

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА



На правах рукописи

Белоглазкина Анастасия Александровна

**Новые низкомолекулярные ингибиторы белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на
основе диспироиндолинонов**

(02.00.03 – Органическая химия)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель

Мажуга Александр Георгиевич

доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты

Грин Михаил Александрович

доктор химических наук, профессор

*ФГБОУ ВО "МИРЭА – Российский технологический университет",
заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии*

Щекотихин Андрей Егорович

доктор химических наук, профессор РАН,

заведующий кафедрой органической химии

ФГБОУ ВО РХТУ имени Д.И. Менделеева,

заведующий лабораторией химической

трансформации антибиотиков ФГБНУ

«НИИНА имени Г.Ф. Гаузе»

Газиева Галина Анатольевна

кандидат химических наук, старший

научный сотрудник

ФГБУН «Институт органической химии

им. Н.Д. Зелинского»

Защита состоится 5 декабря 2018 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

E-mail: tvn@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский пр-т, 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА».

<https://istina.msu.ru/dissertations/153693113/>

Автореферат разослан « » ноября 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор химических наук, профессор

Т.В. Магдесиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы наблюдается повышенный интерес к поиску непептидных низкомолекулярных соединений, способных препятствовать взаимодействию клеточных белков p53-MDM2. Белок p53 является опухолевым супрессором, играющим важную роль в жизненном цикле клетки и апоптозе, а MDM2 представляет собой его эндогенный ингибитор. Если блокировать взаимодействие этих белков, то высвобождающийся p53 активирует процесс разрушения опухоли, что является перспективным направлением в терапии раковых заболеваний. Взаимодействие белков p53 и MDM2 осуществляется прежде всего за счет трех гидрофобных остатков из R-спирали в p53 и небольшого, но глубокого кармана в MDM2. Подавляющее большинство известных ингибиторов их взаимодействия имеют в своей структуре спироиндолиноновое ядро, которое заполняет гидрофобный карман в MDM2. Соединения индолинонового ряда, содержащие спирочленение, в настоящее время проходят клинические испытания как препараты для терапии рака предстательной железы¹.

Данная работа посвящена дизайну и синтезу новых низкомолекулярных ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на основе диспиропроизводных различных арилидензамещенных гетероциклических систем, изучению их биологической активности и механизма действия, а также установлению зависимости «структура-активность». Предполагается, что введение в молекулу двух спиро-сочленений увеличит конформационную жесткость молекулы ингибитора и, как следствие этого, улучшит его взаимодействие с белком MDM2.

Цель работы заключается в поиске новых соединений-ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2, разработке и оптимизации методов их синтеза, а также изучении их цитотоксичности по отношению к опухолевым клеточным линиям различной морфологии.

Задачи работы состоят в: 1) разработке и оптимизации подходов к синтезу диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов, изучении их цитотоксичности *in vitro* методом МТТ, исследовании их локализации в клетке, связывания с белком методом western blot (белковый иммуноблот), исследовании механизма апоптоза; 2) изучении возможности получения энантиомерно чистых диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов; 3) разработке методов синтеза диспиропроизводных 5-арилиденгидантоинов, изучении их цитотоксичности, а также исследовании p53-активации; 4) создании синтетических подходов к диспиропроизводным 1,3-оксазолонов, изучении цитотоксичности полученных диспиропроизводных; 5) получении диспиропроизводных N(3)-незамещенных имидазол-4-онов

¹ Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2008**, 9, 5, 402-412.

и изучении их цитотоксичности; б) разработке и оптимизации синтетических подходов к синтезу диспиропроизводных на основе 5-арилиденроданинов, изучении цитотоксичности полученных производных.

Научная новизна работы заключается в том, что: 1) впервые разработаны и оптимизированы методы получения биологически активных диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов; 2) разработаны синтетические подходы к получению диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов в энантиомерно чистом виде; 3) двумя альтернативными методами получены диспиропроизводные на основе 5-арилиденгидантоинов; 4) получены диспиропроизводные на основе 1,3-оксазолонов; 5) разработаны подходы к получению диспиропроизводных на основе незамещенных имидазол-4-онов; 6) синтезирована серия диспиропроизводных на основе 5-арилиденроданинов с высокой противоопухолевой активностью; 7) изучена цитотоксичность полученных диспироиндолинонов.

Практическая значимость работы состоит в следующем: 1) впервые разработаны удобные препаративные методы получения диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов, в том числе N(3)-незамещенных, которые потенциально могут быть использованы для терапии онкологических заболеваний; 2) получены диспиропроизводные на основе 5-арилиденгидантоинов и показана их высокая цитотоксичность на клеточной линии рака легких A549; 3) получены диспиропроизводные на основе 1,3-оксазолонов, для которых установлена высокая противоопухолевая активность по отношению к опухолевой клеточной линии рака простаты LNCap, однако низкая селективность; 4) предложены методы получения неизвестных ранее диспиропроизводных на основе 5-арилиденроданинов с высокой противоопухолевой активностью по отношению к клеткам рака почек SN12C.

Положения, выносимые на защиту: 1) синтез новых диспироиндолинонов на основе 5-арилиден-2-тиогидантоинов; 2) разработка методологии получения энантиомерно чистых диспиропроизводных на основе 5-арилиден-2-тиогидантоинов; 3) новые методы синтеза диспирооксиндолов на основе 5-арилиденгидантоинов исходя из их S-алкилтиопроизводных; 4) разработка синтетических подходов к получению диспиропроизводных на основе 1,3-оксазолонов; 5) методология синтеза диспирооксиндолов на основе различных N-незамещенных гетероциклов: имидазол-4-онов и тиазолидин-2,4-диононов; 6) методология синтеза диспиропроизводных на основе 5-арилиденроданинов исходя из изотиоцианатов и замещенных анилинов; 7) выявление для всех серий полученных диспироиндолинонов зависимости «структура-активность» при изучении их цитотоксичности *in vitro* на опухолевых клеточных линиях методом МТТ, а также их локализации в клетке, связывания с белками методом western blot и механизма апоптоза.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 22 печатные работы: 3 статьи в российских и международных научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ, 2 патента и 17 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены на следующих российских и международных научных конференциях: Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015» (Красновидово, 2015); Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "KOST-2015" (Москва, 2015); XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry (Мец, Франция, 2015); 2ая Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015» (Красновидово, 2016); XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2016); I Всероссийская молодёжная школа-конференция “Успехи синтеза и комплексообразования” (Москва, 2016); International conference «Dombay Organic Conference Cluster» (DOCC-2016) (Домбай, 2016); Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней (Красновидово, 2017); XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017" (Москва, 2017); The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Москва, 2017); VII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, 2017); 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry (Дубровник, Хорватия, 2017); XV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 2018); Всероссийская молодежная научная школа-конференция “Актуальные проблемы органической химии” (Шерегеш, 2018); V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (Владикавказ, 2018).

