

На правах рукописи



Цыпышев Дмитрий Олегович

**МОНОТЕРПЕН-КУМАРИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ, СОЕДИНЕННЫЕ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ ЛИНКЕРОМ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ**

1.4.3. Органическая химия

1.4.16. Медицинская химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Новосибирск – 2025

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: Волчо Константин Петрович

Профессор РАН, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: Аксенов Николай Александрович

Профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой органической химии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь

Хлебникова Татьяна Борисовна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела тонкого органического синтеза, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук» (ИК СО РАН), г. Новосибирск

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится «21» ноября 2025 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 «02» октября 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Патрушев С.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Природные соединения растительного происхождения традиционно применяются в народной медицине в виде экстрактов, а также входят в состав многих лекарственных средств. Кумарины и монотерпены, получаемые из растительного сырья и других источников, являются важными исходными соединениями для разработки новых фармакологических агентов с широким спектром активности. Терапевтическое действие природных и синтетических кумаринов определяется их строением и периферийным дизайном: они обладают антикоагулянтной, противоопухолевой, противовоспалительной, противомикробной, противовирусной и противопаразитарной активностями, способны регулировать процессы метаболических патологий, а также функционирование центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Исследования зависимости биологической активности кумаринов и их синтетических производных от их строения в настоящее время активно развиваются. Пренилированные кумарины, в том числе сочетающие кумариновый и монотерпеновый фрагменты, проявляют противоопухолевую активность, а также обладают противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1, РСВ типа А и В, вируса гриппа А H1N1. Ранее в НИОХ СО РАН было продемонстрировано, что монотерпен-кумариновые конъюгаты являются эффективными ингибиторами фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1), важной мишени для противоопухолевой терапии, и способны блокировать репродукцию респираторно-синцитиального вируса (РСВ).

Согласно статистическим данным, смертность от онкологических заболеваний занимает второе место после болезней сердечно-сосудистой системы, а число пациентов с онкологическими диагнозами ежегодно растёт, что обуславливает неутешительный прогноз по заболеваемости раком, как в России, так и в мире. Несмотря на широкий перечень противоопухолевых средств, включая препараты, повреждающие ДНК раковых клеток, проблема их эффективности до сих пор остаётся нерешённой, в том числе из-за развития резистентности, например, вследствие повышенной активности систем репарации ДНК. Так, активность таких препаратов, как топотекан и иринотекан (ингибиторы топоизомеразы I), снижается из-за действия фермента TDP1, устраняющего эти повреждения, что снижает эффективность терапии.

В то же время острые респираторные вирусные инфекции являются основным жизнеугрожающим фактором для уязвимых пациентов – пожилых, детей и онкологических больных с пониженным иммунным статусом. У детей младше двух лет основной причиной тяжёлых ОРВИ с госпитализацией, особенно в сезон эпидемий, является инфекция дыхательных путей, вызванная РСВ. Эффективных методов лечения инфекции РСВ, а также этиотропных препаратов, не существует. Основные стратегии ограничиваются иммунизацией и симптоматической терапией.

Препарат рибавирин с широким спектром противовирусной активности активен и против РСВ, но не рекомендован к широкой клинической практике из-за недостаточной эффективности и высокого уровня токсичности. Принимая во внимание остроту описанных ситуаций, включая необходимость введения в клиническую практику эффективных (и одновременно лишенных перечисленных выше недостатков) противоопухолевых и противовирусных лекарственных средств, поиск и разработка новых фармакологических агентов – ингибиторов TDP1 и ингибиторов репродукции РСВ, в том числе, и на основе природных соединений, приобретают особую значимость.

Учитывая установленные ранее ингибирующие свойства в отношении TDP1 монотерпен-кумариновых конъюгатов, их противовирусную активность в отношении РСВ, а также обнаруженные ограничения перспектив их использования, связанные, в том числе, с их высокой липофильностью и низкой селективностью действия, разработка методов синтеза монотерпен-кумариновых конъюгатов нового типа, соединенных гетероциклическими линкерами (1,2,3-триазольным или изоксазольным), изучение их активности в отношении РСВ и способности ингибировать фермент TDP1, а также влияния природы гетероциклического линкера и строения монотерпенового и кумаринового фрагментов на биологическую активность, представляют актуальные и практически важные задачи.

Соответствие паспорту специальности. Тема и содержание диссертационной работы соответствуют паспорту специальности **1.4.3. Органическая химия**, а именно – пунктам **1** «Выделение и очистка новых соединений», **3** «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», **7** «Выявление закономерностей типа «структура – свойство». Паспорту специальности **1.4.16. Медицинская химия**, а именно – пункту **1** «Поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров – потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе а) знания структурных параметров биомишени или особенностей патогенеза; б) анализа и модификации структур известных активных соединений; в) синтеза и биологического тестирования широкого разнообразия химических соединений».

Цель исследования: синтез новых потенциальных ингибиторов репродукции респираторно-синцитиального вируса (РСВ) и фермента репарации ДНК (TDP1) на основе кумаринов и функционализированных монотерпенов, соединенных посредством гетероциклического линкера.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. синтез стартовых 7-гидроксикумариновых блоков и их пропаргильных эфиров;
2. синтез азидов и оксимов терпенового ряда – исходных соединений для диполярного [3+2] - циклоприсоединения азидов и нитрилоксидов к алкинам;
3. синтез конъюгатов пропаргильных эфиров кумаринов с терпенами, связанных посредством 1,2,3-триазольного линкера;
4. синтез конъюгатов пропаргильных эфиров кумаринов с терпенами, связанных посредством изоксазольного линкера;

5. выявление взаимосвязей «структура синтезированного соединения – противовирусная/ ингибирующая в отношении TDP1 активность».

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Впервые синтезированы монотерпен-кумариновые конъюгаты, соединённые 1,2,3-триазольными и изоксазольными гетероциклическими линкерами. Показано, что синтез изоксазол-связанных конъюгатов посредством [3+2]-диполярного циклоприсоединения с приемлемыми выходами возможен в случае оксимов бициклических или ароматических монотерпенов, а для оксимов ациклических терпенов реализован альтернативный маршрут синтеза, включающий стадию получения 5-хлорметилизоксазольных производных ациклических терпенов с последующим их присоединением к модифицированным 7-гидроксикумаринам.

В ходе биологических исследований выявлено, что синтезированные монотерпен-кумариновые конъюгаты с триазольными линкерами проявляют выраженную противовирусную активность *in vitro* в отношении РСВ, демонстрируя высокие индексы селективности (SI, отношение цитотоксичной концентрации к активной) и действуя на ранней стадии заражения. Среди синтезированных производных найдены наиболее перспективные – триазол-связанные конъюгаты 3-гидрокси-7,8,9,10-тетрагидро-6*H*-бензо[*c*]хромен-6-она и 7-гидрокси-2,3-дигидроциклопента[*c*]хромен-4(1*H*)-она с 3,7-диметилокта-2,6-диенильным и 3,7-диметилоктильным фрагментами, (индексы селективности 605 (PCB A) и 1147 (PCB B), соответственно). Методом молекулярного моделирования показано, что снижение значений IC₅₀ (от 4 до 57 раз) в случае с 7-гидрокси-3,7-диметилоктильными конъюгатами может быть обусловлено образованием дополнительных водородных связей с аминокислотой Ser398 активного сайта белка F РСВ.

Установлено, что изоксазол-связанные кумарин-монотерпеновые конъюгаты ингибируют активность фермента TDP1 в субмикромольном и нижнем микромольном диапазоне концентраций. Показано, что три соединения – триазол-связанные конъюгаты 7-гидрокси-2,3-дигидроциклопента[*c*]хромен-4(1*H*)-она с 3,7-диметилокта-2,6-диенильным и 7-гидрокси-4-(4-метоксифенил)-2*H*-хроменона с 3,7-диметилоктильным фрагментами, а также изоксазол-связанный конъюгат 7-гидрокси-4-фенил-2*H*-хроменона с 6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-еновым (пиненовым) фрагментом увеличивают эффективность топотекана в отношении опухолевых клеток HeLa, усиливая его цитотоксический эффект, что подтверждает потенциал синтезированных соединений в качестве компонентов комбинированной противоопухолевой терапии. Анализ взаимосвязи «структура-активность» выявил, что природа линкера и монотерпенового остатка существенно влияют на биологические свойства соединений: конъюгаты с триазольным линкером проявляют выраженные анти-PCB свойства, а с изоксазольным – TDP1 ингибирующую активность.

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, и масс-спектрометрия, включая масс-спектрометрию высокого разрешения. Также для полученных соединений определялись удельное вращение и температура плавления.

Положения, выносимые на защиту:

синтез библиотек кумарин-терпеновых конъюгатов, связанных 1,2,3-триазольным линкером;

синтез библиотек кумарин-терпеновых конъюгатов, связанных изоксазольным линкером;

взаимосвязь «структура-противовирусная активность» в ряду кумарин-терпеновых конъюгатов;

взаимосвязь «структура-ингибирующая активность относительно фермента TDP1» в ряду кумарин-терпеновых конъюгатов.

