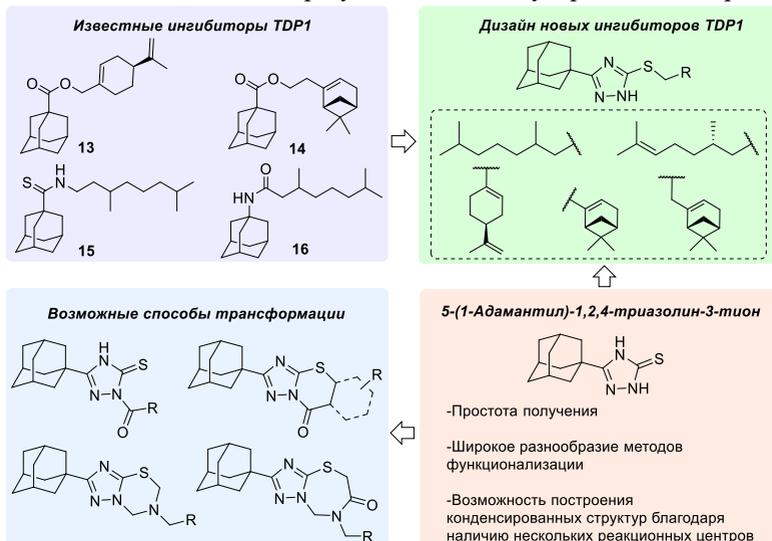


Рисунок 2.

Также стоит отметить, вариативность методов синтеза 1,2,4-триазолин-3-тионов наряду с доступностью исходных реагентов позволяет получать

¹ Проведено м.н.с. ЛФАВ НИОХ СО РАН Цыпышевым Д. О.

соединения с заданными структурными параметрами. Кроме того, наличие нескольких способных к функционализации центров в составе 1,2,4-триазалин-3-тиона открывает путь к созданию на его основе широкого ряда разнообразных по структуре соединений с конденсированным бициклическим остовом.

Следующее направление исследования посвящено поиску потенциальных нейропротекторных агентов для терапии нейродегенеративных заболеваний, главным образом болезни Альцгеймера. Ранее было показано, что гидроксамовая кислота **17** проявляет ингибирующую активность в отношении гистоновых деацетилаз и улучшает долговременную память трансгенных мышей линии 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера, а также обладает способностью восстанавливать показатели пространственного обучения и формирования памяти в тесте «Водный лабиринт Морриса» (рис. 3).

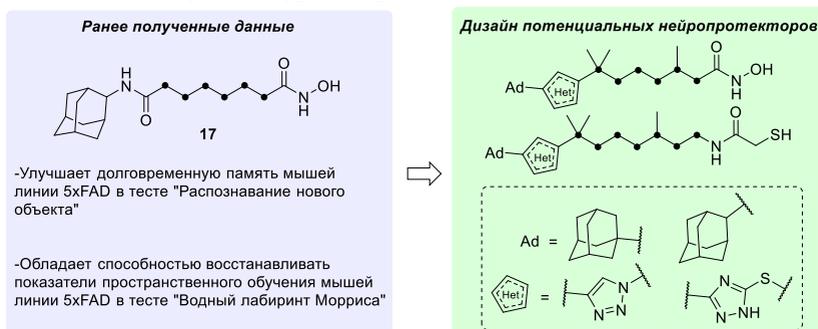


Рисунок 3.

Основываясь на вышеизложенных данных, нами был предложен дизайн потенциальных нейропротекторов на основе гидроксамовых кислот/меркаптоацетамидов, содержащих адамантовый и триазольный фрагменты, а также ациклический монотерпеновый линкер (рис. 3). Отметим, что в литературе отсутствуют какие-либо данные о применении углеродного скелета ациклических монотерпеновых фрагментов в качестве линкерной части для построения потенциальных нейропротекторных агентов. Предлагаемый линкер обладает сходными характеристиками и укладывается в ограничения по длине, в то время как выбор 1,2,3-триазольного ядра основан на том, что данный фрагмент является биоизостером амидной функции. Стоит отметить, что предварительные расчетные данные молекулярного моделирования некоторых запланированных к синтезу соединений подтверждают перспективность такого подхода².

Цель исследования – синтез новых ингибиторов TDP1 и потенциальных нейропротекторных агентов на основе адамантилсодержащих триазольных

² Проведено м.н.с. ЛФАН НИОХ СО РАН Цыпышевым Д. О.

производных, имеющих в своем составе монотерпеновые фрагменты; изучение взаимосвязи между химической структурой полученных соединений и биологической активностью.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение исходного 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона и монотерпеновых бромпроизводных, аминов и карбоновых кислот исходя из коммерчески доступных субстратов;

2. Синтез S-алкилированных производных 1,2,4-триазола, сочетающих адамантановый и монотерпеновый фрагменты;

3. Изучение взаимодействия 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона с монотерпеновыми карбоновыми кислотами различного строения в присутствии конденсирующих агентов;

4. Конструирование на основе 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона конденсированных бициклических систем, содержащих остатки монотерпенов;

5. Разработка синтетических подходов, открывающих путь к созданию новых потенциальных нейропротекторных агентов, содержащих гидроксаматную/меркаптоацетамидную группу и адамантилзамещенные триазольные заместители на разных концах ациклического монотерпенового линкерного фрагмента;

6. Анализ данных, полученных в результате проведения биологического тестирования синтезированных производных, а также выявление зависимостей «структура-активность».

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. В ходе выполнения исследования впервые были синтезированы 1-адамантилсодержащие тиопроизводные 1,2,4-триазола, имеющие в 3-ем положении монотерпеновые фрагменты. Изучена реакция 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона с монотерпеновыми карбоновыми кислотами различного строения, в том числе содержащими α,β -непредельную карбоксильную группу, в присутствии активаторов карбоксильной группы. Показано, что взаимодействие 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона с 3,7-диметилпикриновой и цитронелловой кислотами при 75°C в присутствии циклоангидрида пропанфосфоновой кислоты приводит к образованию продукта N2-замещения. Обнаружено, что при проведении реакции с (-)-миртеновой кислотой в аналогичных условиях основным продуктом является (4aR,6R,8S,8aS)-2-(1-адамантил)-7,7-диметил-4a,5,6,7,8,8a-гексагидро-9H-6,8-метанобензо[e][1,2,4]триазоло[5,1-b][1,3]тиазин-9-он, что связано протеканием внутримолекулярной реакции Михаэля. В то же время, взаимодействие 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазаолин-3-тиона с (-)-перилловой кислотой сопровождается выделением двух основных диастереомеров, в то время как (E,Z)-гераневая кислота дает рацемическую смесь соединений с 5,6-дигидро-7H-[1,2,4]триазоло[5,1-b][1,3]тиазин-7-оновым остовом. Показано, что причиной

образования данных соединений является обратимость реакции Михаэля в условиях проведения реакции и более высокая термодинамическая стабильность образующихся продуктов.