Личный вклад автора. Вклад автора состоял в сборе и анализе литературных данных, составлении плана исследований, подготовке и проведении экспериментальных этапов исследования, обсуждении полученных результатов, обработке, интерпретации и оформлении полученных экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации и представлении полученных результатов на научных конференциях.

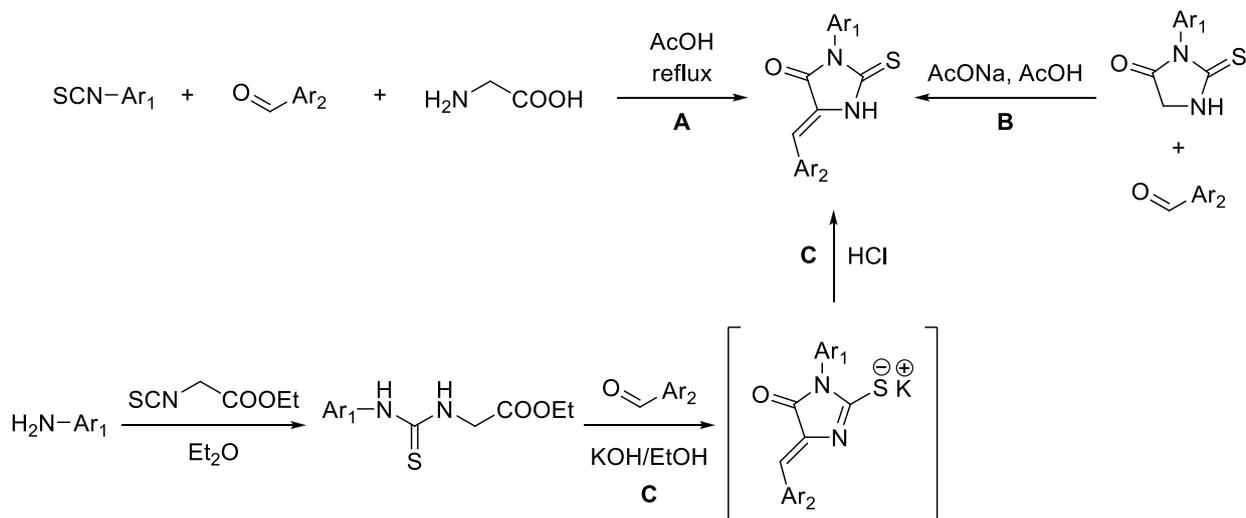
Объем и структура диссертационной работы. Диссертация состоит из пяти разделов: введения, обзора литературы на тему «Способы получения и применение спирооксиндолов»,

обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 186 страницах текста и включает 27 рисунков, 16 таблиц и список цитируемой литературы из 148 наименований.

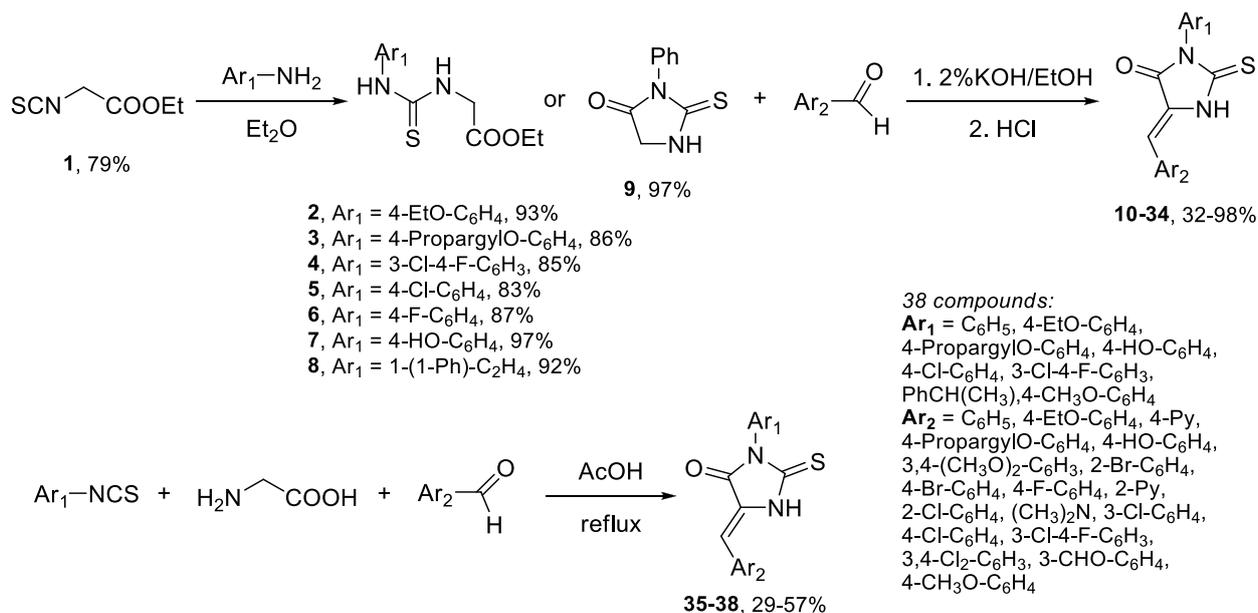
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез и биологическое тестирование диспиропроизводных 2-тиогидантоинов.

Общая схема синтеза диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов включала в себя первоначальный синтез 2-тиогидантоинов, который может быть осуществлен двумя путями: (а) одностадийным, исходя из ароматических изотиоцианатов в кислой среде (метод **A**), (б) двухстадийным методом, исходя из ароматических аминов в спиртовом растворе щелочи или в уксусной кислоте в присутствии ацетата калия (методы **B** и **C**):



С использованием этих двух подходов были получены 5-арилдензамещенные 2-тиогидантоины **10–38** с выходами 29–98%:



Конфигурация двойной связи в случае соединения **34** была подтверждена данными рентгеноструктурного анализа (Рис. 1).