Степень достоверности обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических методов установления строения полученных соединений. Структура соединений подтверждена данными ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии, в том числе с применением двумерных корреляционных спектров, масс-спектрометрии высокого разрешения, данными рентгеноструктурного анализа для некоторых соединений, чистота подтверждена данными ВЭЖХ. Достоверность результатов подтверждается независимой экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых Web of Science и Scopus, получен 1 патент, опубликованы тезисы 7 докладов на конференциях. Результаты работы представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии», Новосибирск, 12-14 сентября 2022 г; Марковниковских чтениях, Сочи, 16-21 сентября 2022 г; XXIV Международной конференции «Химия и химическая технология в XXI веке», Новосибирск, 15-19 мая 2023 г; Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии», Новосибирск, 26-30 июня 2023 г; Российской конференции «МедХим-Россия 2024», г. Нижний Новгород, 01-04 июля 2024 г; Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке», г. Томск, 20-24 мая 2024 г; Всероссийской конференции «VI Всероссийская конференция по органической химии», Москва, 23-27 сент. 2024 г.

Личный вклад соискателя. Результаты, представленные в работе, получены автором или при его непосредственном участии. Личный вклад автора состоит в

проведении экспериментов по синтезу стартовых кумаринов, производных монотерпеноидов, синтезе конъюгатов «кумарин-монотерпен», связанных 1,2,3-триазольными и изоксазольными линкерами, молекулярном моделировании взаимодействия части синтезированных соединений с активными сайтами белка F RCB и фермента TDP1, обработке экспериментальных результатов, анализе и интерпретации полученных данных, а также в подготовке научных статей к публикации, тезисов к докладам на конференциях (апробация работы) и в написании диссертационной работы. Работа выполнена в рамках государственного задания НИОХ СО РАН: (FWUE-2022-0007) и поддержана РНФ, проекты № 24-13-00134 (с 2024 по 2026) и № 21-13-00026 (с 2021 по 2023).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность руководителю Отдела медицинской химии НИОХ СО РАН члену-корреспонденту РАН, д-ру хим. наук, проф. Салахутдинову Н.Ф. и главному научному сотруднику Лаборатории физиологически активных веществ д-ру хим. наук, проф. РАН Волчо К.П. за предоставленную возможность профессиональной реализации в области медицинской химии и необходимые в процессе выполнения диссертационного исследования консультации.

Автор благодарит всех сотрудников центра спектральных исследований НИОХ СО РАН за регистрацию и предоставление физико-химических экспериментальных данных. Также особую признательность автор выражает коллективу лаборатории биоорганической химии ферментов (заведующая лабораторией – Лаврик О.И., академик РАН, профессор, д-р. хим. наук) Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и канд. хим. наук Захаренко А.Л., за проведение скрининга противоопухолевой активности синтезированных соединений, коллективу лаборатории химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа им. Смородинцева под руководством канд. биол. наук Штро А.А. за оценку противовирусной активности синтезированных соединений, ведущему научному сотруднику лаборатории химической физики УФИХ УФИЦ РАН д-ру хим. наук Борисевич С.С. за проведение *in silico* исследований части синтезированных соединений и помощь в их интерпретации, канд. хим. наук Хоменко Т.М. за помощь в постановке экспериментов, вед. инженера Комаровой Н.И. за проведение анализа синтезированных соединений методом ВЭЖХ, а также всему коллективу Лаборатории физиологически активных веществ за постоянную помощь и поддержку.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 146 страницах и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка литературы (153 источника).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертации, определены цель и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Глава «Литературный обзор» посвящена анализу современных данных о природных источниках, методах синтеза и биологической активности пренилированных кумаринов, включая их противоопухолевые и противовирусные свойства. В главе «Обсуждение результатов» представлены результаты синтеза новых монотерпен-кумариновых конъюгатов с 1,2,3-триазольными и изоксазольными линкерами, и изучения биологических свойств в отношении РСВ и фермента TDP1. Проведён анализ взаимосвязей «структура–активность», в том числе, *in silico* методами. В «Экспериментальной части» описаны методики синтеза исходных соединений и целевых конъюгатов, а также представлены данные физико-химических методов анализа, подтверждающие строение и чистоту синтезированных соединений.

1. Синтез триазол-связанных монотерпен-кумариновых конъюгатов

Учитывая обнаружение ингибиторов TDP1 и ингибиторов репродукции РСВ среди соединений, сочетающих монотерпеновый и кумариновый фрагменты (Рис. 1), синтез монотерпен-кумариновых конъюгатов нового типа, в которых две фармакофорные субъединицы связаны между собой 1,2,3-триазольным или изоксазольным линкерами (Рис. 1) с *in vitro* и *in silico* оценкой их анти-РСВ активности и способности ингибировать фермент репарации ДНК – TDP1, представляет собой вариант решения задачи по созданию новых средств терапии социально-значимых вирусных и онкологических заболеваний.

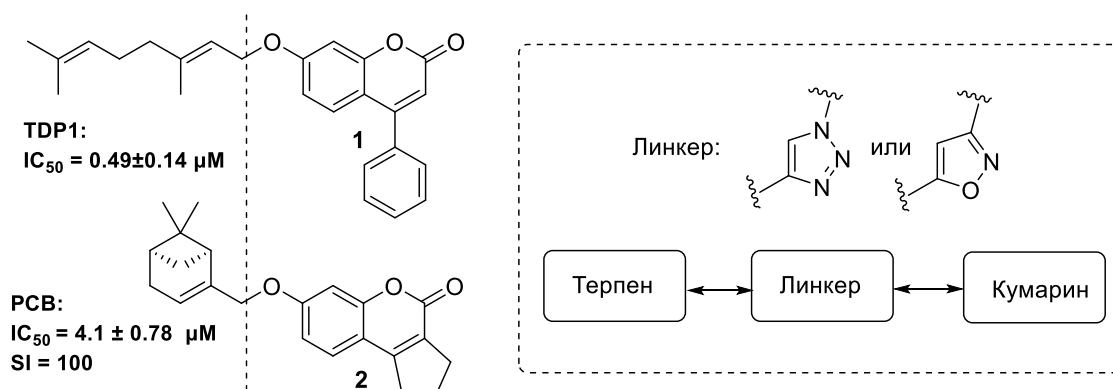


Рисунок 1 – Некоторые пренилированные кумарины, обладающие биологической активностью; дизайн новых кумарин-терпеновых конъюгатов.

Синтез библиотек триазол- и изоксазол-связанных кумарин-терпеновых конъюгатов на основе реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов и нитрилоксидов к алкинам включает следующие этапы: получение стартовых соединений (7-гидроксикумаринов, их пропаргиловых эфиров, азидов и оксимов

терпенового ряда) и собственно стадии конъюгации. Так, исходные кумариновые блоки **7-10** были получены из дикарбонильных соединений **3-6** по реакции Пехмана, и далее вовлекались в реакцию с пропаргилбромидом в этаноле в присутствии K_2CO_3 при кипячении. Выходы целевых эфиров **11-14** представлены на Схеме 1.

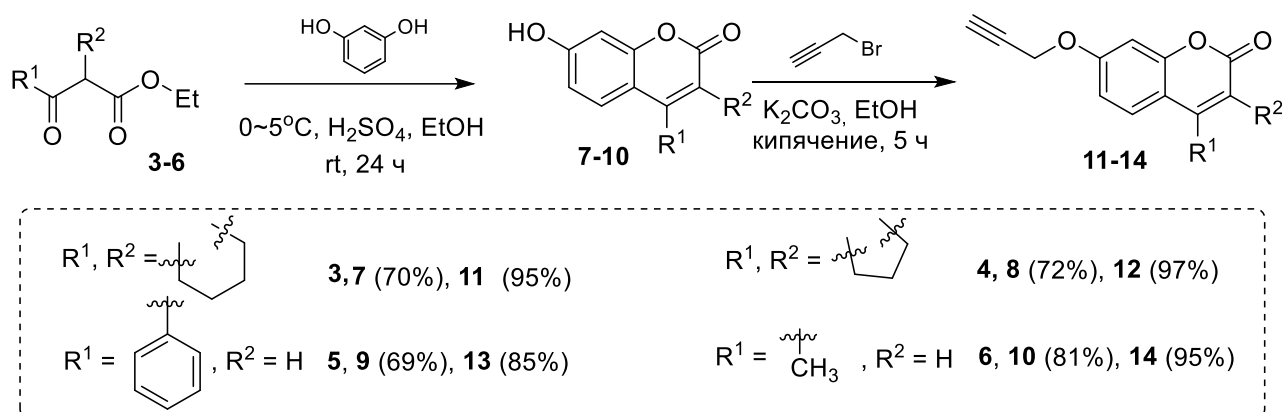


Схема 1

Синтетические маршруты превращений (+)- α -пинена **15**, (-)-миртеналя **16**, куминового альдегида **17**, гераниола **18** и дигидроцитронеллола **20** в терминальные азиды **24, 27, 30, 32** и **34**, включающие стадии окисления SeO_2 в присутствии *трет*-бутилгидропероксида, борогидридного восстановления, бромирования PBr_3 и ключевой стадии – азидирования бромидов **23, 26, 29, 31** и **33** действием NaN_3 в диметилформамиде, и выходы ключевых соединений **24, 27, 30, 32** и **34** представлены на Схеме 2.

