

На правах рукописи

Прима Дарья Олеговна

**НОВЫЕ АЗА-ГЕТЕРОЦИКЛЫ
НА ОСНОВЕ ПОЛИФТОРИРОВАННЫХ 1,2-ДИАМИНОАРЕНОВ:
СИНТЕЗ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА**

02.00.03 – органическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Новосибирск – 2019

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Дизайн и синтез новых веществ с заданными эффективными терапевтическими свойствами по отношению к социально-значимым заболеваниям – одна из наиболее актуальных проблем современной органической химии. В частности, необходимость специальной общенациональной программы борьбы с онкологическими заболеваниями отмечена в недавнем послании Президента РФ Федеральному собранию. Для химиотерапии онкологических заболеваний наиболее перспективны вещества, вызывающие апоптоз – то есть отличную от некроза генетически запрограммированную смерть раковых клеток.

В последнюю четверть века для создания потенциальных и / или реальных лекарств успешно применяются синтетические фторорганические соединения. В настоящее время 20 % всех лекарств на глобальном фармацевтическом рынке содержат фтор (примечательно, что немногочисленные природные фторорганические вещества токсичны для человека и животных).

В целом фторсодержащие соединения проявляют лучшую метаболическую стабильность и более эффективное проникновение через мембраны клеток, чем их нефторированные аналоги. На ранних этапах исследований основное внимание привлекали частично фторированные вещества, в последнее время большой интерес вызывают полифторированные соединения, в том числе ароматические. Важно, что органические производные других галогенов, включая смешанные (одновременно содержащие, например, атомы F и Cl), также перспективны для их применения в медицине.

Обычно фторсодержащие соединения для биомедицинских применений получают прямым фторированием углеводородных производных. В целом, этот способ малоэффективен так как отличается низкой селективностью и требует больших затрат как временных, так и материальных ресурсов. Альтернативой может быть селективное дефторирование сравнительно легко доступных полифторированных соединений.

В углеводородном ряду большую группу биологически активных веществ образуют аза-гетероциклы – производные 1,2-диаминобензолов: 1,3-бензодиазолы (бензимидазолы), 1,2,3-бензотриазолы, 2,1,3-бензотиа(селена)диазолы, 1,4-бензодиазины (хиноксалины) и 1,5-бензодиазепины. Во фторуглеродном ряду эти вещества изучены сравнительно слабо, а их биологическая активность практически не исследована. В связи с этим тема настоящего исследования – «Новые аза-гетероциклы на основе полифторированных 1,2-диаминоаренов: синтез и некоторые свойства», несомненно,

актуальна. Целевые вещества исследования – бициклические $n-6$ и трициклические $n-6-n'$ системы, в которых 6 – фторированный бензольный цикл; а $n, n' = 5, 6, 7$ – 1,3-диазольный, 1,2,3-триазольный, 2,1,5-тиа(селена)дiazольный, 1,4-диазинный и 1,5-дiazепиновый циклы, включая гибридные системы ($n \neq n'$). Под «некоторыми свойствами», помимо химических, структурных и спектральных, понимается апоптозная противораковая активность этих веществ. Масштаб задачи таков, что ее полное решение, выходящее, конечно, далеко за рамки данного квалификационного исследования, приведет к созданию нового научного направления в фундаментальной органической химии и ее биомедицинских приложениях в области социально значимых заболеваний, в нашем случае – раковых.

Степень разработанности темы

Среди целевых фторсодержащих бициклических $n-6$ веществ относительно изучена химия лишь 2,1,3-бензотиа(селена)диазолов и 1,4-бензодиазинов. Остальные бициклические производные исследованы намного слабее, а трициклические $n-6-n'$ соединения до настоящей работы были неизвестны. Биологическая активность всех этих веществ фактически не изучалась. Таким образом, тема данного исследования разработана мало и, по сути, является новой и оригинальной.

Цели работы – синтез новых аза-гетероциклов на основе полифторированных 1,2-диаминоаренов и поиск среди них веществ с апоптозной противораковой активностью.

Научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость

Научная новизна работы заключается в синтезе ранее неизвестных химических соединений и установлении способности некоторых из них, а также ранее описанных родственных веществ, вызывать апоптоз раковых клеток. Научная новизна для собственно органической химии выражается в том, что синтезированы неизвестные прежде представители аза-гетероциклов – производных полифторированных 1,2-диаминоаренов, имеющих бициклическую структуру $6-n$, в которой 6 – полифторированное бензольное кольцо, $n = 5$ – 1,3-дiazольный, 1,2,3-триазольный и 1,2,5-тиа(селена)дiazольный циклы; $n = 6$ – 1,4-дiazинный цикл; $n = 7$ – 1,5-дiazепиновый цикл; а также, в ряде случаев, их полихлорированные и смешанные (содержащие одновременно атомы F и Cl) аналоги. Впервые синтезированы соединения, имеющие линейную или угловую трициклическую $n-6-n'$ структуру (смысл n, n' – тот же), включая гибридные вещества ($n \neq n'$). Впервые синтезировано аналогичное трициклическое $5-6-5'$ производное, в котором 5 – 1,3,2-диоксаборольный, а $5'$ – 1,2,5-тиадiazольный циклы. Впервые показана возможность в условиях реакции Бахвальда-Хартвига синтеза полифторированных 1,3-бензодиазолов непосредственно из полифторированных аминобензолов (анилинов). Научная новизна для

биомедицинских приложений органической химии состоит в том, что впервые обнаружена способность некоторых фторированных бензо-аннелированных аза-гетероциклов, в частности, 1,3-бензодиазолов, 1,2,3-бензотриазолов и 2,1,3-бензоселенадиазолов вызывать апоптоз клеток рака гортани Her2 (изучение трициклических соединений продолжается, выходя за рамки данной работы). При этом их цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам является низкой.

Основная теоретическая значимость работы для органической химии связана с дизайном и синтезом трициклических n - n' соединений ($n, n' =$ указанные выше 5-, 6- и 7-членные аза-гетероциклы), а также 1,3,2-диоксаборольного производного, представляющих новые гетероциклические системы. Для биомедицинских приложений органической химии она состоит в том, что обнаруженная способность изученных соединений вызывать апоптоз раковых клеток, причем не каспазным путем, на фоне их низкой цитотоксичности для нормальных клеток, может использоваться для дизайна новых противораковых средств. Диоксаборольные производные могут применяться в дизайне новых средств, пригодных одновременно как для химио-, так и для радиотерапии рака.

Практическая значимость выполненного исследования заключается в разработке новых синтетических протоколов, позволяющих получать в аналитически чистом виде различные полифторированные (а также полихлорированные и смешанные – содержащие одновременно атомы F и Cl) бензо-аннелированные аза-гетероциклы для дальнейшего изучения или применения. В частности, синтезированные производные с тиа(селена)диазольными циклами – крипто-формы ранее неизвестных ди- и тетра-аминов, имеющие очевидные перспективы применения в химическом синтезе. Молекулярные и кристаллические структуры 16 синтезированных соединений, установленные методом РСА, депонированы в Кембриджском центре структурных данных и могут использоваться как в химических, так и в биомедицинских исследованиях – в последнем случае при теоретическом изучении взаимодействия веществ с рецепторами с применением молекулярного докинга.

Методология и методы исследования

Подходы, использованные в настоящей работе, включают: молекулярный дизайн и химический синтез целевых соединений, и экспериментальное исследование их структурных и спектральных свойств и цитотоксичности по отношению к раковым и нормальным клеткам с особым вниманием к апоптозу раковых клеток. Оригинальная особенность химического синтеза: получение большой группы целевых соединений с

различными аза-гетероциклами из единственного исходного вещества – пентафторанилина.

Методы химического синтеза, примененные в данной работе, охватывают реакции конденсации и нуклеофильного замещения; молекулярного дизайна – компьютерное (*in silico*) моделирование взаимодействия субстрата и рецептора для сайта связывания домена PAS (структурно-подобного домену рецептора AhR, являющегося ключевым регулятором транскрипционной экспрессии цитохрома P450); установления строения синтезированных веществ – РСА, ЯМР, МС, ЭСП и ФЛ; определения чистоты синтезированных веществ – ЭА; изучения цитотоксичности и апоптозной активности – двойное ФЛ окрашивание; изучения механизма апоптоза – вестерн-блоттинг.