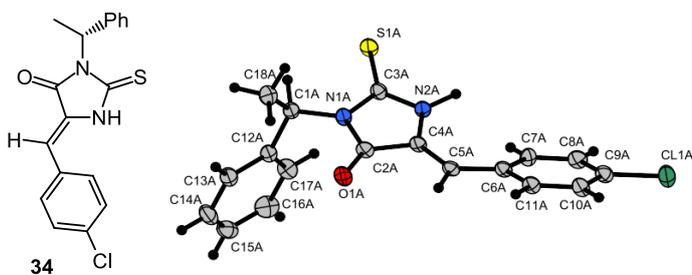
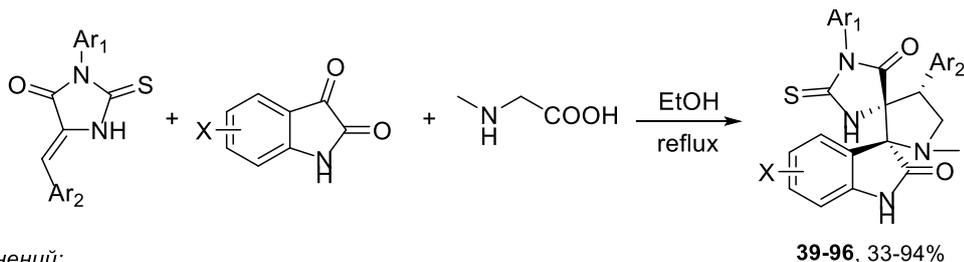


Рис. 1. Молекулярная структура 2-тиогидантоина **34**.

Далее 5-арилдензамещенные 2-тиогидантоины **10–38** вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с азометинилидом, генерируемым *in situ* из изатина и саркозина (N-метилглицина).

По оптимизированной методике были синтезированы диспироиндолиноны **39–96**:



58 соединений:

$Ar_1 = C_6H_5, 4-EtO-C_6H_4, 4-PropargylO-C_6H_4, 4-HO-C_6H_4, 4-Cl-C_6H_4, 3-Cl-4-F-C_6H_3, PhCH(CH_3), 4-CH_3O-C_6H_4$

$Ar_2 = C_6H_5, 4-EtO-C_6H_4, 4-Py, 4-PropargylO-C_6H_4, 4-HO-C_6H_4, 3,4-(CH_3O)_2-C_6H_3, 2-Br-C_6H_4, 4-Br-C_6H_4, 4-F-C_6H_4, 2-Py, 2-Cl-C_6H_4, (CH_3)_2N, 3-Cl-C_6H_4, 4-Cl-C_6H_4, 3-Cl-4-F-C_6H_3, 3,4-Cl_2-C_6H_3, 3-CHO-C_6H_4, 4-CH_3O-C_6H_4$

$X = H, 5-Cl, 5-Br, 5-NO_2, 7-COOH, 1-Propargyl-5-Br, 1-Propargyl$

Состав и строение полученных соединений были подтверждены данными ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, а также РСА. Реакция получения диспироиндолинонов **39–96** протекает диастереоселективно с образованием продуктов (5'S*,5R*,4'R*)-конфигурации (Рис. 2).

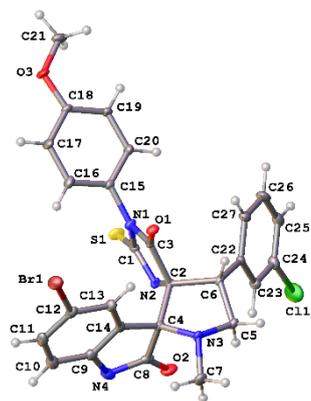
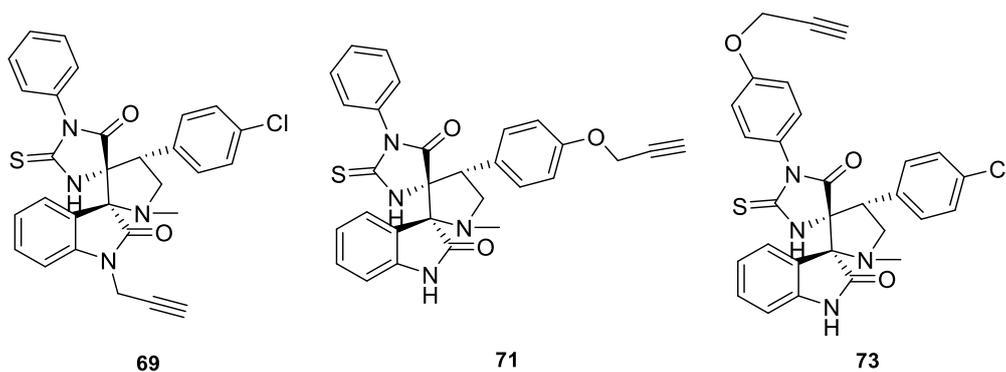


Рис. 2. Молекулярная структура диспирозоединения **63**.

Цитотоксичность полученной серии диспироиндолинонов **39–96** была определена с использованием стандартного метода МТТ². Для подтверждения их механизма действия как ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 были выбраны клеточные линии аденокарциномы рака предстательной железы LNCap и PC3, а также колоректального рака HCTwt и HCT-/-, две из которых (LNCap и HCTwt) способны к экспрессии p53, а две другие (PC3 и HCT-/-) – нет. IC₅₀ наиболее активных из полученных соединений составляют 1,12–18,03 мкМ; наилучшие результаты (LNCap/HCTwt) получены для соединений **41, 51, 55, 67, 88** (IC₅₀ 1,12–4,65/3,5–50 мкМ).

² Исследования цитотоксичности в рамках данной работы проводилось Скворцовым Дмитрием Александровичем (кафедра ХПС Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) и Воробьевой Натальей Сергеевной (Лаборатория Биомедицинских наноматериалов, НИТУ «МИСиС»).