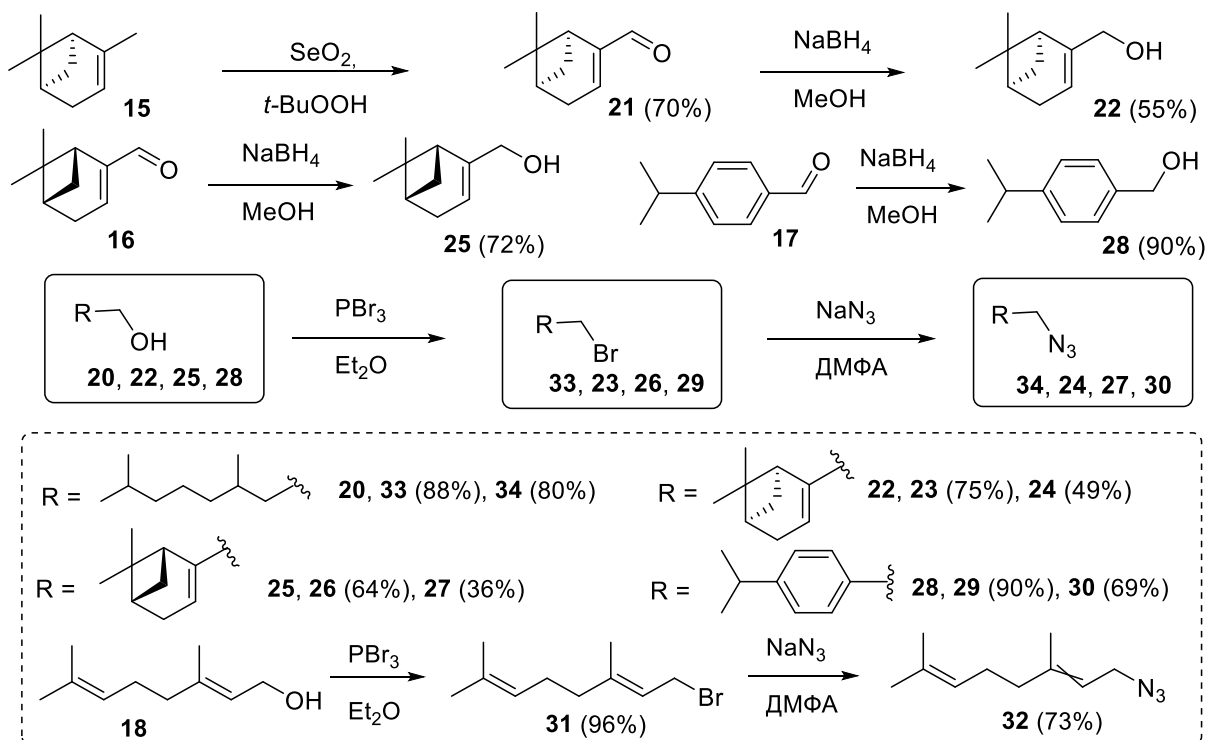


Схема 2

Триазол-содержащие конъюгаты пропаргиловых эфиров 7-гидроxicумаринов **35-54** синтезированы из азидов **24, 27, 30, 32** и **34** и пропаргиловых эфиров кумаринов **11-14** по известной методике [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения (клик-реакция) в смеси *трет*-бутанола и воды в присутствии сульфата меди (II) и аскорбата натрия. Триазолы **35-54** получены с выходами от 43 до 80% (Схема 3).

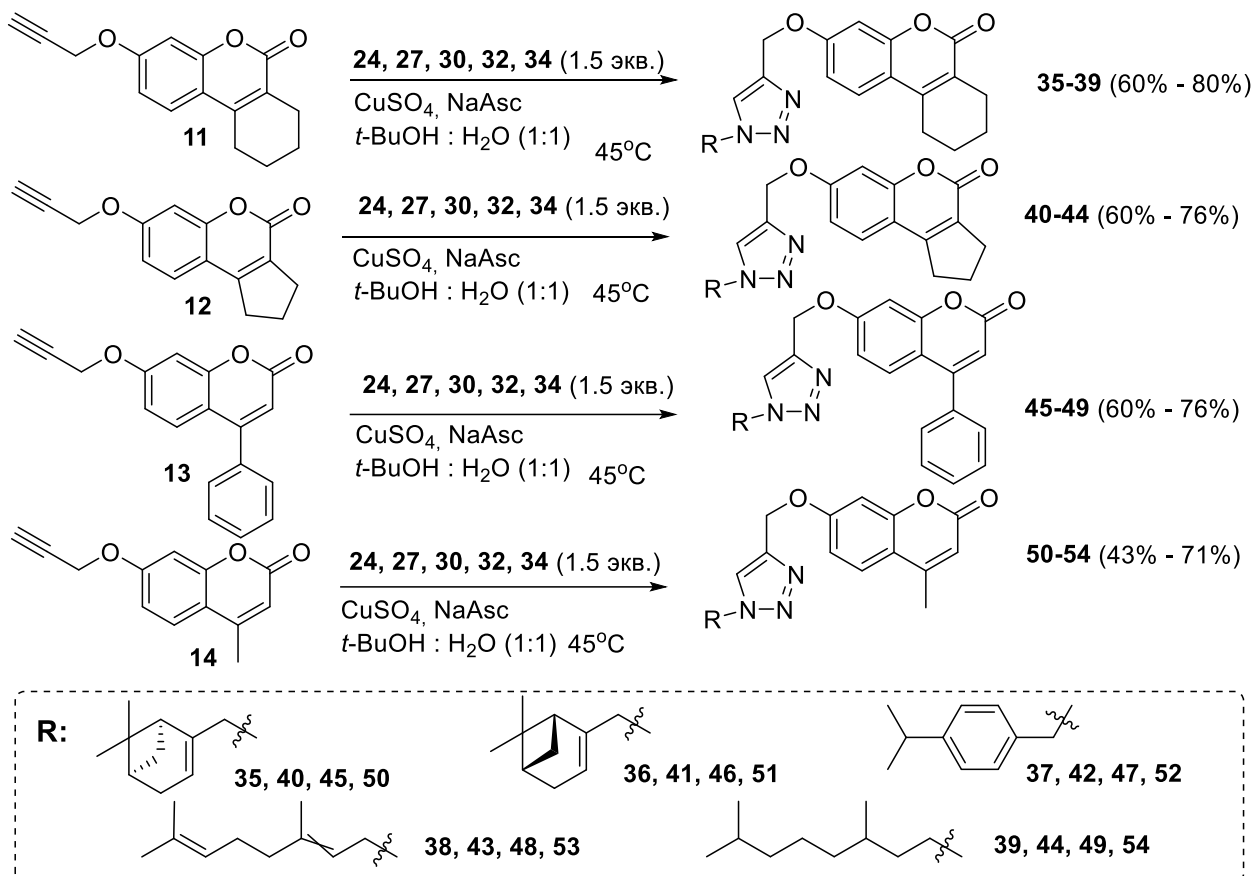


Схема 3

С целью введения дополнительных кислородсодержащих фрагментов, как в кумариновую, так и в терпеновую часть молекул конъюгатов, были синтезированы соединения **58** и **62** (Схемы 4 и 5). β -Кетозэфир **56**, необходимый для реализации выбранной стратегии синтеза, был получен взаимодействием 4-метоксиацетофенона **55** с диэтилкарбонатом и NaH в толуоле с выходом 74% (Схема 4). Соединение **56** превращали в 7-гидроxicумарин **57** по Пехману и, далее в эфир **58** с выходом 80%.

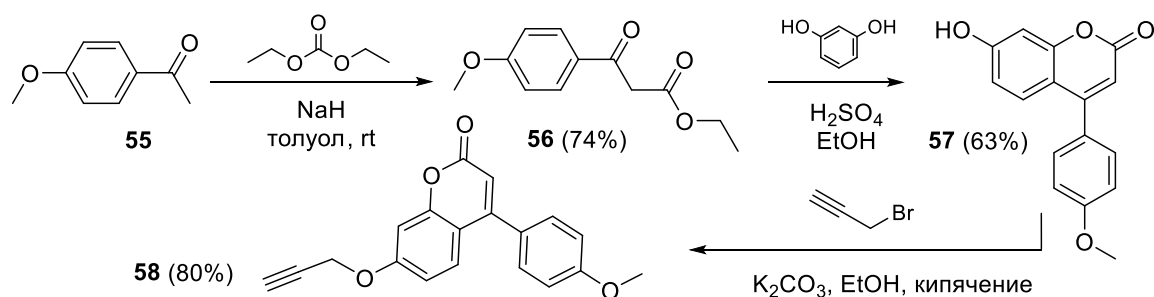


Схема 4

7-Гидрокси-2-7-диметилоктанализ-1 **62** синтезирован из гидроксицитронеллаля **59**, который сначала восстанавливали NaBH_4 в MeOH до спирта **60**, затем селективно бромировали до **61** – предшественника азиды **62** (выход 89%, Схема 5).