Данные подходы и методы полностью соответствуют целям и задачам исследования и гарантированно обеспечивают надежность получаемых результатов.

Положения, выносимые на защиту

В ходе научного исследования, синтезированы и полностью структурно охарактеризованы новые фторированные бициклические соединения – 1,3-бензодиазолы, 1,2,3-бензотриазолы, 2,1,3-бензотиа(селена)диазолы, 1,4-бензодиазины и 1,5-бензодиазепины и их хлорсодержащие (в ряде случаев – полихлорированные или одновременно имеющие атомы Cl и F) аналоги. Полифторированные 1,5-бензодиазепины до настоящей работы не были известны.

Выделены и охарактеризованы фторированные трициклические $n-6-n'$ соединения, включая гибридные ($n \neq n'$), как линейного, так и углового строения, в которых бензольный цикл аннелирован с различными аза-гетероциклами.

Показана общность подхода к синтезу гибридных фторсодержащих трициклических 5-6-5' соединений линейного строения, выходящая за рамки аза-гетероциклов – получено и структурно охарактеризовано соединение, бензольный цикл которого аннелирован с 1,3,2-диоксаборольным и 1,2,5-тиадиазольным циклами.

На примере полифторированных 1,3-бензодиазолов впервые показана применимость условий каталитической реакции Бахвальда-Хартвига для их синтеза непосредственно из полифторированных анилинов.

Доказано, что хлорирование элементарным хлором 2,1,3 бензотиа(селена)диазолов не приводит, как утверждалось ранее, к тетрахлор-производным – в реакции образуется сложная смесь продуктов, и она не имеет препаративного значения.

Показана связь строения фторированных аза-гетероциклов с их биологической активностью – в частности, способностью вызывать апоптоз раковых клеток. Найдено, что апоптозная активность соединений не связана с активированием каспаз.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов данной квалификационной работы обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических и биомедицинских методов исследования. Строение всех впервые синтезированных веществ доказано методами РСА, мультаядерной (^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{19}F , ^{77}Se) спектроскопии ЯМР, МС высокого разрешения, ЭСП и ФЛ спектроскопии. Чистота веществ подтверждена данными ЭА.

Достоверность результатов по цитотоксичности и апоптозной активности исследованных веществ по отношению к раковым клеткам независимо подтверждена другой исследовательской группой, наблюдавшей их на близкородственных соединениях уже после выхода наших публикаций: Yu, X.-H., Hong, X.-Q., Chen, W.-H., Fluorinated bisbenzimidazoles: a new class of drug-like anion-transporters with chloride-mediated, cell apoptosis-inducing activity // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2019. – V. 17. – P. 1558–1571. DOI: 10.1039/c8ob03036g.

По материалам исследования опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, а также тезисы 9 докладов (в том числе – устных) на национальных и международных научных конференциях.

Соответствие специальности 02.00.03 – органическая химия

Диссертационная работа соответствует пункту 1 «Выделение и очистка новых соединений», пункту 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», пункту 7 «Выявление закономерностей типа «структура – свойство»» и пункту 8 «Моделирование структур и свойств биологически активных веществ» паспорта специальности 02.00.03 – органическая химия.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 58 схем, 17 рисунков и 3 таблицы. Она состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемых источников (178 наименований) и приложения на 16 страницах.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя заключается в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации и участии в разработке плана исследования. Лично автором осуществлены все химические эксперименты, включая выделение и очистку продуктов, и выращивание их монокристаллов для РСА; подготовлены образцы и выполнены все биомедицинские эксперименты по цитотоксичности, апоптозу и вестерн-блоттингу; обработаны и обсуждены полученные данные. Автор осуществлял подготовку

материалов к публикации в научных журналах, и представлял их в докладах на научных конференциях.

Основное содержание работы

Во **Введении** обоснована актуальность темы, определены цели и задачи исследования, охарактеризована научная новизна и практическая значимость работы, и сформулированы положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературных данных по основным методам синтеза аннелированных аза-гетероциклов – производных 1,2-диаминобензолов в углеводородном и фторуглеродном рядах, и биологическим свойствам полифторированных ароматических веществ, релевантным данной диссертации. На основании обзора сделано заключение о том, что направление исследований, вынесенное в название диссертации, является оригинальным, новым и актуальным.

Вторая глава – изложение и обсуждение собственных результатов автора по молекулярному дизайну и синтезу новых аза-гетероциклов – производных полифторированных 1,2-диаминбензолов; их (а также ранее известных родственных веществ) цитотоксической и апоптозной активности по отношению к нормальным и раковым клеткам; и возможному механизму апоптозного действия соединений на опухолевые клетки.

Третья глава – экспериментальная часть. В ней представлены данные по использованным материалам, оборудованию, методикам химических и биомедицинских экспериментов, условиям структурных и спектральных измерений. Приведены выходы веществ и их температуры плавления (кипения), данные РСА, спектроскопии ЯМР, МС, УФ. ФЛ и ИК, а также результаты элементного анализа.

В **Приложение** вынесены номенклатурные названия синтезированных новых соединений, и результаты компьютерного моделирования взаимодействия веществ с сайтом связывания фактора HIF2 с использованием молекулярного докинга.

Синтез аза-гетероциклов – производных полифторированных 1,2-диаминоаренов

Синтез 1,2-диаминобензолов и 2,1,3-бензотиа(селена)диазолов

Ключевые вещества для достижения синтетических целей данной работы в области бициклических производных – полифторированные 1,2-диаминобензолы, а в области трициклических – 5,6-диамино-2,1,3-бензотиа(селена)диазолы и некоторые другие функциональные производные.

Из тетрафторанилина **2**, полученного из пентафторанилина **1**, синтезированы новые тиadiaзол **3** и диамин **4** (Схема 1). Диамин **5** синтезирован восстановлением известного

селенадиазола **6** хлоридом олова (II) (Схема 2) и изолирован в виде гидрохлорида, что предотвращает его быстрое окисление на воздухе.

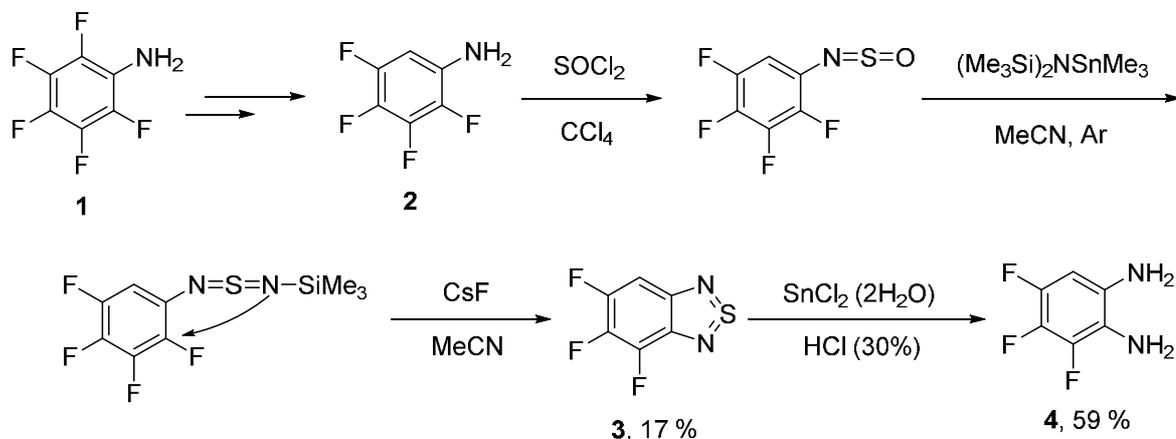


Схема 1. Синтез триадиазола **3** и диамина **4**.

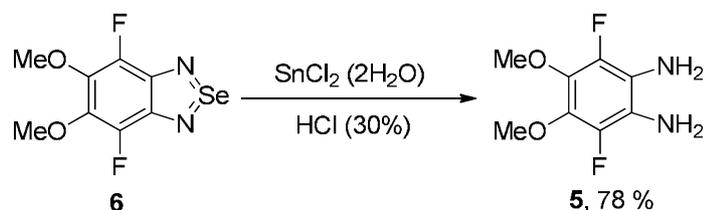


Схема 2. Синтез диамина **5**.