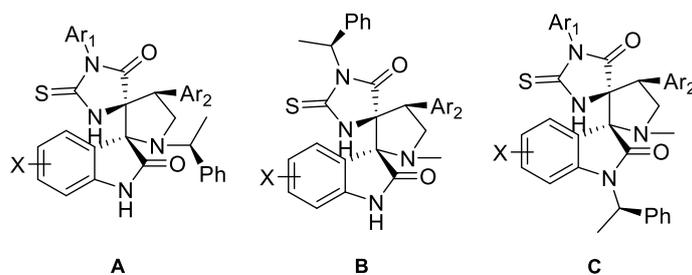
Было обнаружено, что, независимо от положения пропаргильного фрагмента, все полученные конъюгаты локализуются в цитоплазме.

Для подтверждения механизма ингибирования белка p53 данным классом соединений на примере диспирооксиндола **63** был проведен анализ методом western blot. Было показано, что соединение **63** вызывает увеличение концентрации белка p53 в клеточной культуре HCTwt, что свидетельствует об ингибировании p53-MDM2-взаимодействия, активации белка p53, и, вследствие этого, также увеличение экспрессии проапоптотических белков PUMA и CASPASE-3.

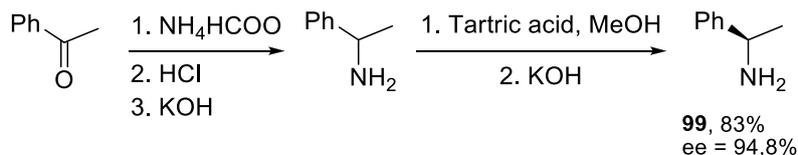
2. Разработка синтетических подходов к хиральным диспироиндолинонам.

В качестве дополнительной задачи при синтезе диспироиндолинонов – производных тиогидантоинов в работе была исследована возможность синтеза энантиомерно чистых или энантиомерно обогащенных диспироиндолинонов. Первоначально для изучения цитотоксичности индивидуальных стереоизомеров было проведено разделение диспироиндолинона **51** на энантиомеры при помощи ВЭЖХ с хиральной фазой. Выделенные индивидуальные энантиомеры были протестированы на цитотоксичность, и установлено, что лишь (–)-энантиомер проявляет цитотоксическую активность, в то время как (+)-энантиомер неактивен. Также было показано, что препаративная ВЭЖХ с хиральной фазой не является удобным препаративным методом разделения энантиомеров из-за своей трудоемкости и малого выхода чистых изомеров.

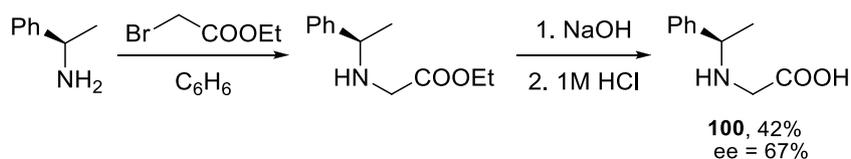
Для синтеза диспироиндолинонов с хиральными заместителями был выбран (*R*)-(+)-1-фенилэтиламин, как доступный хиральный прекурсор, устойчивый к рацемизации при действии кислот и щелочей; кроме того, как заместитель бензильного типа, 1-фенилэтильный фрагмент в последующем может быть удален из молекулы гидролизом. С использованием 1-фенилэтиламино-замещенных аминокислоты, тиогидантоина или изатина возможно ввести хиральный заместитель в каждый из трех пятичленных циклов целевой молекулы (структуры А–С):



(*R*)-1-Фенилэтиламин **99** получали аминированием ацетофенона по Лейкарту с получением рацемического амина, который затем расщепляли на энантиомеры с использованием (-)-винной кислоты:

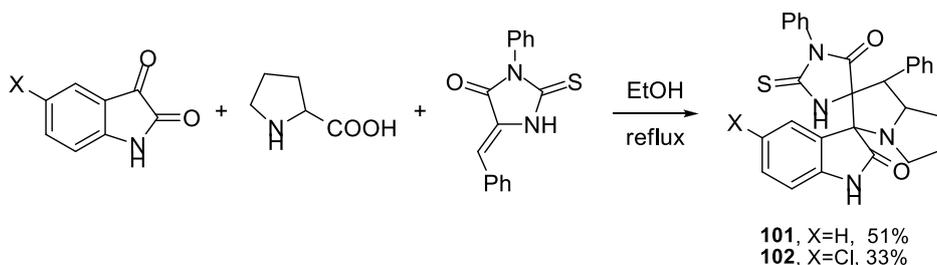


Для введения хирального заместителя в аминокислоту использовали реакцию нуклеофильного замещения в этиловом эфире бромуксусной кислоты под действием (*R*)-1-фенилэтиламина с последующим щелочным гидролизом:

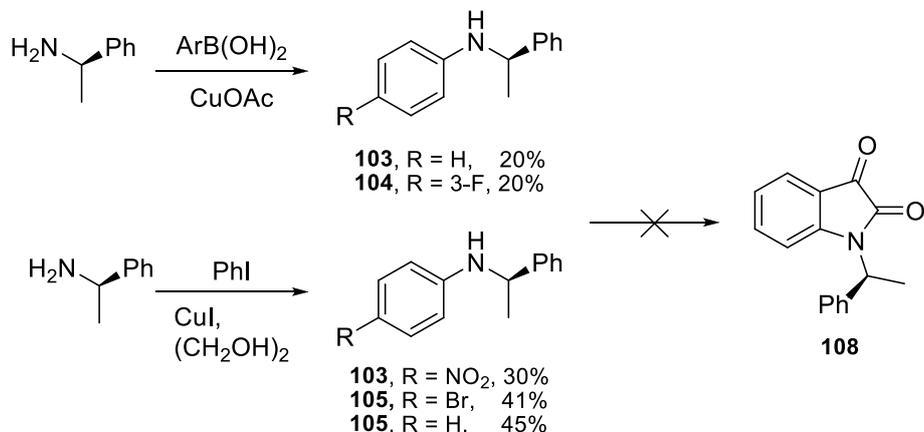


Полученный N-(1-фенилэтил)-глицин **100** вводили в реакцию с изатином и 5-арилдентиогидантоином. Однако, оказалось, что при использовании полученной аминокислоты в разных формах (кислая соль, основная соль, свободное основание), реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения к арилдентиогидантоинам не протекает. Возможно, это связано с тем, что подход диполя к диполярофилу в данном случае сильно затруднен из-за стерических препятствий, создаваемых объёмным 1-фенилэтильным заместителем при атоме азота.