Проведен синтез 1-адамантилсодержащих 6,7-дигидро-5*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]гиадазинов, сочетающих в своем составе монотерпеновые фрагменты различной структуры, в том числе ациклический, моноциклический и бициклический остовы. Разработан метод получения новых, ранее неописанных 5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]гиадазепин-7(8*H*)-онов на основе 1,2,4-триазиолин-3-тионового фрагмента.

В результате анализа данных, полученных сотрудниками Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН в ходе *in vitro* скрининга некоторых синтезированных соединений на предмет активности в отношении фермента TDP1 человека, было обнаружено, что большинство полученных производных проявляют ингибирующую активность в микромолярном диапазоне концентраций, также были выявлены некоторые закономерности «структура-активность». Наиболее эффективным ингибитором оказались 1-адамантильные производные 1,2,4-триазоло-3-тиола, содержащие 3,7-диметилоктильный заместитель и остаток (-)-нопола в 3-ем положении, концентрация полумаксимального ингибирования которых находится в микромолярном диапазоне. Изучение результатов эксперимента по повышению эффективности топотекана показало, что комбинация последнего с некоторыми синтезированными ингибиторами TDP1 приводит к повышению цитотоксического эффекта данного противоопухолевого препарата в отношении линии клеток HeLa. При этом наиболее эффективным сенсibilизатором является соединение, содержащее (+)-камфоленовый остаток, которое снижает полумаксимальную цитотоксическую концентрацию топотекана в 3-4 раза. Более того, данное соединение обладает способностью уменьшать токсическое воздействие топотекана на условно нормальные клетки НЕК293А, что делает его перспективным кандидатом для дальнейших *in vivo* исследований.

Впервые предложен способ применения монотерпенового остатка в качестве линкера в дизайне потенциальных нейропротекторных агентов на основе адамантилзамещенных триазольных производных, имеющих как гидроксаматный, так и меркаптоацетамидный цинк-связывающий фрагменты. Обнаружена способность некоторых полученных соединений подавлять агрегацию β -амилоида, проявлять антиоксидантный потенциал и цитопротекторные свойства, а также ингибировать сумоилирование гистоновых деацетилаз.

Методология и методы исследования. Методология исследования построена в соответствии с классическими принципами органической и медицинской химии и включает выбор исходных субстратов для химической

модификации, получение ряда структурно близких соединений с варьированием различных структурных параметров, нахождение взаимосвязи структуры исследуемых веществ с проявляемой ими активностью. В работе использовались физико-химические методы установления структуры и чистоты химических соединений: спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H , ^{13}C , в том числе с привлечением гетероядерных ^1H - ^{13}C и гомоядерных ^1H - ^1H корреляций, рентгеноструктурный анализ и масс-спектрометрия, включая масс-спектрометрию высокого разрешения. Также для полученных соединений определялись удельное вращение и температура плавления.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методы синтеза S-алкилированных и N-ацилированных производных 1,2,4-триазола, а также 6,7-дигидро-5*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазинов, сочетающихся в своей структуре адамантановый и монотерпеновый фрагменты.
2. Способы получения 2-((1-адамантил)-5,6-дигидро-7*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3]тиазин-7-онов по реакции 5-1-адамантил-1,2,4-триазиолин-3-тиона с монотерпеновыми карбоновыми кислотами в присутствии циклоангидрида пропанфосфоновой кислоты при нагревании.
3. Метод конструирования новых 2-(1-адамантил)-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазепин-7(8*H*)-онов, содержащих в 6-ом положении монотерпеновые фрагменты, на основе 1,2,4-триазиолин-3-тионового остова.
4. Способы синтеза потенциальных нейропротекторных агентов на основе адамантанового фрагмента и ациклического монотерпенового остова, содержащих триазольный заместитель и гидроксаматный/меркаптоацетамидный фрагмент в качестве Zn-связывающей группы.
5. Анализ данных по ингибирующей активности в отношении фермента TDP1 некоторых полученных соединений, а также синергетического эффекта с топотеканом.
6. Анализ результатов исследования цитотоксичности и влияния некоторых потенциальных нейропротекторных агентов на процесс сумоилирования гистоновых деацетилаз, перекисное окисление липидов и агрегацию β -амилоида.

Степень достоверности обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических методов установления строения полученных соединений. Структура и чистота соединений подтверждены данными ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии (в некоторых случаях с применением двумерных корреляционных спектров), масс-спектрометрии, в том числе высокого разрешения, а также данными рентгеноструктурного анализа для некоторых соединений. Достоверность результатов подтверждается независимой

экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

Апробация работы.

По материалам диссертации опубликовано 7 тезисов, 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, получен 1 патент на изобретение. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 7 устных докладов.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: 57-й Международная научная студенческая конференция (Новосибирск, 2019), XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященная 125-летию со дня основания Томского политехнического университета (Томск, 2021), Первая Всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MedChemSchool2021 (Новосибирск, 2021), Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии», посвященная 90-летию со дня рождения ак. В. А. Коптюга (Новосибирск, 2021), 5-й Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, 2022), Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2023), I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2023).

Личный вклад соискателя

Результаты, представленные в работе, получены автором или при его непосредственном участии. Автором выполнен поиск, анализ и обобщение научной литературы по теме работы, подбор и оптимизация методов синтеза соединений, получение всех промежуточных и целевых соединений, их выделение, идентификация полученных соединений с использованием физико-химических методов. Соискателем внесен существенный вклад в подготовку научных публикаций по теме исследования. Автор также готовил и представлял доклады о полученных результатах на научных конференциях.

Структура диссертации. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста и содержит 78 схем, 24 рисунка, 18 таблиц. Работа состоит из списка используемых сокращений, введения, обзора литературных данных (Глава 1), обсуждения результатов (Главы 2), экспериментальной части (Глава 3), заключения, а также списка цитируемой литературы (144 литературных источника).

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. «Обзор литературы» посвящен вопросу таутомерии соединений, содержащих 1,2,4-триазольный остов с атомом серы 3-ем положении, основным методам их синтеза, некоторым способам трансформации данного структурного блока и их биологической активности. В главе «Обсуждение результатов» представлены результаты выполненного исследования, включая синтез адамантилсодержащих триазольных производных, имеющих монотерпеновые фрагменты, и изучение взаимосвязи между химической структурой и биологической активностью. «Экспериментальная часть» содержит методики синтеза и физико-химические характеристики синтезированных соединений.