Триамин **7** получен восстановлением водородом соответствующего 2-нитроанилина и превращен в селенадиазол **8** действием диоксида селена (IV) в водном этаноле (Схема 3).

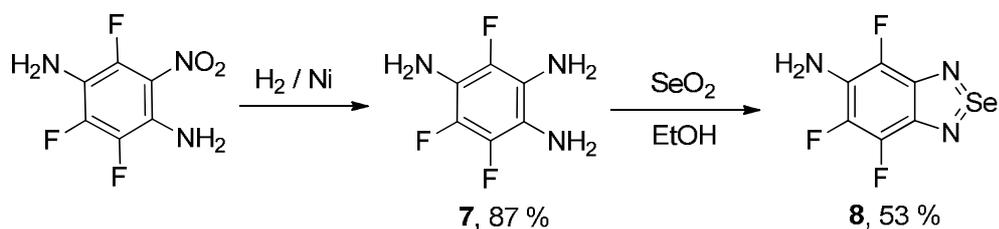
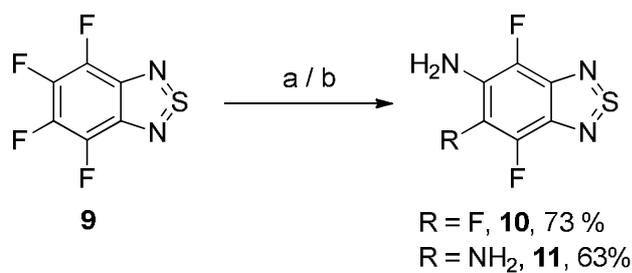


Схема 3. Синтез триамина **7** и селенадиазола **8**.

Аммонолизом полифторированных 2,1,3-бензотиа(селена)диазолов (**9** и **12**) получены их моно- (**10**) и ди- (**11** и **13**) амино-производные (Схема 4). Реакции проведены как в запаянной ампуле, так и в герметичной пробирке при использовании микроволнового излучения.



a: NH_3 , DMSO, b: NH_3 , EtOH, MW

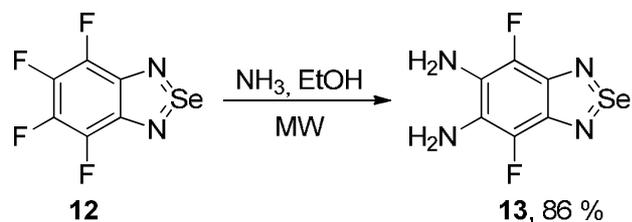


Схема 4. Синтез amino-производных **10-13**.

Наряду с группами NH_2 , полезными для синтеза целевых веществ являются группы OH . Ранее попытки прямого введения групп OH нуклеофильным замещением в бензотиа(селена)диазолах **9** и **12** были безуспешны даже в жестких условиях. Дигидрокси-производное бензотиадиазола **9** (соединение **15**) синтезировано деметилированием легко доступного диметокси-производного **14** (Схема 5).

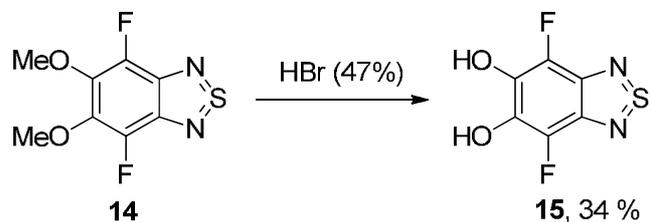


Схема 5. Синтез дигидрокси-замещенного триадиазола **15**.

Следует подчеркнуть, что функционализированные 2,1,3-бензотиа(селена)диазолы – крипто-формы соответствующих 1,2-диаминов, способных найти широкое применение в органическом синтезе.

Синтез 1,3-бензодиазолов

Целевые 1,3-бензодиазолы синтезированы несколькими методами. Соединения **24-28** – взаимодействием 1,2-диаминобензолов с карбоновыми кислотами по методу Филлипа (Схема 6). Выбор заместителей в циклах основан на известной фармакофорной активности и компьютерном моделировании взаимодействия веществ со связывающим

доменом PAS-B, структурно родственным фактору HIF2 и рецептору AhR, активирующему каспазный каскад.

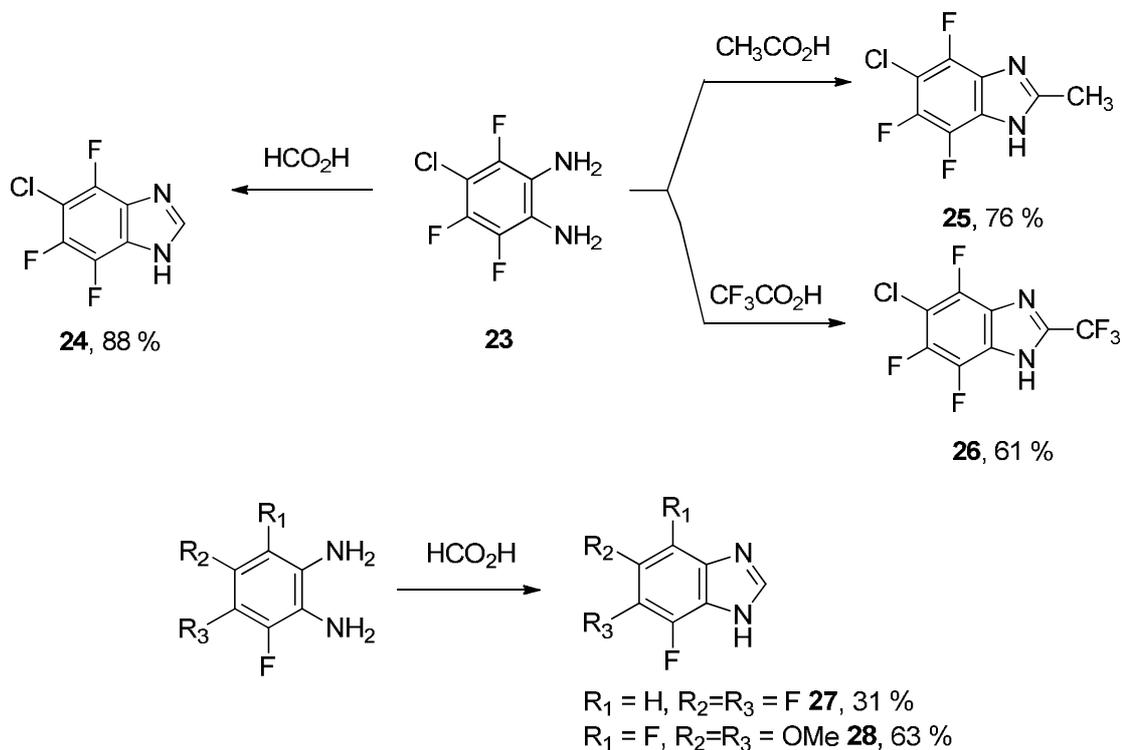


Схема 6. Синтез 1,3-дiazолов **24-28**.

1,3-Диазолы **29-32** синтезированы из диамина **22** и замещенных бензальдегидов. Соединение **34** получено ацилированием полифторированного архетипа **33** хлорангидридом 3-метокси-бензойной кислоты. Аналогичным ацилированием синтезирован 1,3-дiazол **35** с известным фармакофорным заместителем фторурацилом, подавляющим деление опухолевых клеток (Схема 7). Для синтеза 1,3-бензодиазола **36** впервые проведена внутримолекулярная циклизация в условиях каталитической реакции Бахвальда-Хартвига на полифторированном субстрате (Схема 8), катализатором был комплекс дихлорида палладия с *N*-гетероциклическим карбеном (1,3-бис[2,6-бис(пропан-2-ил)фенил]-1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-илиденом – NHC) и пиридином.¹ Таким образом, показана принципиальная применимость этого перспективного нового подхода, не требующего предварительной трансформации аминокислоты в 1,2-диаминоарен, к синтезу полифторированных 1,3-бензодиазолов.