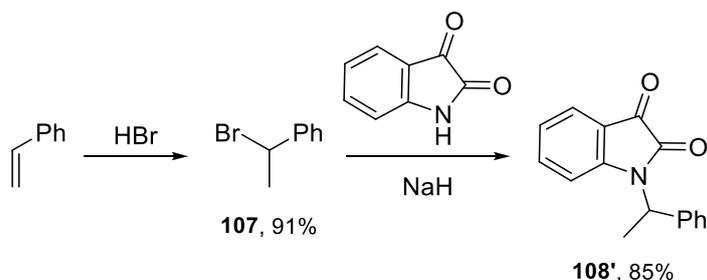
Для исследования возможности протекания реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с другими N-замещенными аминокислотами была проведена реакция с пролином, которая привела к образованию соединений **101**, **102**:



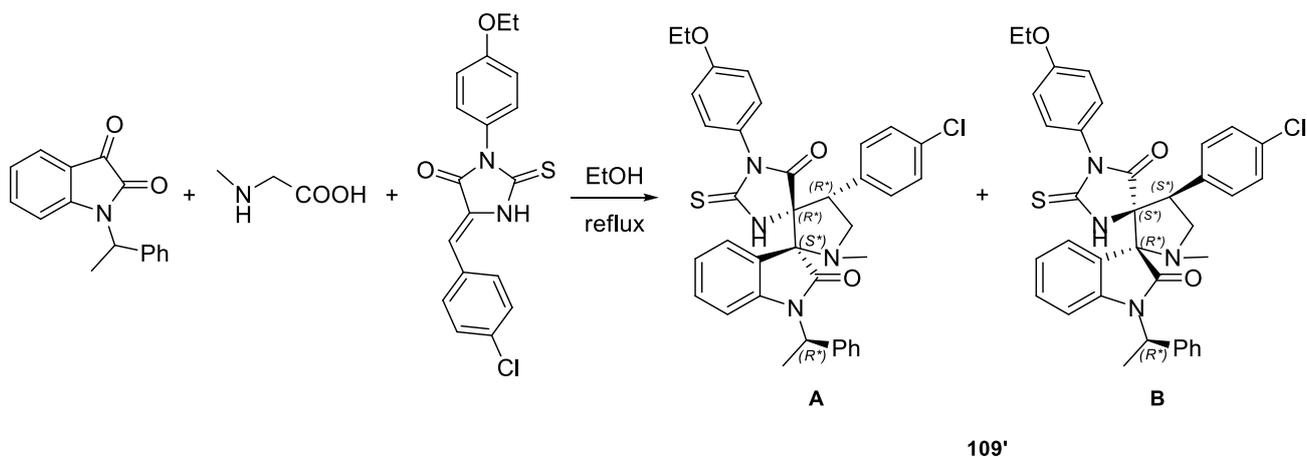
Для синтеза хиральных изатинов были опробованы два альтернативных метода: реакция Чана-Лама с использованием арилборных кислот и реакция Ульмана с использованием арилгалогенидов. Однако, целевой изатин получить не удалось.



В отличие от неудачных попыток синтеза хирального изатина **108**, его рацемический аналог **108'** успешно был получен гидробромированием стирола с последующим нуклеофильным замещением бромид-аниона:



Полученный изатин **108'** вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с саркозином и 5-арилиден-2-тиогидантоином **19**. В результате был выделен диспироиндолин **109'** в виде двух энантиомерных пар диастереоизомеров:



Реакция не приводит к появлению диастереомерного избытка, однако в результате дальнейшей 2-кратной перекристаллизации из 80% этанола удалось выделить диспироиндолин **109'-A** с *de* 92%. Выделенный диастереомер был охарактеризован данными рентгеноструктурного анализа (Рис. 4).

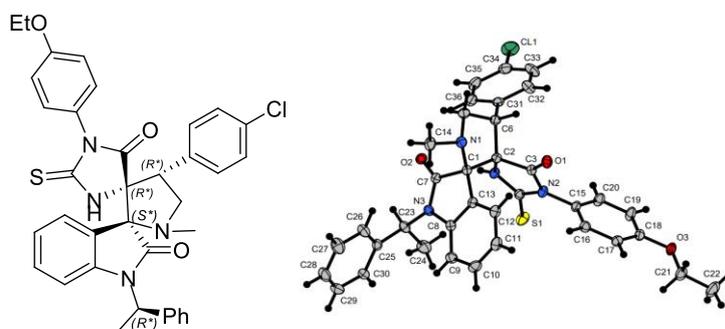


Рис. 4. Молекулярная структура соединения 109'.

3. Синтез и биологическое тестирование диспироиндолинонов на основе незамещенных тиогидантоинов и гидантоинов

Для оценки влияния природы экзо- и эндо-циклического гетероатомов в диполярофиле, а также заместителя при атоме N(3) тиогидантоинового цикла диспиропроизводных имидазол-4-онов на их биологическую активность нами была синтезирована серия незамещенных производных **113–115**, **118–122**. Структуры целевых соединений были выбраны с учетом установленной при исследовании диспиротиогидантоинов более высокой цитотоксичности галоген-замещенных производных. Первоначально были получены диспиропроизводные N-незамещенных 2-тиогидантоинов **113–115**, исходя из тиогидантоина. Соединение **115** было охарактеризовано данными рентгеноструктурного анализа, показавшими его (5'R*,5S*,4'S*) конфигурацию (Рис. 5), аналогично полученным ранее N-замещенным производным.