1. Синтез некоторых монотерпеновых аминов и карбоновых кислот

Коммерчески доступные монотерпеновые спирты **110a-g** были превращены в соответствующие бромпроизводные **111a-g** взаимодействием спиртов либо с N-бромсукцинимидом и трифенилфосфином в дихлорметане (**111a**, **111b** и **111e**), либо с трехбромистым фосфором (**111c**, **111d**, **111f** и **111g**) (схема 1). Реакция бромпроизводных **111a-g** с фталимидом калия в ДМФА в условиях нагревания привела к образованию N-замещенных производных **112a-e**. Последующее раскрытие фталимидов **112a-g** при помощи этилендиамина в метаноле в условиях кипячения сопровождается выделением целевых монотерпеновых аминов **113a-e**.

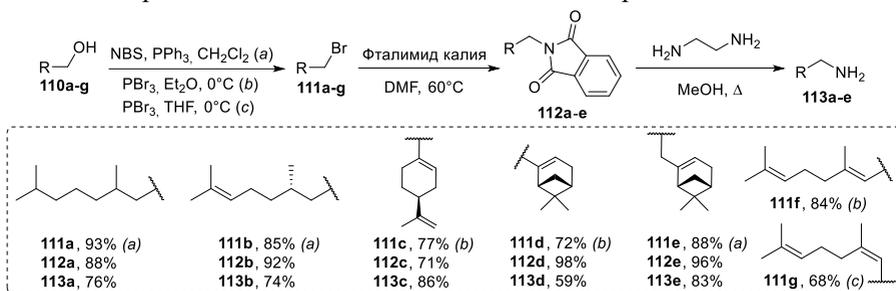


Схема 1.

Также нами был выполнен синтез некоторых монотерпеновых карбоновых кислот. 3,7-Диметил октановая кислота была получена окислением спирта **110a** KMnO_4 . Соединения **115-118** были синтезированы окислением по Пиннику соответствующих альдегидов (схема 2).

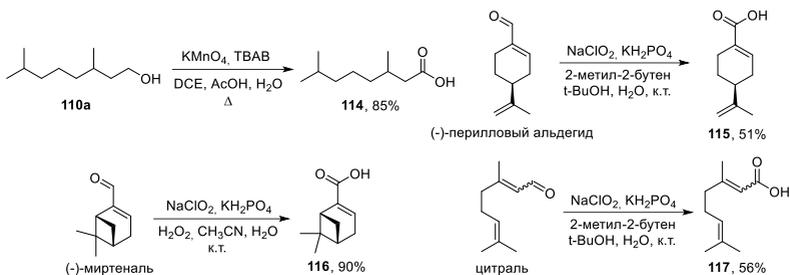


Схема 2.

2. Получение тиозамещенных производных 1,2,4-триазола, сочетающих фрагменты адамантана и монотерпенов

Синтез исходного 1,2,4-триазолин-3-тиона **123** осуществляли двухстадийным методом по реакции хлорангирида 1-адамантанкарбоновой кислоты с тиосемикарбазидом и последующей его циклизацией в щелочной среде. Алкилирование полученного соединения бромпроизводными привело к образованию продуктов **124a-i**. Взаимодействие монотерпеновых карбоновых кислот с соединением **123** в присутствии реагента ТЗР или оксалилхлорида дает соответствующие продукты N-ацилирования **126a-d**.

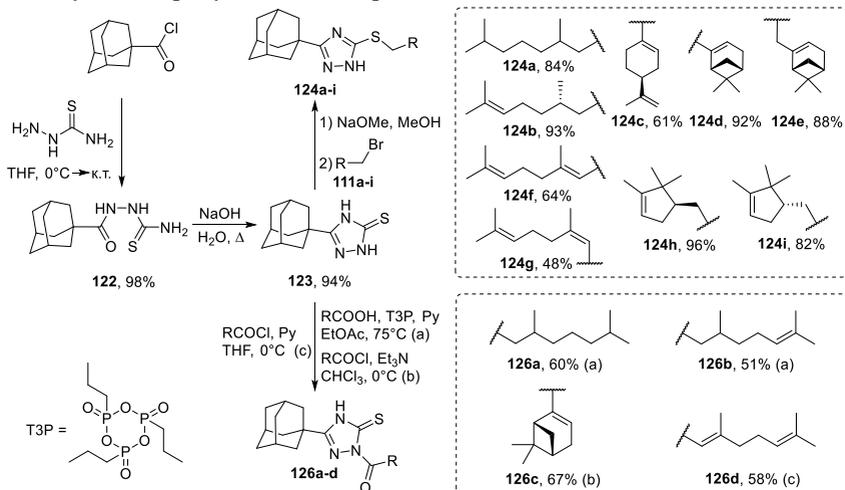


Схема 3.

Реакция 1,2,4-триазолин-3-тиона **123** с (-)-миртеновой кислотой в присутствии ТЗР протекает при нагревании протекает с образованием единственного циклического продукта **127a**, строение которого было доказано методом двумерной ЯМР-спектроскопии. Сходным образом происходит

взаимодействие с (-)-перилловой кислотой, однако в данном случае происходит образование двух диастереомеров **128a** и **128b** в соотношении 1:0.7. Строение соединения **128b** удалось подтвердить методом РСА. Конденсация соединения **123** с гераневой кислотой **117** дает продукт **129**.

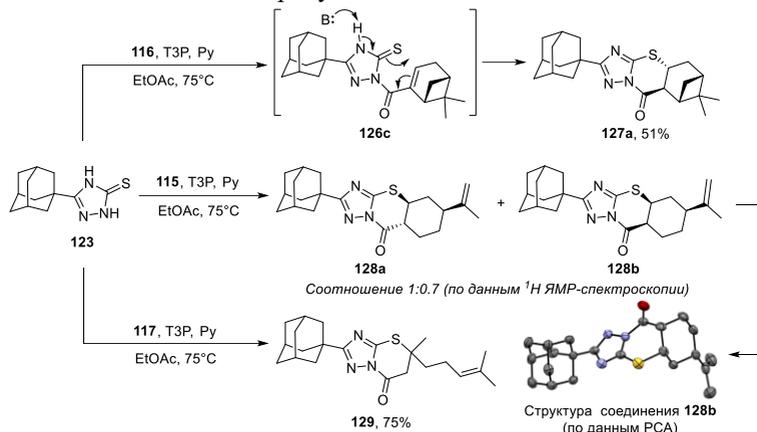


Схема 4.

Расчеты относительных энергий³ всех возможных диастереомеров показали, что в реакционных смесях образуются наиболее стабильные продукты, что может указывать на обратимость реакции *thia*-Михаэля в условиях реакции. Для подтверждения гипотезы был проведен дополнительный эксперимент по нагреванию выделенного диастереомера **128b** в аналогичных условиях, который показал образование смеси соединений **128a** и **128b** в соотношении 1:0.75.

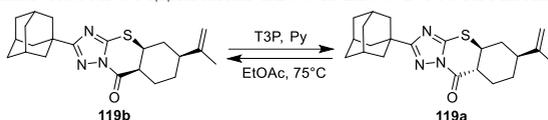


Схема 5.