¹ Этот результат получен автором под руководством чл.-корр. РАН В. П. Ананикова во время стажировки в его лаборатории в ИОХ РАН. Автор выражает В. П. Ананикову свою искреннюю благодарность.

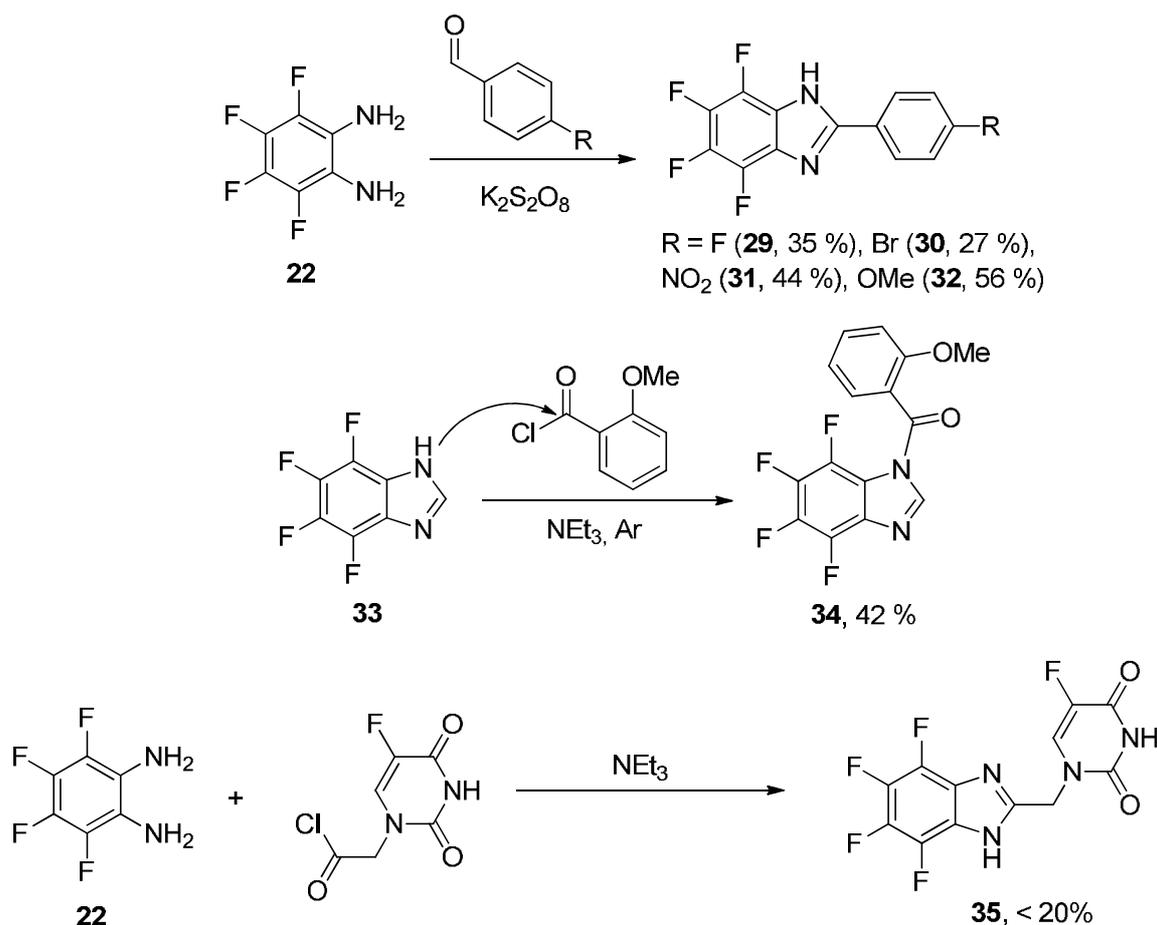


Схема 7. Синтез 1,3-дiazолов **30-32** и **34-35**.

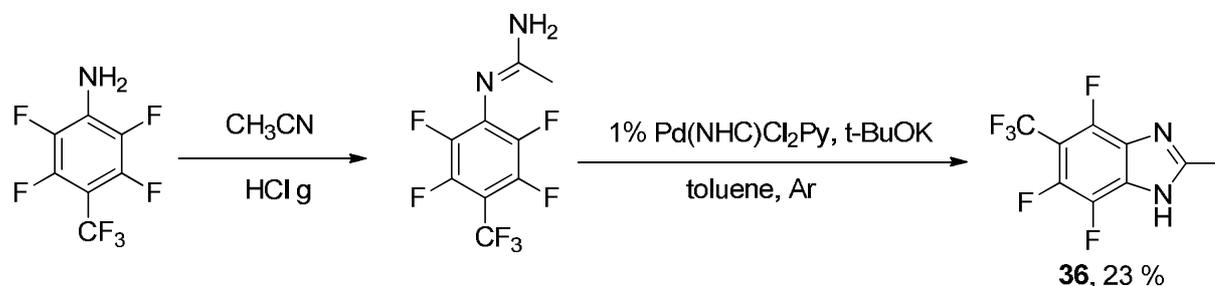


Схема 8. Синтез 1,3-дiazола **36** в условиях внутримолекулярной реакции Бахвальда-Хартвига.

Синтез 1,2,3-бензотриазолов

1,2,3-Бензотриазолы **38** и **39** синтезированы диазотированием соответствующих диаминов **23** и **5** нитритом натрия в уксусной кислоте, а **41** и **42** – бензоилированием полифторированного архетипа **40** хлорангидридами 2-замещенных бензойных кислот (Схема 9). Выбор заместителей в циклах основан на тех же соображениях, что и для 1,3-бензодиазолов.

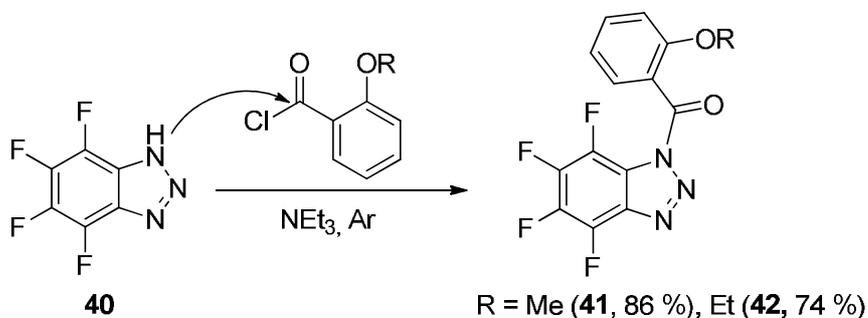
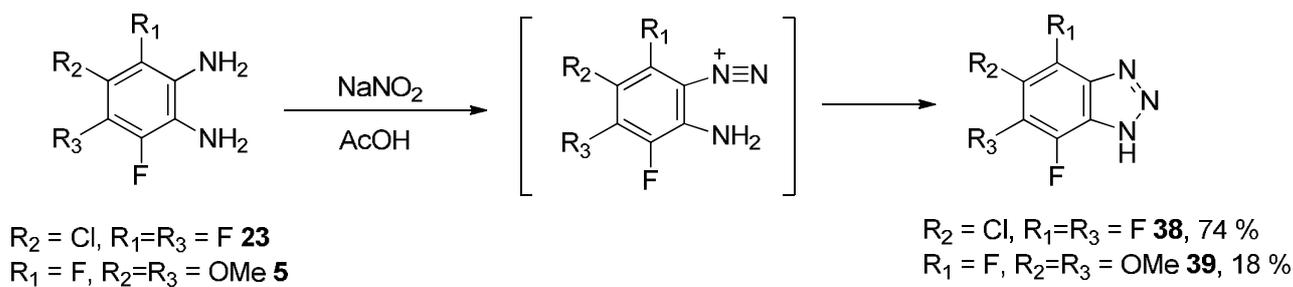


Схема 9. Синтез 1,2,3-триазолов **38-39** и **41, 42**.

Синтез 1,5-бензодиазепинов

1,5-Бензодиазепины хорошо известны в углеводородном ряду, однако до настоящей работы полифторированные 1,5-бензодиазепины известны не были. Соединения **44-46** синтезированы из диаминна **22** и замещенных 1,3-дикетонов (Схема 10).