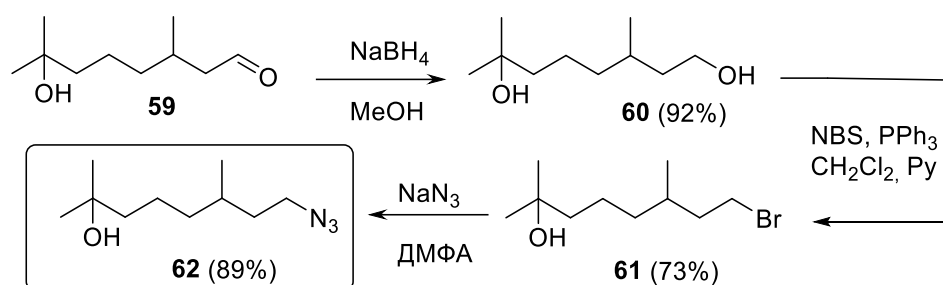


Схема 5

Синтез дополнительной библиотеки триазол-содержащих конъюгатов **63-68** осуществлен, исходя из пропаргилового эфира **58** (Схема 6) в смеси растворителей «хлористый метилен, *трет*-бутиловый спирт, вода» в соотношении 4:2:1 по объему, в силу невысокой растворимости стартового **58** в исходной системе растворителей (см. Схему 3). Конъюгаты **63-68** получены с выходами от 33 до 73% (Схема 6).

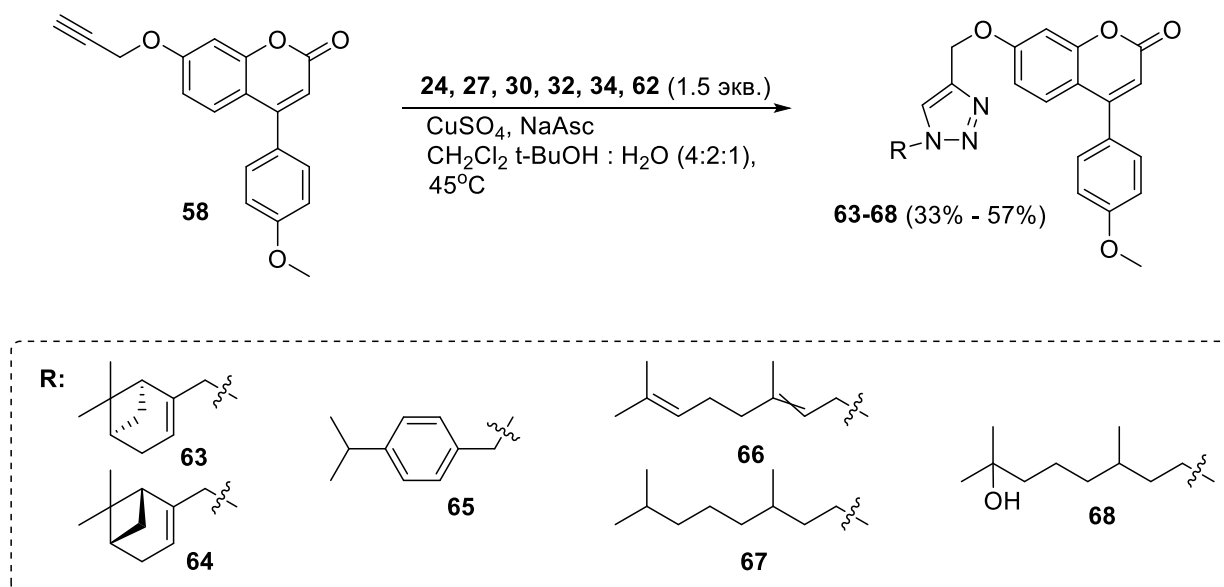


Схема 6

Аналогично, исходя из кумаринов **11-14** и азиды **62** получены триазол-связанные конъюгаты **69-72** с ациклическим терпеновым фрагментом, содержащим гидроксильную группу (Схема 7).

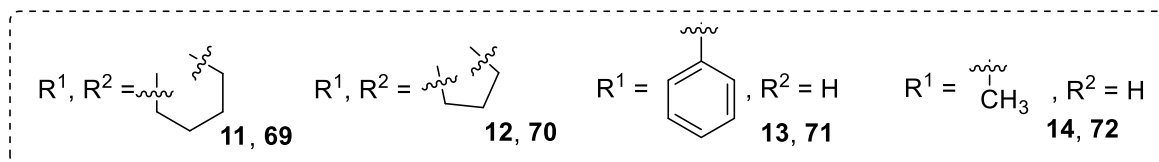
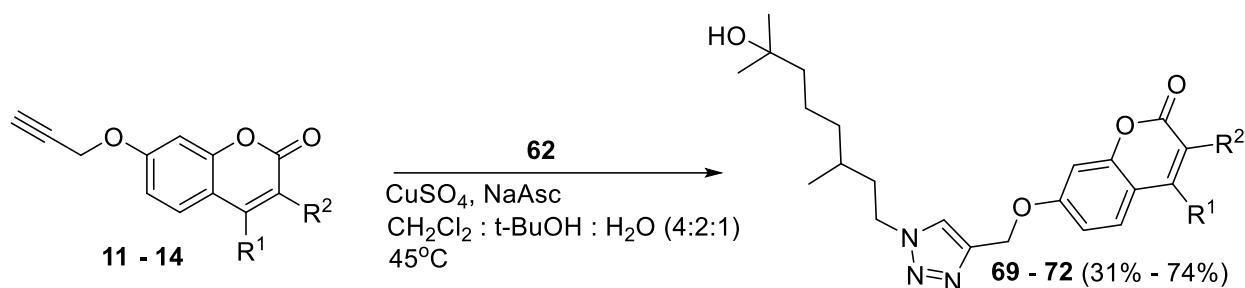


Схема 7

2. Синтез изоксазол-связанных монотерпен-кумариновых конъюгатов

В качестве основного подхода для синтеза библиотеки кумарин-терпеновых конъюгатов, связанных изоксазольным линкером, была выбрана реакция [3+2]-циклоприсоединения нитрилоксидов к алкинам, где источником 1,3-диполя (нитрилоксида) являются соответствующие альдоксимы, для получения которых в качестве предшественников использовали альдегиды **21**, **16**, **17** и **76** (получен окислением спирта **20** с использованием хлорхромата пиридиния (PCC), Схема 8).

Дальнейшее взаимодействие соединений **21**, **16**, **17** и **76** с гидрохлоридом гидроксиламина дало оксимы **73-75**, **77** в виде смесей их *Z*- и *E*- изомеров с выходами 59-76% (Схема 8). Генерацию 1,3-диполей осуществляли *in situ* в присутствии *O*-пропаргильовых эфиров **11-14**, используя окислитель (бис(трифторацетокси)йодо)бензол (PIFA) в метаноле при 40 °С, постепенно добавляя раствор смеси *Z*- и *E*-оксима, с целью снижения доли образующихся в конкурирующей параллельной реакции побочных продуктов.

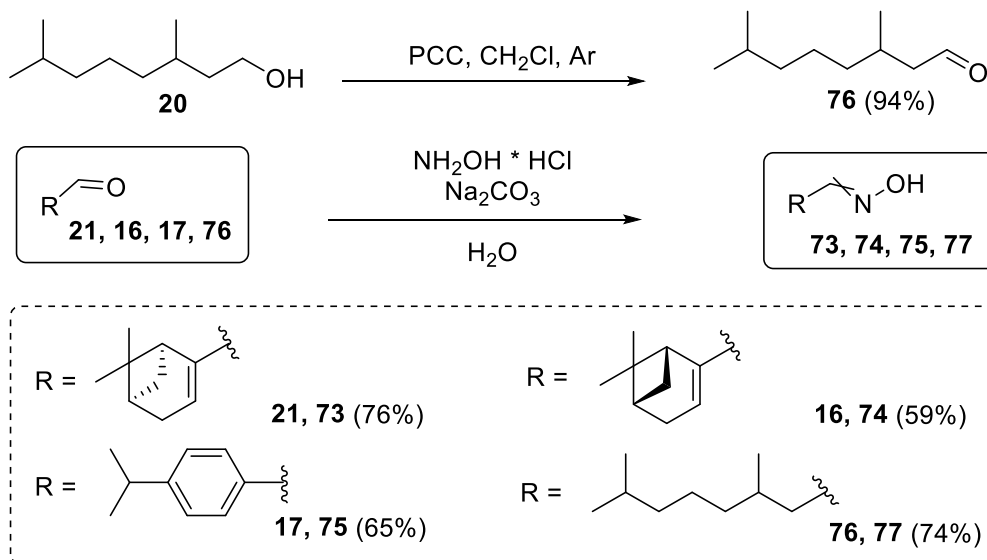


Схема 8

Изоксазол-связанные конъюгаты **78-89** были синтезированы из пропаргиловых эфиров **11-14** и оксимов **73-75**, полученных из альдегидов бициклических и ароматических терпенов с невысокими выходами – от 21 до 47 % (Схема 9).