Реакция Манниха 1,2,4-триазилин-3-тиона **123** с монотерпеновыми аминами в присутствии формалина приводит к образованию [1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазинов **130a-e**. Строение полученных продуктов дополнительно подтверждено методом РСА на примере соединения **130d**.

Взаимодействие соединения **123** с хлоруксусной кислотой дает соответствующий продукт **134**, конденсация которого с монотерпеновыми аминами в присутствии карбодимида EDC приводит к образованию амидов **136a-**

³ Проведены с.н.с. ЛМР НИОХ СО РАН, к.х.н. Генаевым Александром Михайловичем и м.н.с. АО «Биокад», к.х.н. Можайцевым Евгением Сергеевичем.

е, циклизация которых в присутствии параформа и каталитического количества (+)-камфорсульфоновой кислоты сопровождается выделением соединений **137а-е**, содержащих ранее не описанный в литературе [1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]гиадиазепин-7-оновый остов.

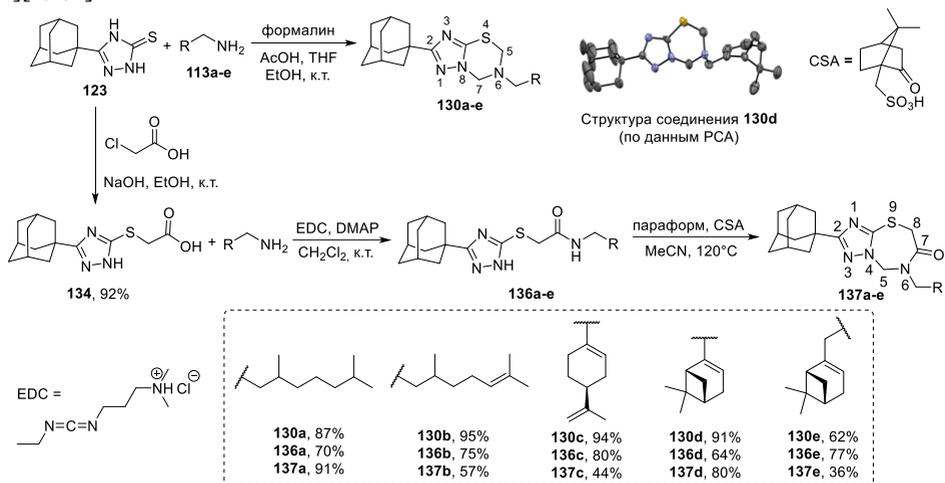


Схема 6.

3. Анализ данных по ингибирующей активности некоторых синтезированных производных в отношении TDP1

Ингибирование фермента TDP1 является перспективной стратегией преодоления резистентности некоторых видов рака и повышения эффективности противоопухолевых препаратов, главный механизм действия которых основан на стабилизации комплекса топоизомеразы 1 с ДНК. Некоторые соединения были протестированы на предмет активности в отношении фермента TDP1 (таблица 1). Исследование было выполнено сотрудниками Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. В качестве положительного контроля использовался фураминдин, коммерчески доступный ингибитор TDP1.

Таблица 1. Значения полуингибирующих концентраций соединений **123** и **124а-ж**

Номер	IC_{50} , мкМ	Номер	IC_{50} , мкМ
124а	0.54±0.09	124б	1.5±0.3
124с	6.2±2.2	124д	7.5±1.8
124е	0.57±0.14	124ф	5.3±1.7
124г	5.6±0.6	124х	5.6±1.9
124и	6.1±2.6	124ж	>10
123	>75	Фураминдин (контроль)	1.2±0.3

Найдено, что среди производных 1,2,4-триазола, соединения **124a** и **124e**, содержащие фрагменты 3,7-диметилоктанола и (-)-нопола, соответственно, обладают наибольшей ингибирующей активностью против TDP1 с IC_{50} 0.57 мкМ. Значения IC_{50} как ранее синтезированного соединения **124j** с бензильным заместителем, так и исходного соединения **123** превышают 10 мкМ, что говорит о важности монотерпенового фрагмента с точки зрения подавления ферментативной активности TDP1.

Формирование дополнительного кольца приводит к снижению активности, что продемонстрировано на соединениях **130a-e** и **137a-e**, содержащих 6,7-дигидро-5*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазинный и [1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазепин-7(8*H*)-оноый остовы, значения IC_{50} которых варьируются в диапазоне 16-77 мкМ.

Сравнение полученных данных с результатами скрининга ранее синтезированных в нашей лаборатории сложных эфиров **138a-g** показывает, что значения IC_{50} соединений **138a-g** и 1,2,4-триазолов **124a-g** находятся в сравнимых диапазонах, при этом в обоих случаях наиболее выраженными ингибирующими свойствами обладают соединения **138a** и **124a** с 3,7-диметилоктильным фрагментом. Стоит отметить, что несомненное преимущество 1,2,4-триазоло-3-тиольного фрагмента по сравнению со сложноэфирной группой заключается в его более высокой стабильности в физиологических средах.

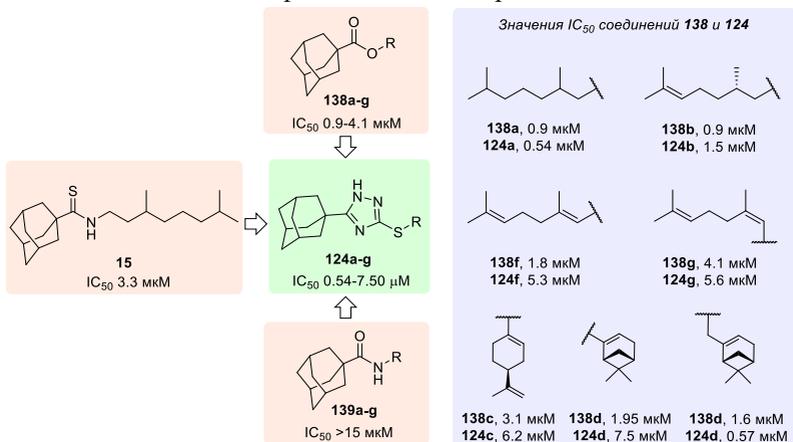


Рисунок 4.

Соединения, содержащие амидную функцию, не проявляют заметной ингибирующей активности в отношении TDP1 вне зависимости от структуры монотерпенового фрагмента. Замена на 1,2,4-триазольный остов амидной функциональной группы приводит к появлению активности у соединений,

содержащих 1-адамантильный остов и монотерпеновый заместитель, как показано на рис. 4. С другой стороны, при сравнении активностей тиамида **15** и аналогичного S-алкилированного 1,2,4-триазола **124a** можно сделать вывод о шестикратном увеличении активности с 3.3 мкМ (тиамид **15**) до 0.54 мкМ (соединение **124a**). Полученные наблюдения говорят о перспективности такого подхода при создании ингибиторов TDP1 на основе соединений, имеющих в своем составе адамантановый и монотерпеновый фрагменты.