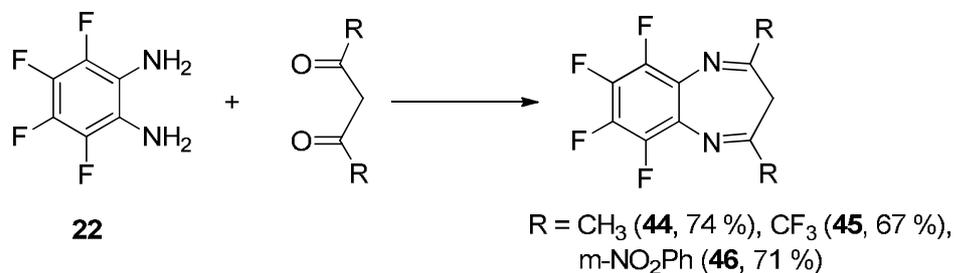


Схема 10. Синтез 1,5-дiazепинов **44-46**.

Полихлорированные аза-гетероциклы

Как отмечено выше, другие галогены, например, хлор – также перспективные модуляторы свойств биологически активных органических соединений. Восстановлением полихлорированного 1,2,3-бензотриазола **17** цинком в соляной кислоте получен 1,2-диаминобензол **18**, из которого синтезированы полихлорированные 1,3-дiazол **37**, 1,4-дiazин **43**, 1,2,5-тиадiazол **19** и 1,2,5-селенадiazол **20** (Схема 11).

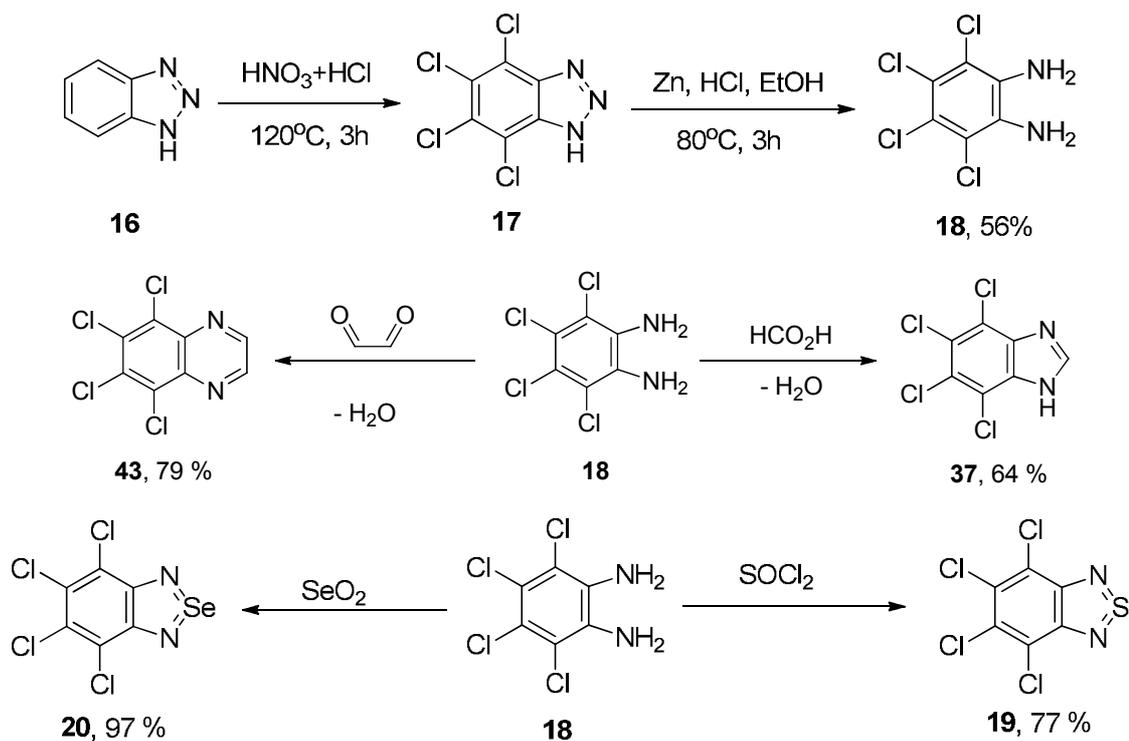


Схема 11. Синтез полихлорированных соединений **17**, **18-20** и **37**, **43**.

Априори привлекательный альтернативный подход, основанный на литературных данных о легком некаталитическом хлорировании 2,1,3-бензотиа(селена)диазолов элементарным хлором в соединения **19** и **20**, с их последующим восстановлением в диамин **18**, оказался неэффективным. В частности, вопреки утверждениям, хлорирование селенадиазола **21** элементарным хлором, некаталитическое и каталитическое, в различных условиях, типичных для гетаренов, приводит к сложным смесям продуктов (Схема 12, Таблица 1) и не имеет препаративного значения.

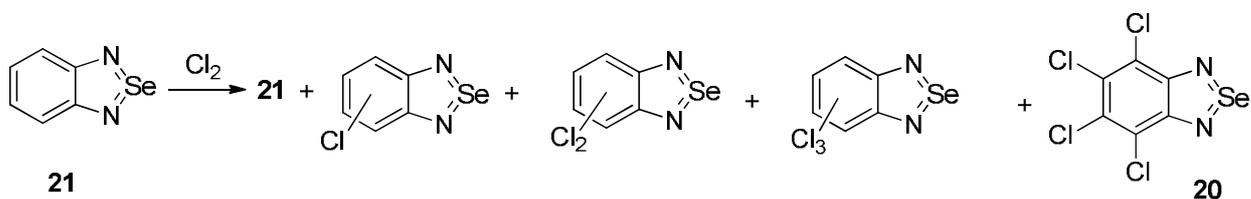


Схема 12. Взаимодействие селенадиазола **21** с элементарным хлором, приводящее к сложным смесям продуктов.

время, ч	Условия эксперимента			Состав смеси продуктов (ГХ-МС, %)				
	T, °C	растворитель	катализатор	21	1a	2a	3a	20
5	70	1,2-дихлорэтан	–	0	0	5.0	13.4	3.5
2	95	уксусная к-та	–	5.0	69.9	22.9	0	0
8	95	CCl ₄	–	0	3.5	9.1	6.0	3.0
6	90	CCl ₄	FeCl ₃	64.3	0	5.9	0	0
6	120	хлорбензол	ICl ₃	57.2	20.3	16.4	3.5	2.5
2	145	расплав	–	0	0	8.4	36.1	55.5

Таблица 1. Условия и результаты хлорирования соединения **21** элементарным хлором. Указано содержание только хлорсодержащих селенадиазолов, обнаруженных в смеси.

Трициклические соединения

Трициклические соединения линейного и углового строения, особенно гибридные – т.е. содержащие два разных аза-гетероцикла, аннелированных с фторированным бензольным кольцом, представляют особый интерес, поскольку от них можно ожидать синергизма биологической активности отдельных гетероциклов. За основу во всех случаях взяты 2,1,3-бензоселенадиазолы, поскольку к началу этого раздела работы уже было известно, что они – носители высокой апоптозной активности по отношению к раковым клеткам Her2.

Из аминоселенадиазола **8** синтезировано соединение **47**, одновременно содержащее тиа- и селенадиазольные циклы (Схема 13). Замыкание тиadiaзольного цикла на последней стадии прошло высоко региоселективно – в реакционной смеси не обнаружено никаких следов линейно аннелированного изомера.

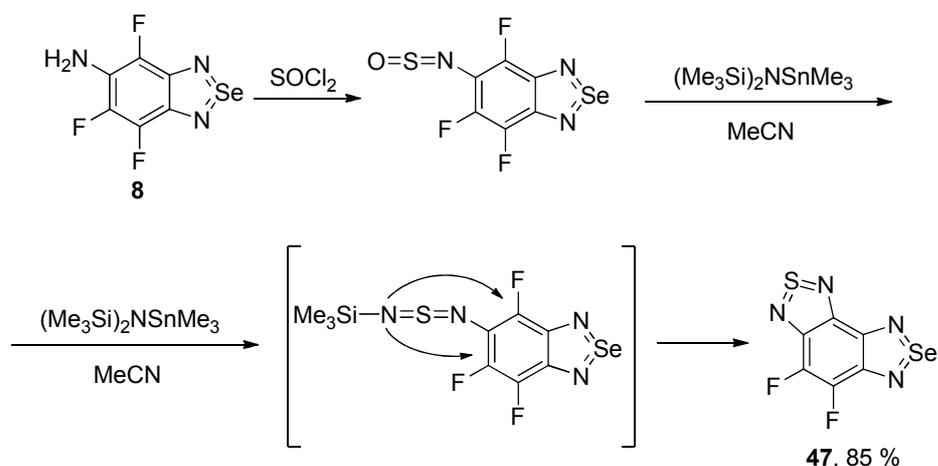


Схема 13. Синтез гибридного трициклического соединения **47**.