В случае с оксимами ациклических альдегидов (3,7-диметилоктаналь) получить соответствующие изоксазолы напрямую не удалось. Поэтому для синтеза целевых изоксазол-связанных конъюгатов этого ряда был предложен альтернативный подход: введение готового терпенсодержащего изоксазольного блока в молекулу кумарина.

Так, вовлечение оксима **77** в реакцию с 2,3-дихлорпропеном в присутствии *N*-хлорсукцинимиды, пиридина и NEt_3 позволило получить 5-хлорметилизоксазольное производное **90** с выходом 97%. Дальнейшее *O*-алкилирование 7-гидроксикумаринов **7-10** действием хлорида **90** в ацетоне в присутствии K_2CO_3 при 125 °C в реакторе *Anton Paar Monowave 50* обеспечило получение изоксазольных конъюгатов **91-94** с выходами от 32 до 45% (Схема 10).

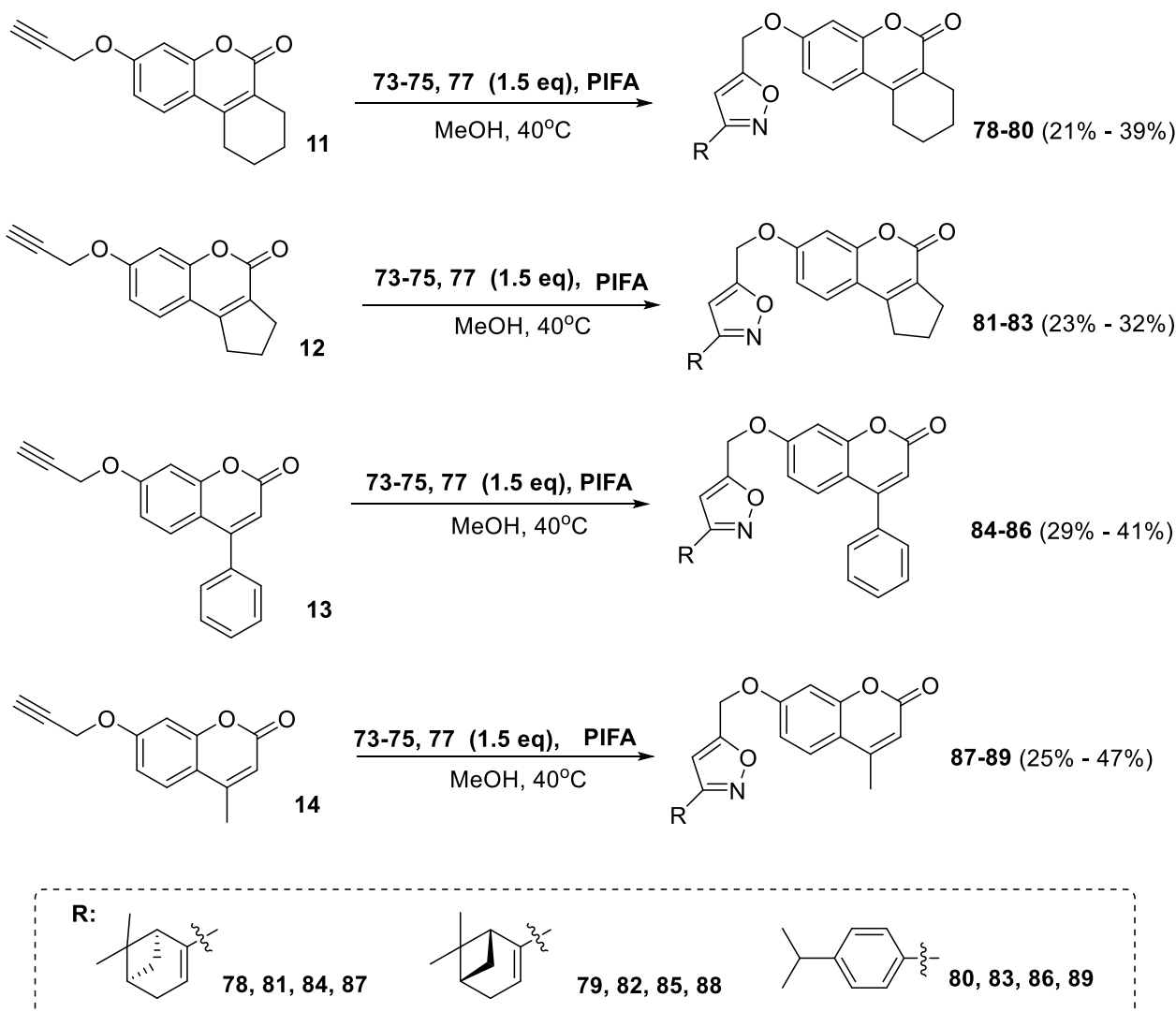
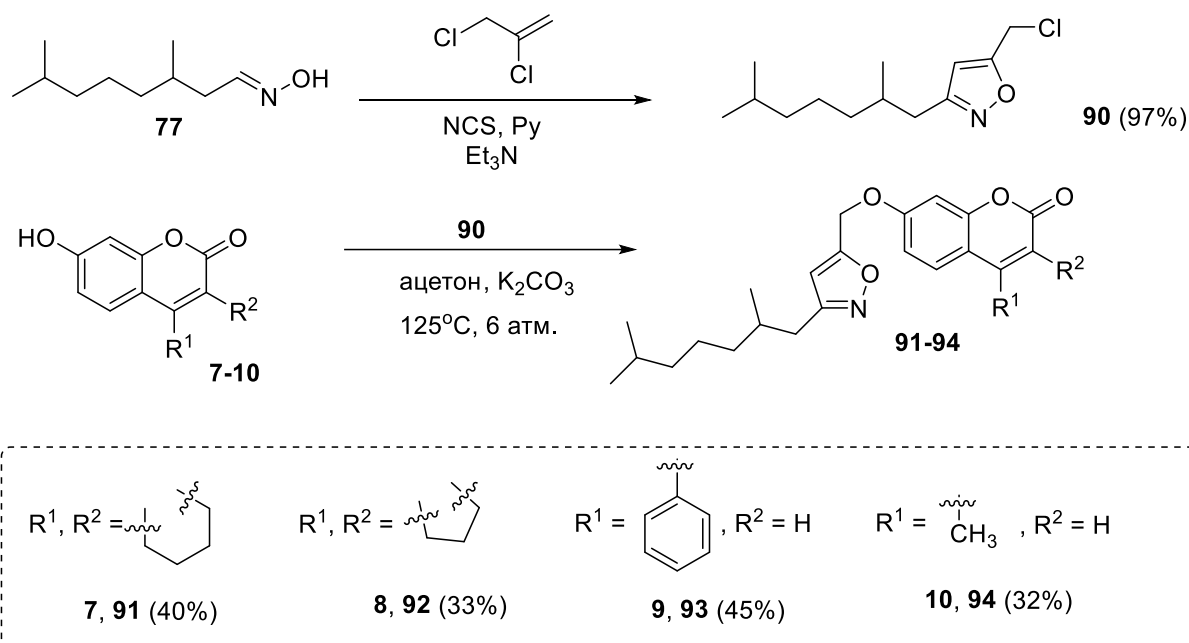


Схема 9



3. Анализ данных ингибирующей активности синтезированных производных в отношении РСВ

Исследование противовирусной активности синтезированных соединений в отношении РСВ было выполнено в Лаборатории химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (Санкт-Петербург).

Ингибирующая активность синтезированных триазол-связанных конъюгатов кумаринов и монотерпенов в отношении РСВ была изучена *in vitro* с определением цитотоксических концентраций (CC_{50}) и ингибирующих концентраций (IC_{50}) для подтипов А и В, также был рассчитан индекс селективности (отношение CC_{50} к IC_{50}) с использованием рибавирина в качестве препарата сравнения (Таблицы 1 и 2).

Среди исследованных соединений были выявлены лидеры – соединения **38** и **44**, проявляющие высокую активность: для соединения **38** IC_{50} составила 0.46 μM (А) и 1.2 μM (В) при SI 605 и 233 соответственно; для соединения **44** – IC_{50} 1.65 μM (А, SI = 160) и 0.23 μM (В, SI = 1147). Близкие значения показали соединения **36**, **46** и **53-Z**, обладающие субмикромольной активностью и значительным индексом селективности. Согласно данным Таблицы 1, активность соединений **35-54** против подтипов А и В в целом сопоставима, за исключением отдельных соединений.

Результаты эксперимента «время прибавления» показали, что наиболее активные соединения (**36**, **38**, **44**) ингибируют вирус преимущественно на ранних и средних стадиях репликационного цикла, что указывает на возможную их вовлечённость в качестве мишеней F-белка РСВ или белков репликационного комплекса.