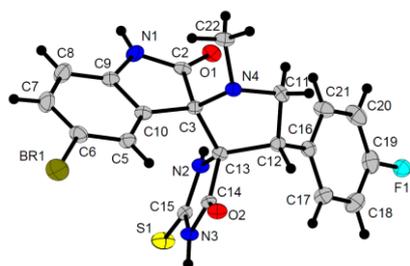
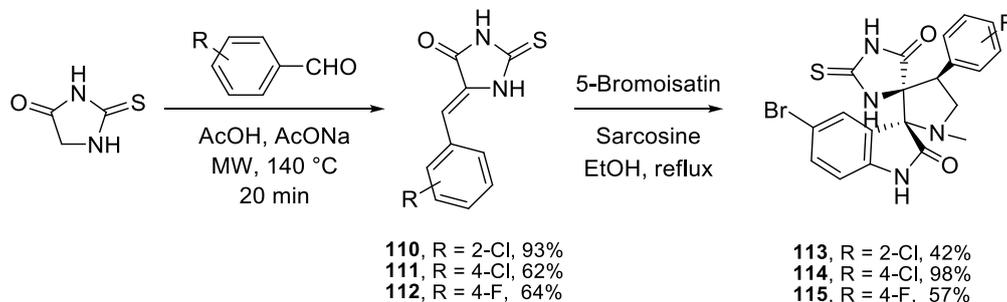
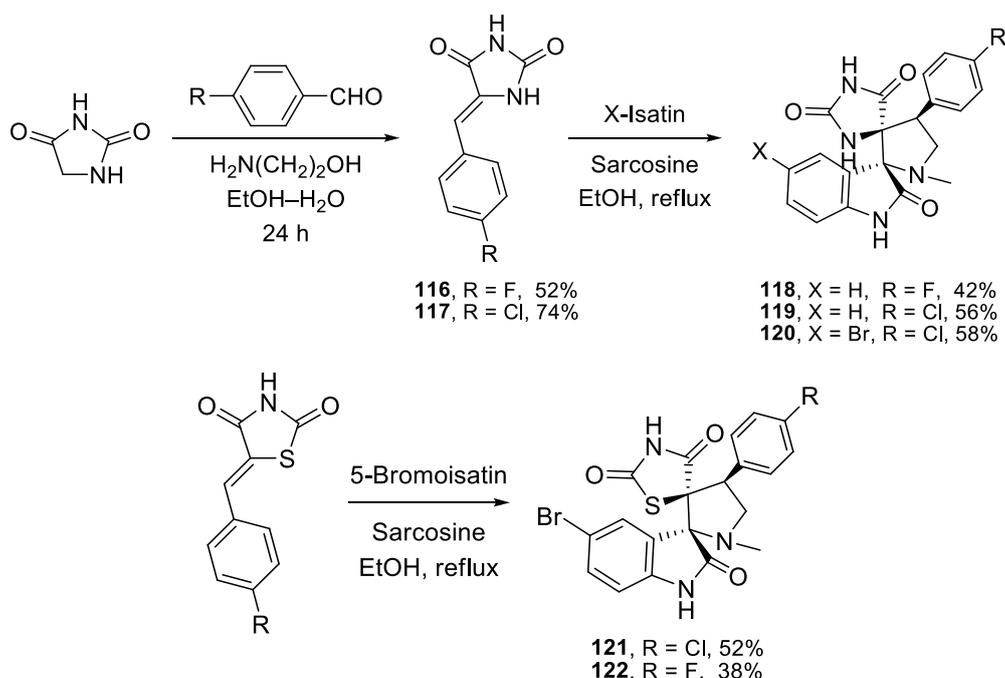


Рис. 5. Молекулярная структура соединения 124.

Диспиро- гидантоины **118–120** и 5-замещенные тиазолидины **121–122** получали взаимодействием соответствующих метилиденовых производных с саркозином и 5-бром-изатином в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения:

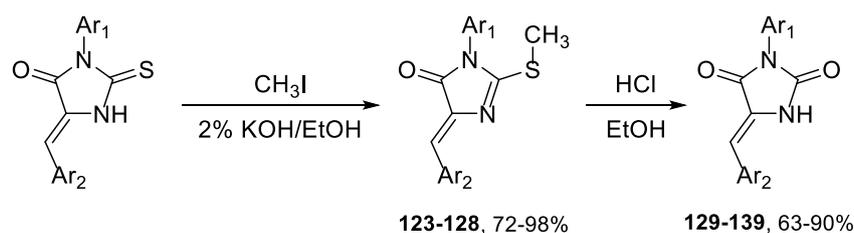


Для полученных производных была проведена оценка их цитотоксичности на модельных клеточных линиях: эпителия почки человеческого эмбриона HEK293T, карциномы молочной железы MCF7, эпителия карциномы легких A549, эпителия здорового легкого эмбриона человека VA13. На основании полученных данных можно сделать вывод об отсутствии цитотоксического эффекта для тиазолидиновых производных **121** и **122**; наименьшие значения IC_{50} ($6,6 \pm 1,6$ и $7,5 \pm 2,0$ мкМ) имеют гидантоиновые производные **118** и **119**, селективно действующие на клетки A549. Тиогидантоиновые производные **113–115** имеют промежуточную величину цитотоксичности IC_{50} на раковых линиях A549 и MCF7 ($55,1 \pm 4,5$; $39,6 \pm 2,3$ и $88,6 \pm 9,4$ мкМ), однако, нетоксичны для нераковых клеточных линий VA13 и HEK293T.

4. Синтез и биологическое тестирование диспироиндолинонов на основе 5-арилидензамещенных гидантоинов.

В связи с установленной активностью незамещенных гидантоиновых диспиропроизводных далее была синтезирована серия диспироиндолинонов на основе 5-арилиденгидантоинов и проведено исследование их цитотоксичности в сравнении с тиогидантоиновыми аналогами. Для оптимизации структуры диспироиндолинонов совместно с к.б.н., зав. Лабораторией медицинской химии и биоинформатики МФТИ Я.А. Иваненковым было проведено исследование их взаимодействия с гидрофобным карманом белка MDM2 при помощи статического трехмерного молекулярного докинга в программном обеспечении «ICM-Pro». Из данных докинга следует, что диспироиндолиноны, полученные из гидантоинов, лучше связываются с белком MDM2 по сравнению с аналогичными тиогидантоиновыми производными.