Линейно аннелированные гибридные соединения **48-52** синтезированы из диаминоселенадиазола **13** (Схема 14) с использованием методов, ранее примененных для получения бициклических веществ.

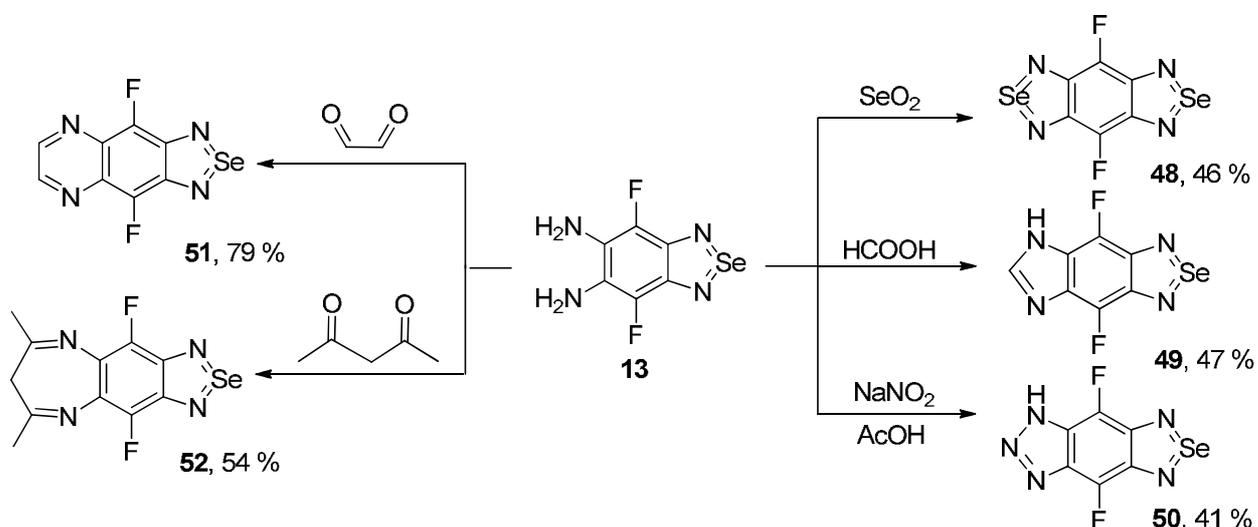


Схема 14. Синтез гибридных трициклических соединений **48-52**.

Предложенная и реализованная методология синтеза гибридных трициклических веществ является общей и, безусловно, не исчерпывается приведенными примерами. Для демонстрации ее возможностей из дигидрокситиадиазола **15** синтезировано гибридное соединение **53**, содержащее 1,2,5-тиадиазольный и 1,3,2-диоксаборольный циклы (Схема 15). Выбор последнего обусловлен перспективностью соединений бора в нейтроно- / протоно-захватной терапии рака.

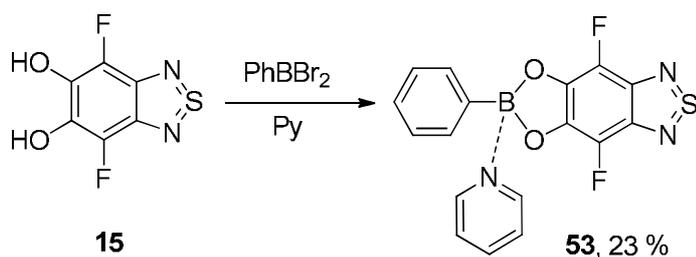


Схема 15. Синтез гибридного трициклического соединения **53**.

В целом по синтетической части работы следует подчеркнуть, что многие целевые соединения синтезированы фактически из единственного исходного вещества – пентафторанилина **1**. Таким образом, развита общая методология, объединяющая

фторароматическую и аза-гетероциклическую химию. Строение соединений **4**, **10**, **18-20**, **24**, **30-32**, **34**, **40**, **41**, **44**, **47**, **50** и **53** подтверждено РСА.

Цитотоксическая и апоптозная активность синтезированных соединений

Цитотоксичность синтезированных в настоящей работе соединений и их ранее полученных в НИОХ, но не исследованных в этом аспекте аналогов, изучена по отношению к нормальным клеткам и клеткам эпидермоидной карциномы гортани Her2.² При этой форме рака половина больных умирает в течение 5 лет после его диагноза, и положение не изменяется на протяжении нескольких последних декад. Хирургическое и радиационное лечение эпидермоидной карциномы гортани очень трудно. Крайне желательна медикаментозная терапия, основанная на апоптозе.

Для достижения цели использован одновременный многопараметровый анализ с применением витальных красителей Hoechst 33342 и иодид пропидия (PI), позволяющий различить и подсчитать живые, некротические и апоптозные клетки по их морфологии. В целом протестировано 29 соединений на клетках рака гортани Her2 и на нормальных клетках – иммортализованных фибробластах человека.³ Индекс селективности (отношение IC₅₀ соединения для нормальных клеток к его IC₅₀ для опухолевых) *in vitro* для 5-диметиламино-4,6,7-трифтор-2,1,3-бензотиадиазола **57** и 6-хлор-5,7,8-трифтор-1,4-бензодиазепина **63** составил 1.15-1.21; для 6-хлор-4,5,7-трифтор-1,3-бензодиазол-2-метила **25**, 4,5,6,7-тетрафтор-1,2,3-бензотриазола **40** и 5-диметиламино-4,6,7-трифтор-2,1,3-бензоселенадиазола **59** – 3.24-6.95, что сравнимо с такими индексами многих противоопухолевых препаратов.

Синтезированные аза-гетероциклы проявили сильную цитотоксичность и высокую апоптозную активность по отношению к клеткам рака гортани Her2. Их углеводородные аналоги такими свойствами не обладают.

² Все данные по биологической активности веществ получены лично автором под руководством к.б.н. Е. В. Воронцовой в ИМББ СО РАН. Автор выражает Е. В. Воронцовой свою искреннюю благодарность.

³ Данные по цитотоксичности веществ по отношению к нормальным клеткам по инициативе автора получены к.б.н. Т. С. Фроловой в ИЦиГ СО РАН. Автор выражает Т. С. Фроловой свою искреннюю благодарность.