Таблица 1 – Активность конъюгатов **35-54** в отношении РСВ А и В

Соединение	CC ₅₀ , μ M	PCB A		PCB B	
		IC ₅₀ , μ M	SI	IC ₅₀ , μ M	SI
35	25.5 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 0.3	6	3.5 $\pm$ 0.9	7
36	30.12 $\pm$ 2.6	0.6 $\pm$ 0.1	50	1.3 $\pm$ 0.1	23
37	37.7 $\pm$ 9.8	22.1 $\pm$ 4.7	2	23.5 $\pm$ 5.1	1
38	279.09 $\pm$ 22.6	0.46 $\pm$ 0.1	605	1.2 $\pm$ 0.1	233
39	22.2 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.5	6	4.5 $\pm$ 0.3	5
40	52.7 $\pm$ 4.4	6.9 $\pm$ 0.8	8	7.2 $\pm$ 2.0	7
41	277.8 $\pm$ 11.7	629.2 $\pm$ 39.4	0.4	256.5 $\pm$ 23	1
42	38.5 $\pm$ 2.5	21.7 $\pm$ 1.7	2	25.6 $\pm$ 1.9	2
43	19.1 $\pm$ 2.1	5.7 $\pm$ 0.9	3	6.5 $\pm$ 1.2	3
44	264.43 $\pm$ 20.5	1.65 $\pm$ 0.2	160	0.23 $\pm$ 0.03	1147
45	43.44 $\pm$ 2.65	4.19 $\pm$ 0.7	10	6.3 $\pm$ 1.0	7
46	13.67 $\pm$ 1.76	<0.15	>88	1.6 $\pm$ 0.4	9
47	85.71 $\pm$ 9.08	4.87 $\pm$ 0.7	17	6.6 $\pm$ 2.5	13
48	12.29 $\pm$ 1.1	0.33 $\pm$ 0.1	37	11.3 $\pm$ 1.1	1
49	14.6 $\pm$ 1.8	4.1 $\pm$ 0.6	4	5.2 $\pm$ 0.9	3
50	22.2 $\pm$ 3.1	6.6 $\pm$ 0.2	3	7.6 $\pm$ 2.1	3
51	14.3 $\pm$ 2.9	6.4 $\pm$ 0.4	2	7.0 $\pm$ 1.6	2
52	20.0 $\pm$ 3.7	2.2 $\pm$ 0.1	9	3.2 $\pm$ 0.8	6
53-Z	14.74 $\pm$ 2.29	<0.2	>96	1.1 $\pm$ 0.2	13
53-E	15.0 $\pm$ 1.3	6.1 $\pm$ 1.0	3	8.2 $\pm$ 2.1	2
54	16.1 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.4	4	3.9 $\pm$ 0.7	4
Рибавирин	>4095	31.1 $\pm$ 6.7	132	54.5 $\pm$ 5.9	76

Результаты тестирования в отношении РСВ А расширенной библиотеки конъюгатов **63-72** и **78-89** и **91-94** (с метоксифенильным заместителем в кумариновом остове, с гидроксильным заместителем в ациклическом монотерпеноидном фрагменте и изоксазол-связанные конъюгаты), представлены в Таблице 2.

Высокая анти-PCB активность конъюгатов с 2,6-диметилоктанольным фрагментом (например, соединение **70** с IC₅₀ = 0.03 μ M) согласно данным молекулярного моделирования, может объясняться образованием дополнительных водородных связей с ключевыми аминокислотами F-белка РСВ, в первую очередь, с типичным для группы соединений **68-72** Ser398 цепи С (Рисунок 2).

Таблица 2 – Активность конъюгатов **63-71**, **77-88** и **90-93** в отношении РСВ А

Соед-е	IC ₅₀ , μM	SI	Соед-е	IC ₅₀ , μM	SI
63	2.5±0.7	49	81	>0.5	<1
64	20.3±0.2	6.6	82	2.6±0.4	<3
65	37±0.3	8.6	83	>50	<1.1
66-Z	2.7±0.7	0.9	84	>10	<1
66-E	1.5±0.1	1.9	85	>5	<1
68	0.21±0.09	28	86	>20	<1
69	0.85±0.1	7.2	87	6±0.3	2.6
70	0.034±0.03	167	88	1.6±0.1	3.1
71	0.15±0.02	38	89	>8	<1
72	0.14±0.01	43	91	1.3±0.3	3.6
78	<0.1	>85	92	151.1±23.1	4.1
79	9.2±1.0	2.8	93	7.9±1.5	3.5
80	<0.09	>88	94	1.7±0.9	2
Рибавирин				31.1±6.7	132

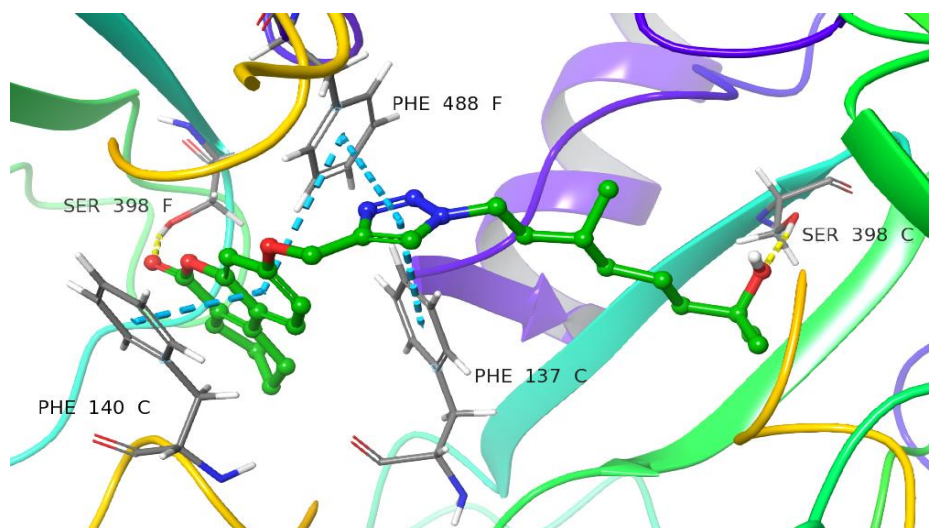


Рисунок 2 – Докинг-поза **R-70** в 7LVW активном сайте белка F РСВ. Водородные связи - желтая пунктирной линией, π-π-стэкинговые взаимодействия – голубая

Проведённый анализ взаимосвязи «структура – противовирусная активность» синтезированных конъюгатов позволил выявить ряд закономерностей, которые иллюстрируются «тепловыми картами» активности (Таблицы 3, 4 и 5).

Таблица 3 – Взаимосвязь «структура – IC₅₀ (PCB A)» монотерпен-кумариновых конъюгатов, связанных триазольным линкером

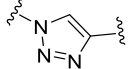
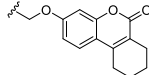
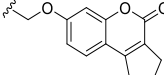
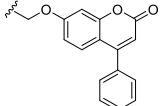
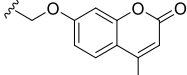
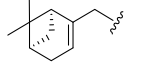
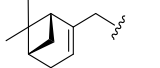
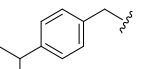
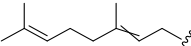
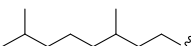
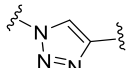
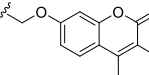
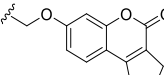
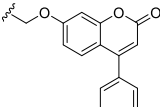
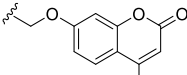
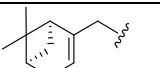
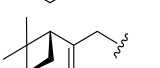
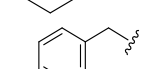
				
	4.1	6.9	4.2	6.6
	0.6	629.2	0.2	6.4
	22.1	21.7	4.9	2.2
	0.5	5.7	0.3	6.1
	3.7	1.7	4.1	4.3

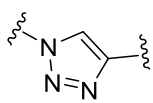
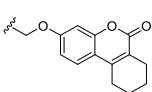
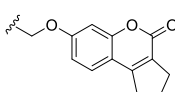
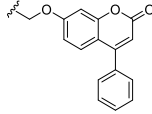
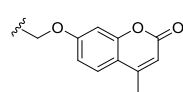
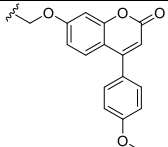
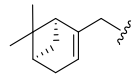
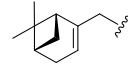
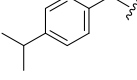
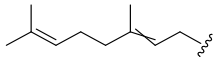
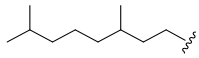
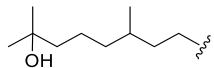
Таблица 4 – Взаимосвязь «структура – IC₅₀ (PCB B)» монотерпен-кумариновых конъюгатов, связанных триазольным линкером