Также была изучена способность некоторых полученных соединений усиливать цитотоксический эффект топотекана по отношению к раковой линии клеток HeLa. Показано, что наиболее эффективным сенсibilизатором является соединение **124h**, содержащее (+)-камфоленовый остаток, увеличивающее цитотоксический потенциал топотекана в 4 раза с одновременным уменьшением его токсического воздействия на условно нормальные клетки НЕК293А, что делает его перспективным кандидатом для дальнейших *in vivo* исследований.

4. Синтез потенциальных нейропротекторных агентов

На первой стадии нами было проведено восстановление хлорангидрида 1-адамantanкарбонической кислоты при помощи комплекса Red-Al с получением соответствующего спирта **143**, окисление которого до альдегида **144** было осуществлено под действием хлорхроматата пиридиния, который был введен в дальнейшие превращения без выделения. Альдегид **144** далее вовлекали в реакцию Кори-Фукса с четырехбромистым углеродом и трифенилфосфином с получением дибромпроизводного **145**, которое далее обрабатывали *n*-бутиллитием, что привело к образованию терминального алкина **146**. Удобным способом синтеза алкинов из карбонильных соединений является их взаимодействие с реагентом Охиры-Бестмана, которое привело к образованию продукта **146** с более высоким выходом.

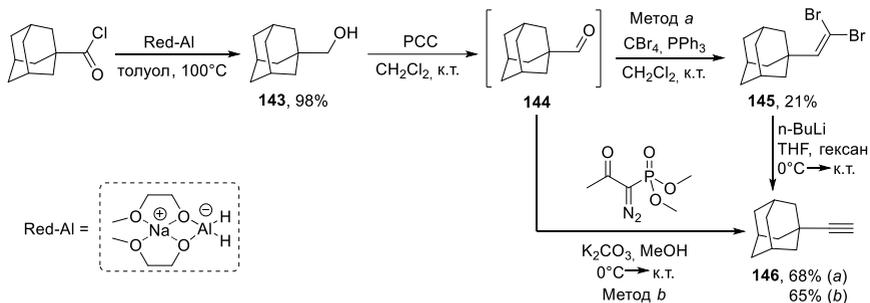


Схема 7.

Были подобраны условия трансформации адамантан-2-она по реакции Кори-Чайковского в оксиран **153a**, который раскрывали под действием эфирата

трехфтористого бора и полученный альдегид **154** вовлекали в реакцию Кори-Фукса и Сейферта-Гилберта с получением ацетилена **156**. Окисление альдегида **154** до соответствующей кислоты **157** было проведено по реакции Пинника. Полученное соединение было превращено в ацилсемикарбазид **158**, циклизация которого в щелочной среде сопровождалось выделением 1,2,4-триазолин-3-тиона **159**.

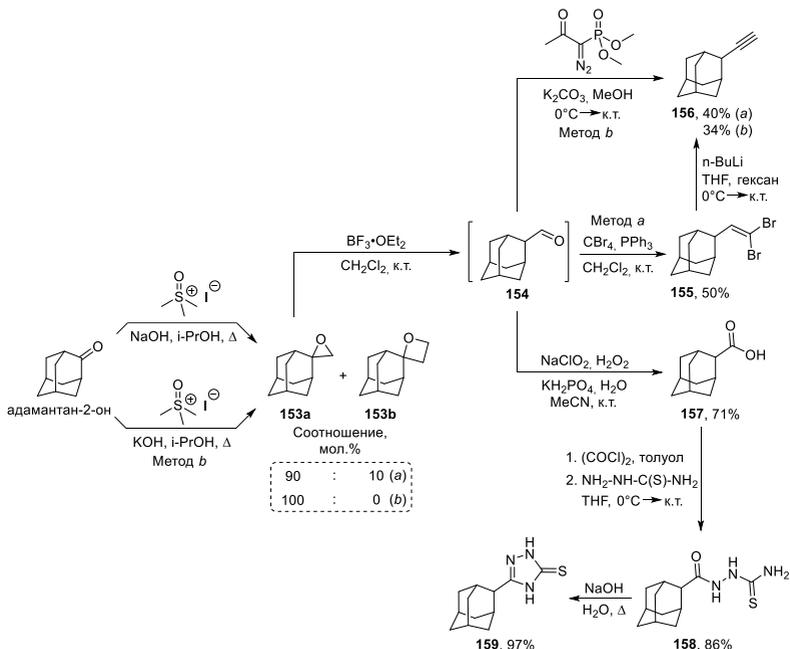


Схема 8.

В качестве стартовой молекулы для построения линкерного фрагмента нами был выбран коммерчески доступный 7-гидроксицитронелальль, который был окислен до соответствующего сложного эфира **161** при помощи оксона. Замещение гидроксильной группы на азидную функцию проводили при помощи триметилсилилазида и эфирата трехфтористого бора. Реакция альдегида **160** с гидрохлоридом гидроксилamina в присутствии карбоната натрия дает альдоксима **163**. Были найдены оптимальные условия восстановления альдоксима **163**, которые заключаются в каталитическом гидрировании на скелетном никеле в присутствии аммиака. Для получения азида **166** аминокспирт **164** обрабатывали триметилсилилазидом и эфиратом трехфтористого бора. На последней стадии азидоамин **166** вовлекали во взаимодействие с ди-*трет*-бутилдикарбонатом.

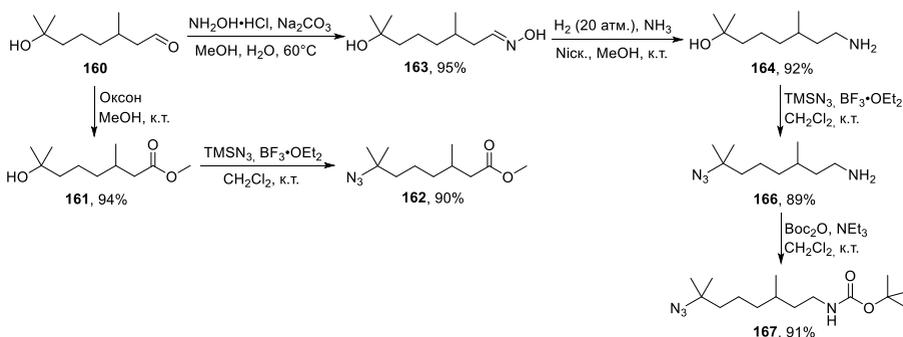


Схема 9.