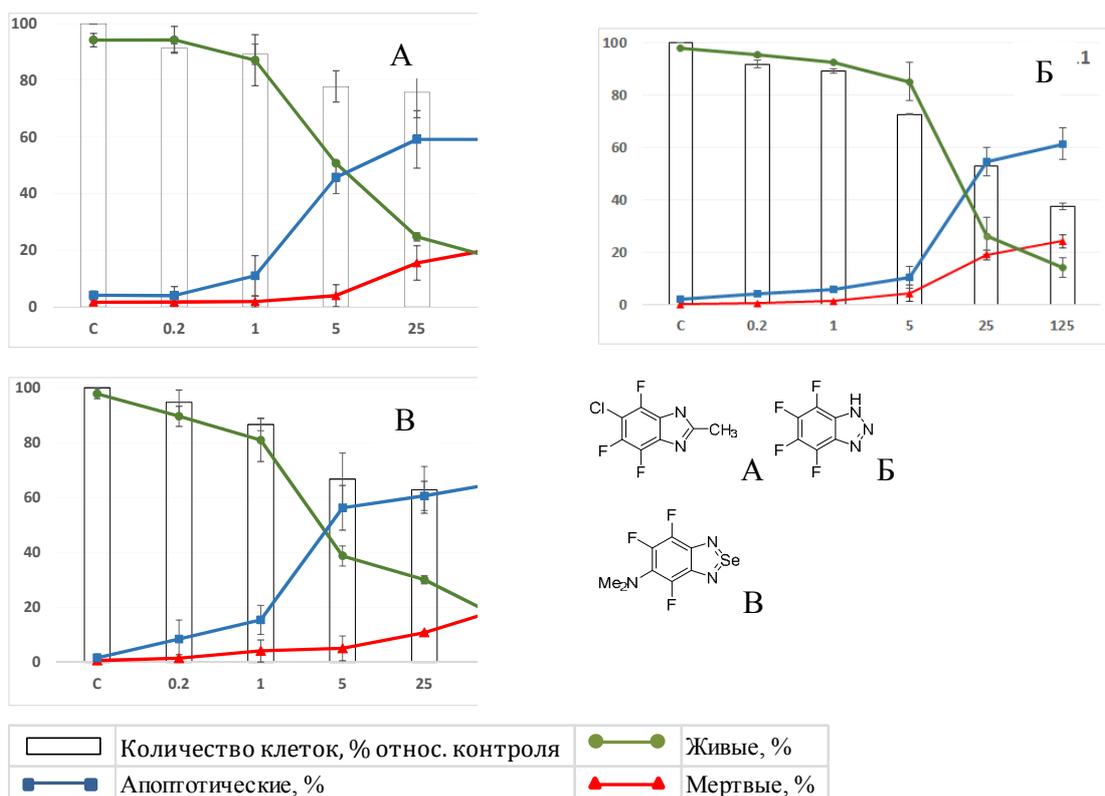


Рис. 1. Цитотоксичность и апоптотическая активность полифторированных азагетероциклов по отношению к клеткам Нер2. Ось y: живые, апоптотические и мертвые клетки; ось x: концентрация веществ (0.2-125 μM); С – контроль. Длительность обработки 48 ч, средние величины и стандартные отклонения определены по трем независимым экспериментам.

Цитотоксичность и апоптозная активность зависят от типа гетероцикла и характера замещения в нем и карбоцикле. В низких концентрациях наибольший эффект обнаружили диазолы, селенадиазолы и триазолы (рис. 1), с селенадиазолами гибель клеток наблюдалась уже в первые часы после начала эксперимента. Проникновение веществ в клетки контролировалось по их флуоресценции.

Исходные 1,2-диамины также вызывают апоптоз клеток Нер2, но менее эффективно, чем производные диазолы, селенадиазолы и триазолы. Общий цитотоксический эффект замыкания гетероцикла таков, что диазолы и триазолы более, а тиа(селена)диазолы и диазины менее, токсичны, чем исходные диамины; замыкание диазольного цикла производит больший целевой эффект, чем триазольного. В целом, аннелирование азагетероциклов с фторированным бензольным циклом в сочетании с замещением приводит к веществам с высокой цитотоксичностью и апоптозной активностью по отношению к раковым клеткам.

Достоверность результатов по цитотоксичности и апоптозной активности исследованных веществ по отношению к раковым клеткам независимо подтверждена другой исследовательской группой, наблюдавшей их на близкородственных соединениях уже после выхода наших публикаций.⁴

Предпринята предварительная попытка выяснить механизм обнаруженного апоптозного действия фторированных бензо-аннелированных аза-гетероциклов. На основании результатов компьютерного моделирования взаимодействия веществ со связывающим доменом PAS-B и данных по цитотоксичности и апоптозной активности для изучения были выбраны 1,3-диазолы **24**, **33**, **34**, 1,2,3-триазолы **38**, **40**, **41**, 1,5-диазепин **44** и гибридное трициклическое соединение **50**, содержащее 1,2,5-селенадиазольный и 1,2,3-триазольный циклы. Предполагалось, что они – активные инициаторы каспаз, за счет чего происходит запуск апоптоза. Указанные вещества протестированы посредством вестерн-блоттинга на клетках Саов-3 (опухоль яичника) и HeLa (опухоль шейки матки). Оценка клеточной гибели проведена по накоплению p89 PARP и образованию фрагментов p17/19 эффекторной каспазы-3, которые свидетельствуют о ее активации и, следовательно, протекании апоптоза. Найдено, что ни одно из протестированных соединений не вызывает каких-либо изменений в уровне связанных с апоптозом белков.⁵ Это означает, что либо механизм апоптоза не связан с его рецепторно-зависимой активацией, либо действие изученных веществ ассоциировано с определенными особенностями морфологии клеток.

В работе, указанной в сноске⁴, апоптозное действие полифторированных бис(1,3-бензодиазолов) сопоставлено с их способностью быть рецепторами анионов, в частности, хлорид-иона, играющего исключительно важную роль в регулировании смерти клеток, за счет образования прочных комплексов, связанных водородными связями. Это нарушает ионный транспорт и клеточный анионный гомеостаз, что ведет к апоптозу клеток. Фторирование органических веществ часто улучшает их способность к

⁴ Yu, X.-H., Hong, X.-Q., Chen, W.-H., Fluorinated bisbenzimidazoles: a new class of drug-like anion-transporters with chloride-mediated, cell apoptosis-inducing activity // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2019. – V. 17. – P. 1558–1571. DOI: 10.1039/c8ob03036g.

⁵ Все данные по биологической активности веществ получены лично автором под руководством к.б.н. Г. С. Копеевой в лаборатории д.б.н. проф. Б. Д. Животовского на ФФМ МГУ. Автор выражает Г. С. Копеевой и Б. Д. Животовскому свою искреннюю благодарность.

формированию комплексов с анионами – в том числе за счет повышения E–H кислотности (E = O, N, т.д.), благоприятствующей образованию водородно-связанных комплексов.

Очень вероятно, что апоптозное действие изученных в настоящей работе веществ связано именно с этим механизмом: из них наибольшую апоптозную цитотоксичность обнаружили именно вещества, способные образовывать комплексы с анионами – 1,3-бензодиазолы, 1,2,3-бензотриазолы и 2,1,3-бензоселенадизазолы; и не обнаружили 2,1,3-бензотиадизазолы и 1,4-бензодиазины, не способные к этому. Способность 1,3-бензодиазолов и 1,2,3-бензотриазолов к комплексообразованию с анионами A^- связана с формированием водородных связей $N^{\delta-}-H^{\delta+}\dots A^-$ (невозможным для 1,4-бензодиазинов и 1,5-бензодиазепинов), усиливающимися при увеличении кислотности атомов H при фторировании карбоцикла. Способность 2,1,3-бензоселенадизазолов к образованию комплексов с A^- ассоциирована с недавно обнаруженной в Лаборатории гетероциклических соединений НИОХ донорно-акцепторной координацией анионов (включая хлорид- и другие галогенид- и псевдогалогенид-ионы, т.д.) с атомом селена. Такая, еще более сильная, координация наблюдается для теллурадиазолов, и не наблюдается для тиадизазолов. Фторирование карбоцикла усиливает электроноакцепторную способность халькогенадизазолов. Гипотеза об анионно-транспортном механизме апоптозного действия изученных веществ, безусловно, заслуживает дальнейшего углубленного изучения.

Основные результаты и выводы

1. Синтезированы и структурно охарактеризованы новые фторированные бициклические соединения – 1,3-бензодиазолы, 1,2,3-бензотриазолы, 2,1,3-бензотиа(селена)дизазолы, 1,4-бензодиазины и 1,5-бензодиазепины и их хлорсодержащие (в ряде случаев – полихлорированные и содержащие атомы Cl и F одновременно) аналоги.

2. Впервые синтезированы и структурно охарактеризованы фторированные трициклические соединения линейного и углового строения, в которых бензольный фрагмент аннелирован с двумя различными аза-гетероциклами.

3. Впервые синтезировано и структурно охарактеризовано фторсодержащее трициклическое соединение линейного строения, в котором бензольный цикл аннелирован с 1,3,2-диоксаборольным и 1,2,5-тиадизазольным циклами.

4. Впервые показано, что условия каталитической реакции Бахвальда-Хартвига применимы к синтезу полифторированных 1,3-бензодиазолов непосредственно из полифторированных аминоаренов, что исключает необходимость их предварительной функционализации в 1,2-диаминоарены.