				
	3.5	7.2	6.3	7.6
	1.3	256.5	1.6	7.0
	23.5	25.6	6.6	3.2
	1.2	6.2	11.3	8.2
	4.5	0.2	5.2	3.9

Ячейки пересечений окрашены в оттенки зеленого, желтого и красного цвета в зависимости от значения IC₅₀ (μM) соответствующего конъюгата: зелёный цвет соответствует низким значениям IC₅₀ (большей активности), красный цвет соответствует высоким значениям IC₅₀ (низкой активности) в ряду соединений. Так, наибольшей ингибирующей активностью в отношении PCB A и B обладают триазольно-связанные конъюгаты, содержащие аннелированное циклогексановое кольцо в структуре кумарина (5 соединений из 10 по данным двух таблиц попадают в «зеленую зону», к группе с меньшей активностью можно отнести производные 4-фенил-замещенного кумарина – в зеленую зону попадают 3 из 10 соединений. Существенное

влияние на активность оказывает и природа терпенового фрагмента: наилучшие показатели продемонстрировали конъюгаты с ациклическими (цитраль-) и гидроксильными ациклическими (гидроксицитронеллаль-) терпеновыми остатками (Таблица 5) – 3 и 5 соединений с указанными заместителя попадают в «зеленую зону», соответственно. В целом, природа гетероциклического линкера в случае с анти-PCB активностью имеет критическое значение: соединения, содержащие 1,2,3-триазольный линкер, существенно превосходят по активности изоксазольные аналоги. Наиболее перспективные соединения **35**, **44** и **70** существенно превосходят препарат сравнения рибавирин и по активности, и по индексу селективности (Таблицы 1 и 2).

Таблица 5 – Взаимосвязь «структура – IC₅₀ (PCB A)» расширенной библиотеки конъюгатов, связанных триазольным линкером

					
	4.1	6.9	4.2	6.6	2.5
	0.6	629.2	0.2	6.4	20.3
	22.1	21.7	4.9	2.2	37.0
	0.5	5.7	0.3	6.1	1.5
	3.7	1.7	4.1	4.3	---
	0.9	0.03	0.2	0.1	0.2

4. Анализ данных ингибирующей активности синтезированных конъюгатов в отношении фермента TDP1

Способность синтезированных монотерпен-кумариновых конъюгатов ингибировать тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1 (TDP1), фермент репарации повреждений ДНК, опосредованных топоизомеразой I (TOP1), изучена в Лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН под руководством канд. хим. наук А. Л. Захаренко. Как оказалось, триазол-связанные конъюгаты с гидроксильной группой в 3,7-диметилгептановом фрагменте **68-72** и конъюгат **50** не проявляют ингибирующей активности (значения их IC₅₀ > 50 μM). В то же время, соединения **78-94**, содержащие изоксазольный фрагмент, связывались с ферментом TDP1 лучше (IC₅₀ от 0.78 до 3.2

μM), чем соответствующие триазолы **36, 37, 39, 41-50** и **63-68** (IC₅₀ от 1.1 до 5 μM) (Таблица 6).

Лидирующих по TDP1 ингибирующей активности (с IC₅₀ < 1.0 μM, что превосходит активность препарата сравнения фурамин) соединений среди изоксазол-связанных конъюгатов четыре (соединения **81, 84, 85** и **91** с величинами IC₅₀ менее 0.9 μM), а среди триазолов – ни одного. Единственные триазолы, которые продемонстрировали приемлемую ингибирующую активность – это конъюгаты фенилкумарина **45-49** (IC₅₀ от 1.1 до 3.2 μM) и производные 3,7-диметилуктанового ряда **39, 44, 54, 67** (IC₅₀ от 1.5 до 5 μM).

Таблица 6 – Активность синтезированных конъюгатов в отношении TDP1
(представлены соединения с IC₅₀ < 5 μM)

Соединение	IC ₅₀ , μM	Соединение	IC ₅₀ , μM
36	4.9±0.7	66-E	2.0±0.2
37	2.7±0.4	67	1.7±0.4
39	1.8±0.1	78	1.6±0.4
41	4.7±0.5	79	1.1±0.4
42	4.5±0.2	80	1.5±0.2
43	3.2±0.4	81	0.9±0.2
44	1.7±0.1	82	1.2±0.2
45	2.0±0.2	84	0.89±0.47
46	3.2±0.4	85	0.78±0.01
47	1.1±0.3	86	1.2±0.3
48	2.8±0.4	87	2.7±0.5
49	1.5±0.4	88	2.3±0.6
50	<5	89	3.2±1.0
63	2.7±0.3	91	0.8±0.5
64	2.2±0.2	92	1.6±0.4
65	1.9±0.2	93	2.1±0.2
66-Z	2.2±0.3	94	3.1±0.7
Фурамин			1.2±0.3

Взаимосвязь «структура – анти-TDP1 активность» отображают «тепловые карты» (Таблицы 7 и 8), подтверждающие, что выраженная ингибирующая способность характерна для изоксазольных производных с ароматическим заместителем в кумариновом остове, связанных с бициклическими терпенами или с ациклическим углеводородным фрагментом.

Таблица 7 – Взаимосвязь «структура – анти-TDP1 активность» кумарин-терпеновых конъюгатов, связанных изоксазольным линкером

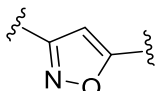
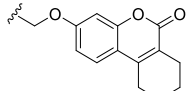
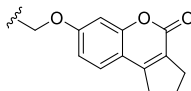
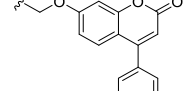
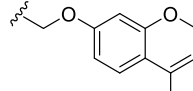
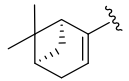
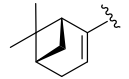
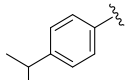
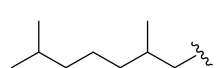
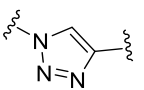
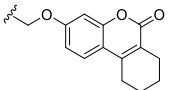
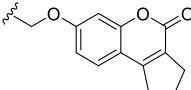
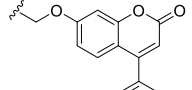
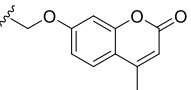
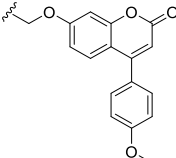
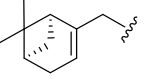
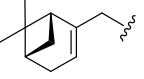
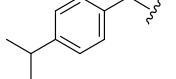
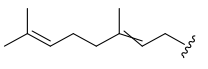
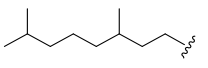
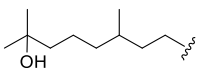
				
	1.6	0.9	0.9	2.7
	1.1	1.2	0.8	2.3
	1.5	9	1.2	3.2
	0.8	1.6	2.1	3.1

Таблица 8 – Взаимосвязь «структура – анти-TDP1 активность» кумарин-терпеновых конъюгатов, связанных триазольным линкером

					
	13	14.3	2	50	2.7
	4.9	4.7	3.2	23.3	2.2
	2.7	4.5	1.1	12	1.9
	5.1	3.2	2.8	13.5	2
	1.8	1.7	1.5	5	1.7
	50	50	50	50	50

Методом молекулярного моделирования показано, что для изоксазол-связанных конъюгатов типичны Н-связи с THR281, ASN516, LYS265, HIE493, HIP263 и SER514, а π - π -стэкинговые и π -катионные взаимодействия с HIE493, TYR204, HIP263, LYS265 и LYS495 (Рисунок 3).

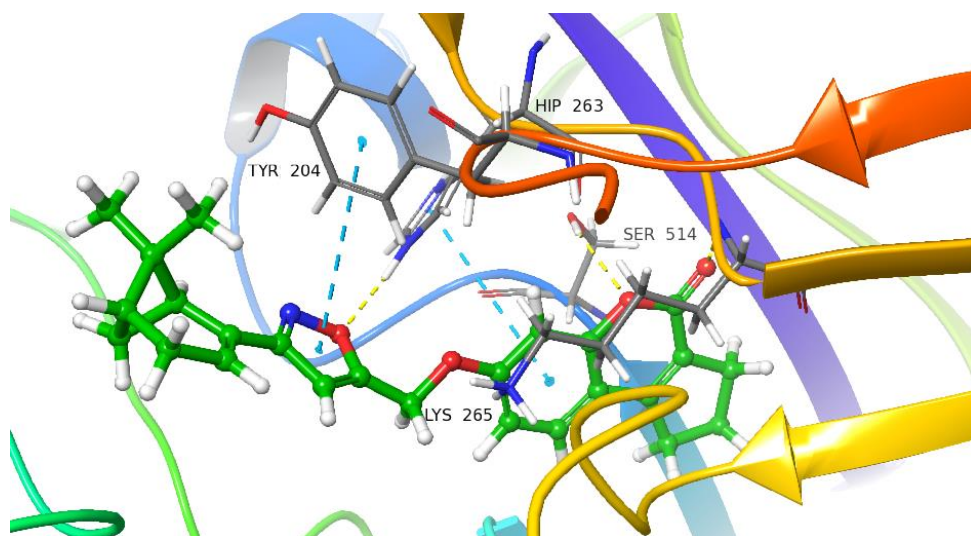


Рисунок 3 – Докинг-поза соединения **81** в 1NOP активном сайте TDP1. Водородные связи - желтая пунктирная линия, π - π -стэкинговые взаимодействия – голубая

Важно, что соединения **43**, **67** и **85** в концентрации 10 μ M не проявили выраженной собственной цитотоксичности в отношении клеток линии HeLa, однако усиливали цитотоксический эффект топотекана, подтверждая их перспективность в качестве потенциальных сенситизаторов в комплексной противоопухолевой терапии (Рисунок 4).