Были подобраны условия взаимодействия соединения **161** с триазолин-3-тионом **123**, которые заключаются в проведении реакции в трифторуксусной кислоте. Найденные условия были применены для синтеза 2-адамантилзамещенного производного **169**. Последующая обработка полученных сложных эфиров раствором гидросиламина в метаноле приводит к образованию соединений **170** и **171**.

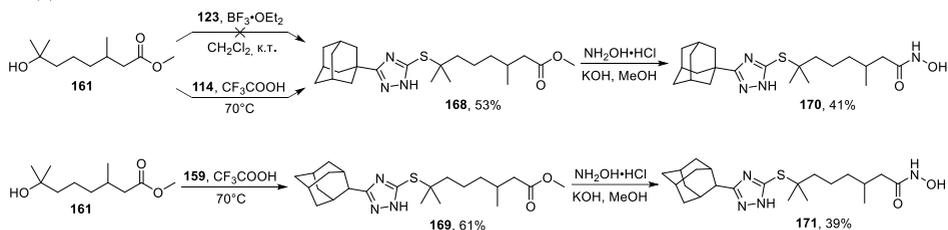


Схема 10

Медь-катализируемая реакция азид-алкинового циклоприсоединения между соединением **162** и ацетиленом **146** в присутствии сульфата меди (II) и аскорбата натрия приводит к образованию 1,2,3-триазола **172**. В аналогичных условиях был получен 1,2,3-триазол **173**, содержащий 2-адамантильный заместитель. Модификацию полученных сложных эфиров **172-173** проводили обработкой щелочным раствором гидросиламина в метаноле.

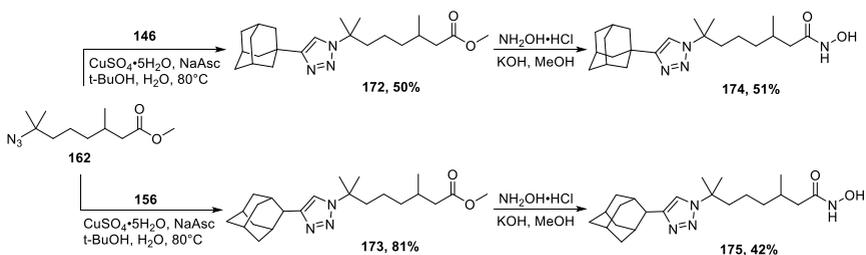


Схема 11.

Одной из групп, способных хелатировать ион цинка в активном сайте гистоновых деацетилаз, является меркаптоацетамидный фрагмент. Для синтеза целевых структур нами были выбраны два варианта защитных групп на тиолы, а именно ацетильная и тритильная, синтез которых осуществляли исходя из тиогликолевой кислоты.

Далее аминспирт **164** вводили в реакцию с 1,2,4-триазолин-3-тионами **123** и **159** в среде трифторуксусной кислоты. Полученные производные далее превращали в соответствующие S-защищенные меркаптоацетамиды **183-186** посредством реакции ацилирования при помощи хлорангидридов производных тиогликолевой кислоты.

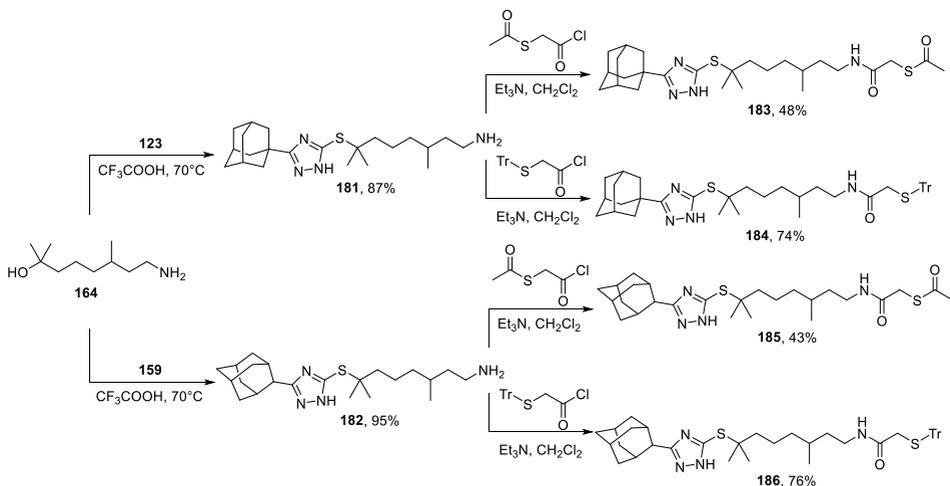


Схема 12.

В дальнейшем было обнаружено, что удаление ацетильной защиты сопровождается образованием побочных продуктов, поэтому для синтеза

соединений **187** и **189** тритильные производные обрабатывали трифторуксусной кислотой в присутствии триэтилсилана.

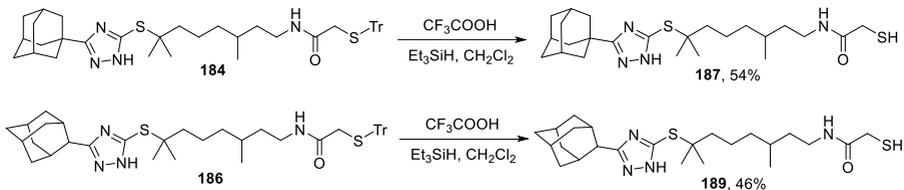


Схема 13.

С целью получения меркаптоацетамидов, имеющих в своем составе 1,2,3-триазольный фрагмент, было проведено взаимодействие алкинов **146** и **156** с азидом **167** в присутствии одновалентной меди. Удаление *tert*-бутилоксикарбонильной группы под действием трифторуксусной кислоты, взаимодействие полученного амина с хлорангидридом **180** и последующее удаление тритильной защиты сопровождалось образованием целевых соединений **194** и **196**.

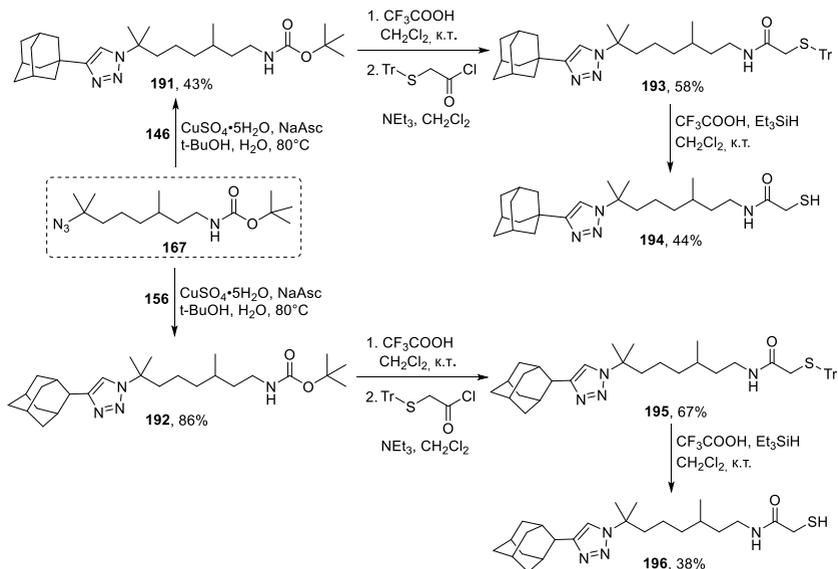


Схема 14.