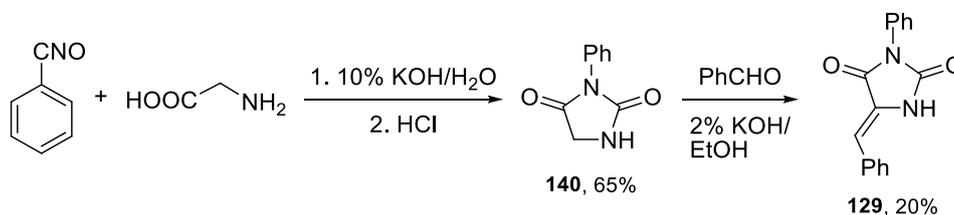
Гидантоины **129–139** были синтезированы из соответствующих S-алкилированных тиогидантоинов **123–128**:



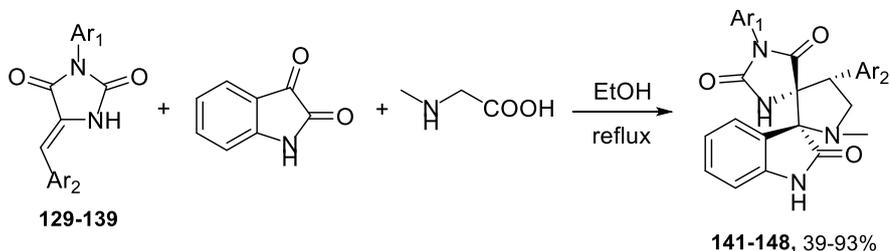
10 соединений:

Ar₁ = C₆H₅, 4-CH₃O-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄,
3-Cl-4-F-C₆H₃
Ar₂ = C₆H₅, 4-CH₃O-C₆H₄, 4-C₂H₅O-C₆H₄,
2-Cl-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄, 2-Br-C₆H₄, 4-F-C₆H₄,
3-Cl-4-F-C₆H₃

Для получения 5-арилиденгидантоинов также использовался фенилизотиоанат. Однако, выход реакции на стадии циклизации оказался низким:



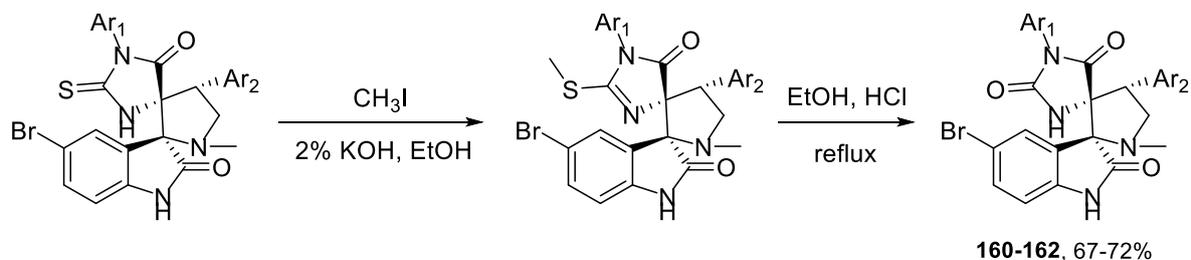
Полученные 5-арилиденгидантоины были затем введены в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с получением диспиропроизводных **141–148**:



8 соединений:

Ar₁ = C₆H₅, 4-CH₃O-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄,
3-Cl-4-F-C₆H₃
Ar₂ = C₆H₅, 4-CH₃O-C₆H₄, 4-C₂H₅O-C₆H₄,
2-Cl-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄, 2-Br-C₆H₄, 4-F-C₆H₄,
3-Cl-4-F-C₆H₃

При введении в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с 5-арилидензамещенными гидантоинами 5-бромизатина целевые продукты получить не удалось, и в смеси присутствовали только исходные соединения. Для получения продуктов в этом случае был использован альтернативный метод синтеза с первоначальным получением диспиропроизводных на основе 2-тиогидантоинов, их последующим алкилированием метилиодидом и заменой атома серы на кислород на последней стадии синтеза. Таким образом, были получены диспиропроизводные **160–162**:



3 соединений:
Ar₁ = C₆H₅, 4-C₂H₅O-C₆H₄, 3-Cl-4-F-C₆H₄
Ar₂ = 4-Br-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄

Молекулярная структура соединения **151** (Рис. 6) была установлена методом РСА, подтвердившим относительную конфигурацию стереоцентров (5'*R**,5*S**,4'*S**).

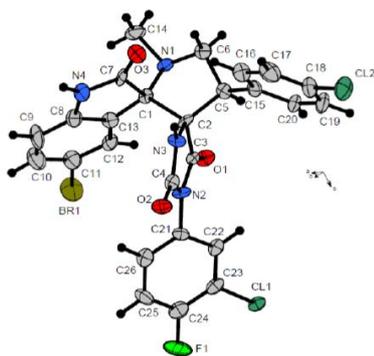


Рис 6. Молекулярная структура соединения **151**.

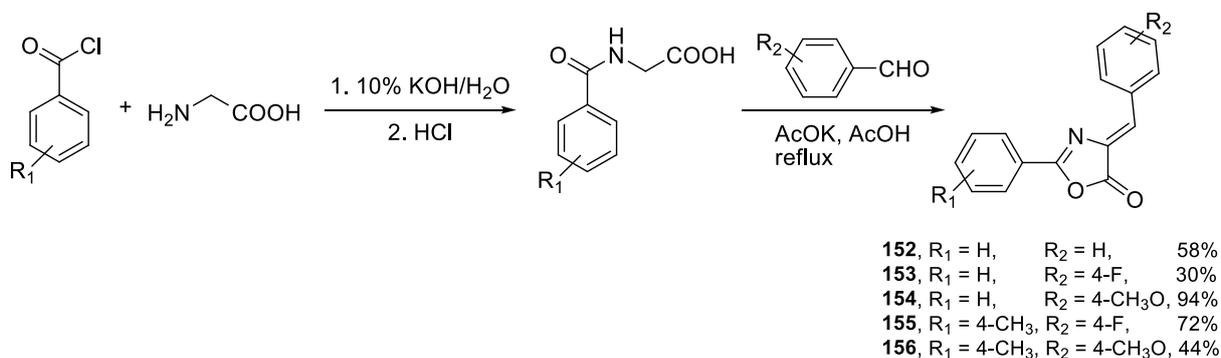
Оценка цитотоксичности полученных диспироиндолинонов **152–162** проводилась в МТТ-тесте на раковых клеточных линиях эпителия почки человеческого эмбриона НЕК293Т, карциномы протоков молочной железы МСF7, эпителия карциномы легких А549, эпителия здорового легкого эмбриона человека VА13. Дополнительно соединения были протестированы на р53-активацию на транскрипционном репортере. Соединения **161** и **162** продемонстрировали наилучший цитотоксический эффект на всех клеточных линиях (1,3–14,3 μМ), однако не проявили селективности по отношению к раковым клеткам. Соединения **155** и **156** показали селективность по отношению к клеточным линиям эпителия карциномы легких А549 с величинами цитотоксичности IC₅₀ = 6,6±1,6 и 7,5±2,0 μМ соответственно, однако, эти данные не были подтверждены р53 активацией на транскрипционном репортере.