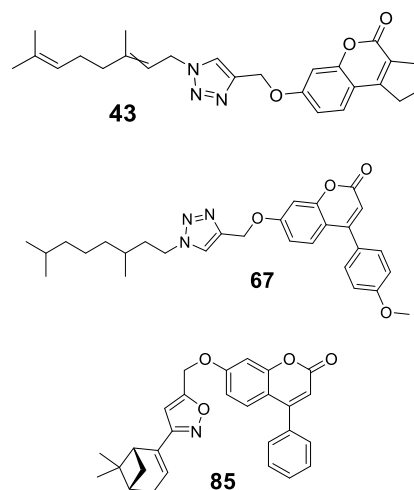
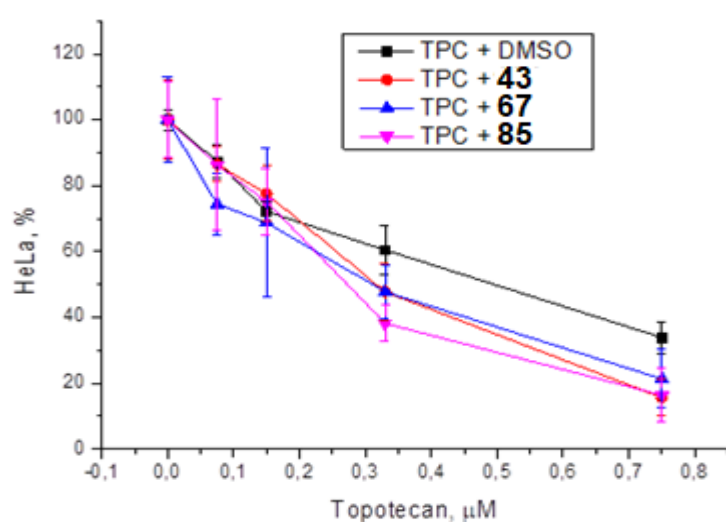


Рисунок 4 – Конъюгаты **43**, **67** и **85**, усиливающие цитотоксический эффект топотекана

Для оценки влияния введенных гетероциклических линкеров на липофильность были определены времена удерживания (эксперимент ВЭЖХ с обращённой фазой). Полученные данные позволяют сделать вывод о снижении липофильности соединений вследствие внедрения гетероциклических линкеров, наиболее выраженном в случае триазол-связанных кумарин-терпеновых конъюгатов, что может благоприятно сказаться на их фармакологических свойствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезирована библиотека кумарин-монотерпеновых конъюгатов, связанных триазольным линкером. Показано, что для их получения эффективным является подход на основе катализируемой солями меди реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов терпенового ряда к 7-пропаргильным эфирам кумаринов.
2. Синтезирована библиотека кумарин-монотерпеновых конъюгатов, связанных изоксазольным линкером, путем 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилоксидов, генерируемых *in situ* из оксимов циклических терпеноидов, к 7-пропаргильным эфирам кумаринов. Получение конъюгатов этого ряда, содержащих 2,7-диметилгептановый фрагмент, реализовано на основе альтернативного подхода – взаимодействием с соответствующим 5-хлорметилизоксазольным производным.
3. Изучение противовирусной активности полученных соединений в отношении РСВ показало, что монотерпен-кумариновые конъюгаты, связанные триазольным линкером, являются эффективными противовирусными агентами в отношении РСВ, проявляя высокие индексы селективности. На основании биологических экспериментов и молекулярного моделирования предположено, что их мишенью является белок F.
4. Установлено, что введение триазольного линкера приводит к уменьшению ингибирующей активности в отношении TDP1 по сравнению с соединениями, не содержащими такого линкера. В случае с изоксазол-связанными кумарин-терпеновыми конъюгатами высокая ингибирующая активность в отношении TDP1 сохраняется.
5. Среди синтезированных монотерпен-кумариновых конъюгатов, связанных гетероциклическим линкером, выявлены три соединения, способных увеличивать цитотоксичность противоопухолевого препарата топотекана в отношении клеток рака шейки матки HeLa.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Tsyypyshev D. O.**, Klabukov A. M., Razgulaeva D. N., Galochkina A. V., Shtro A. A., Borisevich S. S., Khomenko T. M., Volcho K. P., Komarova N. I., Salakhutdinov N. F. Design, synthesis and antiviral evaluation of triazole-linked 7-hydroxycoumarin–monoterpene conjugates as inhibitors of RSV replication // RSC Med. Chem. – 2025. – Vol. 16(3). – P. 1151-1171. <https://doi.org/10.1039/d4md00728j>
2. **Tsyypyshev D. O.**, Zakharenko A. L., Podurina M. V., Khomenko T. M., Kondrashov E. V., Lavrik O. I., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. Isoxazole-linked 7-hydroxycoumarin--2,6-dimethylheptane conjugates as inhibitors of TDP1 enzyme // Mendeleev Communications. – 2025. – Vol. 35(4). – 444-446. <https://doi.org/10.71267/mencom.7704>.
3. Патент РФ 2826 560. **Цыпышев Д.О.**, Хоменко Т.М., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф., Штро А.А., Галочкина А.В., Клабуков А.М., Разгуляева Д.Н. «Производные 7-гидроксикумарина, соединенные с остатками монотерпенов через триазольный

линкер, как ингибиторы репродукции респираторно-синцитиального вируса (РСВ)», Бюл. № 26, опубликовано: 12.09.2024.

4. **Д.О. Цыпышев**, Т.Е. Корниенко, Т.М. Хоменко, А.Л. Захаренко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Монотерпен-кумариновые конъюгаты, соединенные через гетероциклический линкер, как ингибиторы фермента репарации ДНК TDP1 // «Химия и химическая технология в XXI веке»: сб. тез. XXIV Международной конференции (Томск 15-19 мая 2023 г.). – Устный доклад.

5. **Д.О. Цыпышев**, Т.Е. Корниенко, Т.М. Хоменко, А.Л. Захаренко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик. Ингибирующее действие монотерпен-кумариновых конъюгатов, соединенных гетероциклическим линкером, в отношении фермента репарации ДНК тирозил-ДНК фосфодиэстеразы 1 (TDP1) // «Современные проблемы органической химии»: сб. тез. Всероссийской научной конференции с международным участием (Новосибирск, 26-30 июня 2023 г.). – Устный доклад.

6. Т.М. Хоменко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, А.А. Штро, С.С. Борисевич, **Д.О. Цыпышев**. Ингибиторы репродукции респираторно-синцитиального вируса человека на базе монотерпен-кумариновых конъюгатов, соединенных через гетероциклический линкер // «Современные проблемы органической химии»: сб. тез. Всероссийской научной конференции с международным участием (Новосибирск, 12-14 сентября 2022 г.). – Устный доклад.

7. Т.М. Хоменко, А.Л. Захаренко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик, Т.Е. Корниенко, **Д.О. Цыпышев**. Ингибиторы фермента репарации ДНК TDP1 на базе монотерпен-кумариновых конъюгатов, соединенных через гетероциклический линкер // Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней: сб. тез. Всерос. конф. (Сочи, 16-21 сент. 2022 г.). – Устный доклад.

8. **Цыпышев Д.О.**, Хоменко Т.М., Штро А.А., Борисевич С.С., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Производные 7-гидроксикумарина, соединенные с остатками монотерпенов через триазольный линкер, как ингибиторы репродукции респираторно-синцитиального вируса (РСВ) // «МедХим-Россия 2024»: сб. тез. 6-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием (Нижний Новгород, 01-04 июля 2024 г.). – Устный доклад.

9. К.П. Волчо, И.В. Ильина, Н.С. Ли-Жуланов, А.В. Подтуркина, О.В. Ардашов, **Цыпышев Д.О.**, Хоменко Т.М., Н.Ф. Салахутдинов. Монотерпены как исходные соединения в поиске новых лекарственных средств // «Химия и химическая технология в XXI веке»: сб. тез. XXV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Томск, 20-24 мая 2024 г.). – Устный доклад.

10. К.П. Волчо, **Д.О. Цыпышев**, Т.М. Хоменко, А.А. Штро, С.С. Борисевич, Н.Ф. Салахутдинов. Новые противовирусные агенты на основе кумарин-монотерпеновых конъюгатов // «VI Всероссийская конференция по органической химии»: сб. тез. (Москва, 23-27 сент. 2024 г.). – Устный доклад.