5. Анализ данных нейропротекторной активности некоторых полученных соединений

Биологические эксперименты по оценке цитотоксичности полученных соединений, их влияние на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) и агрегации β -амилоида были выполнены сотрудниками Лаборатории биохимии патологических процессов ИФАВ ФИЦ Проблем химической физики и медицинской химии РАН под руководством к.х.н. Негановой М.Е.

На первоначальном этапе была проведена оценка цитотоксичности некоторых синтезированных соединений. Было обнаружено, что большинство веществ не обладает выраженным токсическим действием в отношении панели клеточных линий (аденокарцинома легкого A549, тератокарцинома яичника человека PA-1, карцинома шейки матки HeLa, нейроblastома IMR-32 и куриные фибробласты DF1). Гидроксамовые кислоты **170** и **171** проявляют более высокий цитотоксический потенциал среди исследованных соединений на клеточной линии PA-1, значения CC_{50} которых равно 68 и 71 мкМ соответственно.

Основной мишенью свободных радикалов, гиперпродукция которых наблюдается при болезни Альцгеймера, являются липиды клеточных мембран и мембран органелл. В связи с этим важным свойством для потенциальных нейропротекторов является способность проявлять антиоксидантный потенциал и, тем самым, приводить к нейтрализации активных форм кислорода

При исследовании способности потенциальных нейропротекторных агентов ингибировать процесс перекисного окисления липидов, было обнаружено, что все тестируемые вещества в концентрации 100 мкМ обладают умеренной антиоксидантной способностью как на липосомальной модели, так и в гомогенате крыс. Так, в обеих использованных моделях снижение уровня малонового диальдегида происходило в диапазоне 20-35% (таблица 2), при этом наиболее эффективное ингибирование ПОЛ наблюдается в случае соединений **185** (липосомальная модель) и **187** (гомогенат мозга крыс).

Таблица 2. Исследование влияния соединений на ПОЛ

<i>Вещество</i>	<i>Ингибирование ПОЛ (липосомальная модель), %</i>	<i>Ингибирование ПОЛ (гомогенат мозга крыс), %</i>
170	22.09±0.85	25.97±1.18
171	20.11±1.32	27.20±1.00
183	23.43±1.39	33.11±0.09
185	24.80±1.77	28.95±1.51
187	21.10±1.19	34.64±1.42
189	19.54±0.42	30.21±0.69

Анализ данных цитопротекторной активности соединений **170**, **171**, **183**, **185**, **187** и **189** на культуре клеток нейробластомы IMR-32 при моделировании глутамат- (рис. 5, а) и H₂O₂-индуцированной (рис. 5, б) нейротоксичности показал, что протестированные соединения обладают способностью проявлять цитопротекторные эффекты, что выразалось в увеличении выживаемости клеток в обеих моделях. Поскольку эти модели нейротоксичности напрямую или опосредованно воспроизводят патологические каскады, связанные с окислительным стрессом, вероятно, наличие цитопротекторных свойств может быть связано с выявленными антиоксидантными свойствами исследуемых веществ.

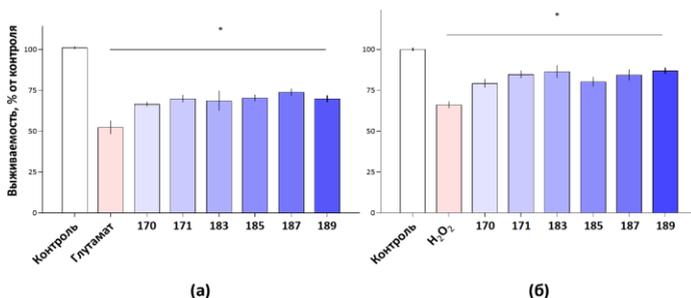


Рисунок 5.

Ряд нейродегенеративных заболеваний, различных по своей клинической картине, имеет сходный молекулярный механизм патогенеза, в основе которого лежит патологическая агрегация белков, приводящая к развитию протеинопатии. Нервные ткани пациентов с болезнью Альцгеймера содержат белковые агрегаты – β-амилоидные бляшки, образованные β-амилоидным пептидом (Aβ₁₋₄₂). В связи с этим способность препятствовать процессу агрегации Aβ₁₋₄₂ перспективным свойством потенциальных нейропротекторных агентов.

На рисунке 6 приведены кинетические кривые образования токсичных форм олигомеров под действием соединений, продемонстрировавших способность подавлять агрегацию патологического β-амилоидного пептида 1-42 (данные представлены в виде % агрегации β-амилоида относительно максимального значения флуоресценции Тиофлавина Т). Все исследуемые вещества обладали умеренной ингибирующей активностью, что выразалось в снижении флуоресценции тиофлавина Т в пробах, содержащих 100 мкМ исследуемых соединений. Так, процент активности соединений варьировался от 18.2% до 29.4%. Таким образом, полученные результаты выявили способность некоторых полученных производных замедлять агрегацию мономеров патологической формы β-амилоидного пептида 1-42 в токсичные конгломераты, при этом наиболее выраженными антиагрегационными свойствами обладало соединение **187**.

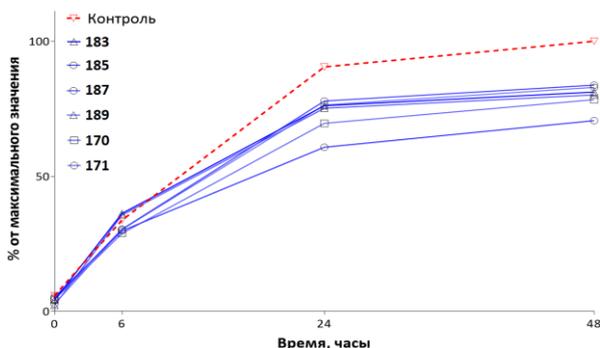


Рисунок 6.

Таким образом, вышеуказанные данные свидетельствуют о наличии мультитаргетного действия исследованных соединений на различные молекулярные мишени, участвующие в патогенезе болезни Альцгеймера. Этот эффект реализуется за счёт способности препятствовать агрегации патологических форм β -амилоидного пептида и подавлять процессы, связанные с окислительным стрессом. При этом, среди протестированных производных более выраженными свойствами как ингибировать процесс ПОЛ, так и подавлять агрегацию β -амилоида обладает соединение **187**, имеющее в своем составе 1-адамантильный остов и меркаптоацетамидный фрагмент.