5. Предложен и реализован синтетический подход к 4,5,6,7-тетрахлор-2,1,3-бензотиа(селена)диазолам исходя из 2,1,3-бензотриазола. Показано, что прямое хлорирование 2,1,3-бензотиа(селена)диазолов неэффективно и препаративного значения не имеет.

6. Найдено, что фторированные аза-гетероциклы – 1,3-бензодиазолы, 1,2,3-бензотриазолы и 2,1,3-бензоселенадиазолы обладают высокой цитотоксичностью и апоптозной активностью по отношению к раковым клеткам, являясь малотоксичными для нормальных клеток. Установлено, что в отличие от этого, полифторированные 2,1,3-бензотиадиазолы и 1,4-бензодиазины существенной апоптозной активности не проявляют. Показано, что апоптозная активность соединений не связана с активированием каспаз.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Prima D.O.**, Vorontsova E.V., Makarov A.G., Makarov A.Yu., Bagryanskaya I.Yu., Mikhailovskaya T.F., Slizhov Yu.G., Zibarev A.V. Halogenated (F, Cl) 1,3-benzodiazoles, 1,2,3-benzotriazoles, 2,1,3-benzothia/selenadiazoles and 1,4-benzodiazines inducing Hep2 cell apoptosis // *Mendelevov Communications*. – 2017. – V. 27. – N. 5. – P. 439–442. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.09.002.
2. **Prima D.O.**, Baev D.S., Vorontsova E.V., Frolova T.S., Bagryanskaya I.Yu., Slizhov Yu.G., Tolstikova T.G., Makarov A.Yu., Zibarev A.V. New cancer cells apoptosis agents: fluorinated aza-heterocycles // *AIP Conference Proceedings*. – 2017. – V. 1882. – P. 020057-1–020057-4. DOI: 10.1063/1.5001636.
3. **Prima D.O.**, Makarov A.G., Bagryanskaya I.Yu., Kolesnikov A.E., Zargarova L.V., Baev D.S., Eliseeva T.F., Politanskaya L.V., Makarov A.Yu., Slizhov Yu.G., Zibarev A.V. Fluorine-containing n-6 and angular and linear n-6-n' (n, n' = 5, 6, 7) diaza-heterocyclic scaffolds assembled on benzene core in unified way // *ChemistrySelect* – 2019. – V. – 4. – N. 4. – P. 2383–2386. DOI: 10.1002/slct.03970.
4. **Prima D.O.**, Makarov A.G., Zibarev A.V. 18. Polyfluorinated 1,2-diaminobenzenes and derived aza-heterocycles for chemistry, materials science and biomedicine (P. 535-538), In: Polytanskaya L.V. et. al. *Organofluorine chemistry: promising growth areas and challenges* // *Russian Chemical Reviews* – 2019. – V. 88. – N. 5. – P. 425–569. DOI: 10.1070/RCR4871.

Результаты диссертации доложены на международных и всероссийских конференциях:

1. Прима Д.О., Зибарев А.В., Воронцова Е.В. Синтез новых аза-гетероциклов на основе полифторированных 1,2-диаминаренов. Химия и химическая технология в XXI веке: XVII международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулёва, посвященная 120-летию Томского политехнического университета (г. Томск, 2016 г.). – Материалы конференции, Томск: Изд-во ТПУ, 2016. – С. 184–185.
2. Прима Д.О., Воронцова Е.В., Виноградов А.С., Макаров А.Г., Макаров А.Ю., Зибарев А.В. Синтез новых галогенсодержащих аза-гетероциклов и изучение их противораковой активности. Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016» (г. Санкт-Петербург, пос. Репино, 2016 г.) – Тезисы докладов, СПб.: Изд-во ВВМ, 2016. – С. 183–184.
3. Prima D.O., Vorontsova E.V., Frolova T.S., Baev D.S., Slizhov Yu.G., Tolstikova T.G., Zibarev A.V. New cancer cells apoptosis agents: fluorinated aza-heterocycles. The International Conference «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical application» (Tomsk, Russia, 2017) – Abstracts, Tomsk: ISPMA SB RAS, 2017. – P. 37.
4. Прима Д.О., Воронцова Е.В., Баев Д.С., Фролова Т.С., Макаров А.Г., Макаров А.Ю., Толстикова Т.Г., Зибарев А.В. Синтез бензо-аннелированных полигалогенированных (F, Cl) ди- и триазолов и изучение их цитотоксической активности. Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, 2017). – Сборник тезисов, Новосибирск: Изд-во НИОХ СО РАН, 2017. – С. 114.
5. Прима Д.О., Воронцова Е.В., Баев Д.С., Фролова Т.С., Макаров А.Г., Макаров А.Ю., Толстикова Т.Г., Зибарев А.В. Полигалогенированные (F, Cl) аза-гетероциклы: синтез и изучение цитотоксичности. Международный юбилейный конгресс, посвященный 60-летию Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН «Фаворский-2017», включающий Школу молодых ученых (г. Иркутск, 2017). – Сборник тезисов докладов, Иркутск: Изд-во ИрИХ СО РАН, 2017. – С. 140.
6. Прима Д.О., Воронцова Е.В., Баев Д.С., Фролова Т.С., Макаров А.Г., Макаров А.Ю., Толстикова Т.Г., Зибарев А.В. Синтез и биологическая активность новых полифторированных бензо-аннелированных аза-гетероциклов. XX Молодежная школа-конференция по органической химии (г. Казань, 2017). – Сборник тезисов, Казань, 2017. – С. 57.

7. Prima D.O., Vorontsova E.V., Slizhov Yu.G., Zibarev A.V. An investigation of anticancer fluorinated aza-heterocycles. Chemistry Conference of Young Scientists 2018 ChemCYS (Blakenberge, Belgium, 2018). – Book of abstracts, Belgium, 2018. – P. 167.
8. Прима Д.О., Воронцова Е.В., Макаров А.Г., Макаров А.Ю., Зибарев А.В. Полифторированные трициклические системы. Всероссийская молодёжная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии» (пос. Шерегеш, Кемеровская обл., 2018). – Сборник тезисов, Новосибирск, 2018. – С. 157.
9. Прима Д.О., Багрянская И.Ю., Макаров А.Г., Елисеева Т.Ф., Зибарев А.В. Синтез линейных и ангулярных фторсодержащих аза-гетероциклических систем $n-6-n'$ ($n, n' = 5, 6, 7$), включая гибридные ($n \neq n'$). V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (г. Владикавказ, 2018). – Сборник тезисов, Владикавказ, 2018. – С. 218.

Благодарности

Автор искренне благодарна своему научному руководителю д.х.н. А. В. Зибареву за постановку задачи исследования и помощь в его выполнении; всему коллективу Лаборатории гетероциклических соединений НИОХ СО РАН – особенно к.х.н. А. Г. Макарову, к.х.н. Н. А. Семенову, д.х.н. А. Ю. Макарову, к.х.н. Т. Ф. Елисеевой (Михайловской) и В. П. Кривопалову – за полезные советы и помощь в работе; сотрудникам Лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН к.б.н. Д. С. Баеву и д.б.н. Т. Г. Толстиковой за компьютерное моделирование взаимодействия веществ с рецепторами, и к.б.н. Т. С. Фроловой за изучение цитотоксичности веществ по отношению к нормальным клеткам, и обсуждение полученных результатов; сотрудникам Центра спектральных исследований НИОХ СО РАН за измерения спектров ЯМР, МС, ЭСП и ФЛ, и особенно д.х.н. И. Ю. Багрянской за РСА синтезированных веществ; сотрудникам Лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН за ЭА синтезированных веществ; к.б.н. Е. В. Воронцовой (ИМББ СО РАН) за обучение работе с клеточными культурами, включая изучение цитотоксичности и апоптоза, и обсуждение полученных результатов; к.б.н. Г. С. Копееной и д.б.н. проф. Б. Д. Животовскому (ФФМ МГУ) за обучение методам вестерн-блоттинга в определении механизма апоптоза и обсуждение полученных результатов; д.х.н. В. В. Бардину (НИОХ СО РАН) за консультации по химии и спектроскопии ЯМР борорганических соединений; чл.-корр. РАН В. П. Ананикову (ИОХ РАН) за возможность стажировки в его Лаборатории и обучение новым методам каталитического синтеза.