Заключение

1. Показана возможность синтеза 1-адамантилсодержащих 3-тиопроизводных 1,2,4-триазолов, *N*-ацилзамещенных 1,2,4-триазолин-3-тионов и 6,7-дигидро-5*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазинов, имеющих в своем составе монотерпеновые фрагменты различной структуры. Разработан метод получения новых 5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*][1,3,5]тиадиазепин-7(8*H*)-онов с монотерпеновыми заместителями в 6-ом положении.

2. Обнаружено, что взаимодействие 5-(1-адамантил)-1,2,4-триазолин-3-тиона с монотерпеновыми α,β -непредельными карбоновыми кислотами в этилацетате при 75°C в присутствии циклоангидрида пропанфосфоновой кислоты сопровождается протеканием внутримолекулярной реакции *thia*-Михаэля с образованием циклических аддуктов. Показано, что состав реакционной смеси определяется термодинамической стабильностью образующихся продуктов в условиях обратимости протекания реакции.

3. Впервые предложен дизайн и осуществлен синтез потенциальных нейропротекторных агентов, содержащих в качестве линкера монотерпеновый остаток и имеющих адамантилзамещенные триазольные фрагменты, а также гидроксаматную/меркаптоацетамидную цинк-связывающие группы. Найдено, что

полученные соединения обладают цитопротекторными свойствами, способностью ингибировать сумаолирование гистоновых деацетилаз и процесс перекисного окисления липидов, а также подавлять агрегацию β -амилоида.

4. Выявлено, что влияние на активность полученных соединений в отношении TDP1 оказывают как гетероциклическое ядро, так и структура монотерпенового фрагмента, причем наиболее активными оказались 1,2,4-триазоло-3-тиольные производные с монотерпеновым ациклическим фрагментом в 3-ем положении. Показано, что комбинация топотекана с 1,2,4-триазолом, содержащим (+)-камфоленовый остаток, снижает полумаксимальную цитотоксическую концентрацию топотекана на клетки HeLa в 4 раза, при этом уменьшая его токсическое воздействие на условно нормальные клетки НЕК293А, что делает его перспективным кандидатом для дальнейших *in vivo* исследований.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Munkuev, A.A.**, Mozhaitsev, E.S., Chepanova, A.A., Suslov, E. V., Korchagina, D. V., Zakharova, O.D., Ilina, E.S., Dyrkheeva, N.S., Zakharenko, A.L., Reynisson, J., Volcho, K.P., Salakhutdinov, N.F., Lavrik, O.I. Novel TDP1 Inhibitors Based on Adamantane Connected with Monoterpene Moieties via Heterocyclic Fragments // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – N. 11. – P. 3128.
2. **Munkuev, A.A.**, Dyrkheeva, N.S., Kornienko, T.E., Ilina, E.S., Ivankin, D.I., Suslov, E. V., Korchagina, D. V., Gatilov, Y. V., Zakharenko, A.L., Malakhova, A.A., Reynisson, J., Volcho, K.P., Salakhutdinov, N.F., Lavrik, O.I. Adamantane-Monoterpenoid Conjugates Linked via Heterocyclic Linkers Enhance the Cytotoxic Effect of Topotecan // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – N. 11. – P. 3374.
3. **А.А. Мункуев**, А.Ж. Шешковас, Е.В. Суслов, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов. Оптимизация метода синтеза 2-адамantanкарбоновой кислоты // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2022. – Т. 30. – N. 6. – С. 632-636.
4. **А.А. Мункуев**. Синтез и модификация адамантильных производных 1,2,4-триазолов и 1,3,4-тиадиазолов. В книге: *Химия материалы 57-й Международной научной студенческой конференции*. Новосибирск, 2019. С. 51. (устный доклад).
5. **А.А. Мункуев**, А.Л. Захаренко, Е.В. Суслов, А.А. Чепанова, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Ингибиторы TDP1 на основе производных адамантана, содержащих монотерпеноидный и гетероциклический фрагменты В сборнике: *Химия и химическая технология в XXI веке. Материалы XXII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 125-летию со дня основания Томского политехнического университета*. В 2-х томах. Томск, 2021. С. 219-220. (устный доклад).
6. **А.А. Мункуев**, А.Л. Захаренко, Е.В. Суслов, А.А. Чепанова, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Адамантилсодержащие производные 1,2,4-триазола и 1,3,4-тиадиазола: Синтез и модификация. Сборник тезисов Первой всероссийской школы по медицинской химии для молодых ученых. Новосибирск, 4-9 июля 2021 г. С.103 (устный доклад)
7. **А.А. Мункуев**, А.Л. Захаренко, Е.В. Суслов, А.А. Чепанова, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Синтез гибридных соединений, сочетающих адамантановый,

гетероциклический и монотерпеноидный фрагменты Сборник тезисов Всероссийской научной конференции "Современные проблемы органической химии", Новосибирск, 09-11 июня 2021 г. С. 95 (устный доклад)

8. **A. Munkuev**, A. Zakharenko, E. Suslov, A. Chepanova, K. Volcho, N. Salakhutdinov, O. Lavrik. Perspective TDP1 inhibitors based on adamantane, monoterpene and heterocyclic moieties. 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021», Волгоград, 16–19 мая, 2022 г. С. 327 (устный доклад)

9. **А.А. Мункуев**, Е.В. Суслов, К.П. Волчо, Ю.Р. Александрова, М.Е. Неганова. Синтез предшественников потенциальных агентов против болезни Альцгеймера на основе адамантана и монотерпенового фрагмента в качестве линкера. Сборник тезисов, СПОХ-2023, Новосибирск, 26-30 июня 2023 г. С. 82 (устный доклад)

10. **А.А. Мункуев**, Е.В. Суслов, А.Л. Захаренко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Синтез потенциальных ингибиторов TDP1 на основе аннелированных 1,2,4-триазолов, содержащих адамантановый и монотерпеновый фрагменты. Сборник тезисов, I Междисциплинарной всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: Биохимические и медицинские аспекты», Казань, 18 – 22.09. 2023 г. С. 97, О-32. (устный доклад).

Патент РФ:

Патент РФ 2 761 880 **А.А. Мункуев**, А.Л. Захаренко, Е.В. Суслов, А.А. Чепанова, К.П. Волчо, О.И. Лаврик, Н.Ф. Салахутдинов. Адамантилсодержащие производные 1,2,4-триазола и 1,3,4-тиадиазола, имеющие монотерпеноидные фрагменты, используемые в качестве ингибиторов фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1, по заявке № 2020120994 от 18.06.2020. Опубликовано: 13.12.2021. Бюл. № 35.