По сравнению с аналогичными тиогидантоиновыми производными, диспиропроизводные на основе гидантоинов оказались более цитотоксичны.

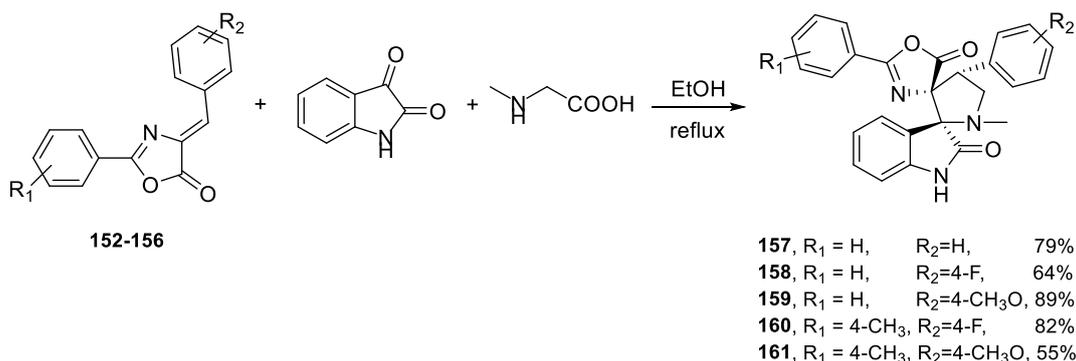
5. Синтез и биологическое тестирование диспироиндолинонов на основе 5-арилиденоксазолонов.

В ходе работы был также осуществлен синтез новых диспироиндолинонов, объединяющих в своей структуре индолиноновый и оксазолоновый фрагменты, реакцией 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов к 2-арил-5-арилметилензамещенным 1,3-оксазол-5(4*H*)-онам, и проведено тестирование цитотоксичности полученных соединений.

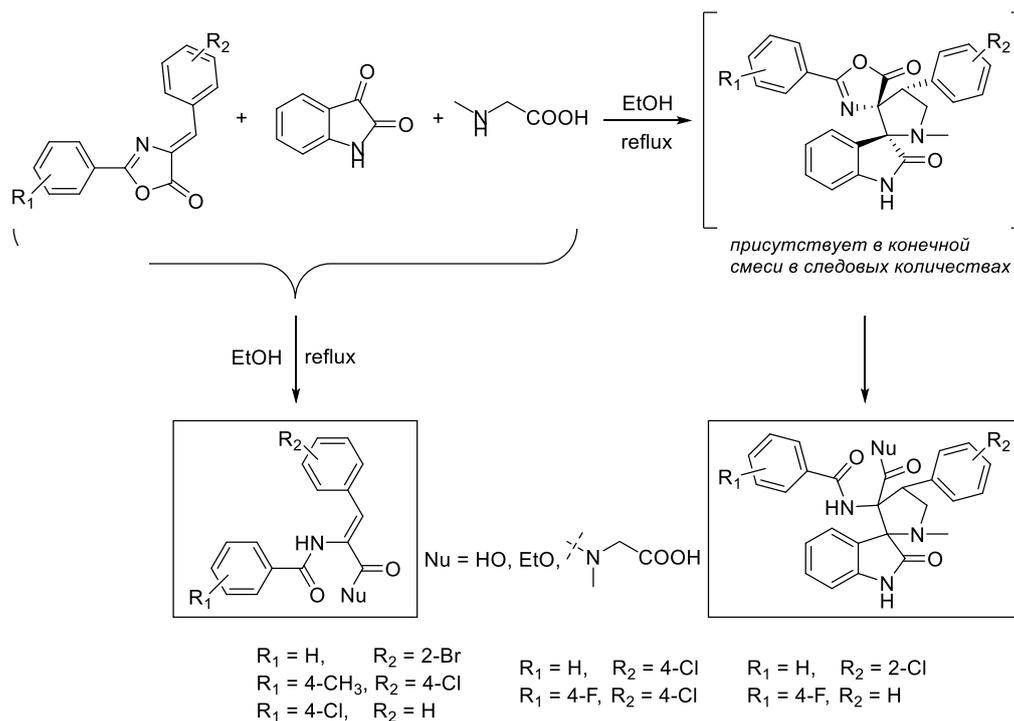
Исходные 2-арил-5-арилметилен-1,3-оксазол-5(4*H*)-оны **152–156** получали конденсацией производных гиппуровых кислот (N-ацилглицинов) с альдегидами. В свою очередь, гиппуровые кислоты синтезировали взаимодействием галогенангидридов замещенных бензойных кислот с глицином в щелочной среде:



Целевые диспироиндолиноны **157–161** получали реакцией 1,3-диполярного присоединения азометинилидов, генерируемых *in situ* из изатина и саркозина:



Следует отметить, что продукты 1,3-диполярного присоединения не удалось выделить при проведении реакций с оксазолонами, содержащими R₁ = F, Cl и/или R₂ = Cl, Br в ароматических заместителях оксазолонового фрагмента. Основными продуктами в этих случаях являются соединения, молекулярные массы которых соответствуют аддуктам раскрытия оксазолинового цикла исходных оксазолонов и их диспиропроизводных присутствующими в реакционной смеси нуклеофилами – этанолом, водой и саркозином – с образованием бензамидных производных:



Молекулярная структура соединения **159** приведена на Рис. 7А. В кристалле молекулы сокристаллизуются с молекулами этанола в соотношении 1:1. Молекулы этанола посредством водородных связей N-H...O и O-H...N (где O – атом кислорода этанола) образуют в кристалле бесконечные цепочки, чередуясь с молекулами вдоль кристаллографической оси b (см. Рис.7В).

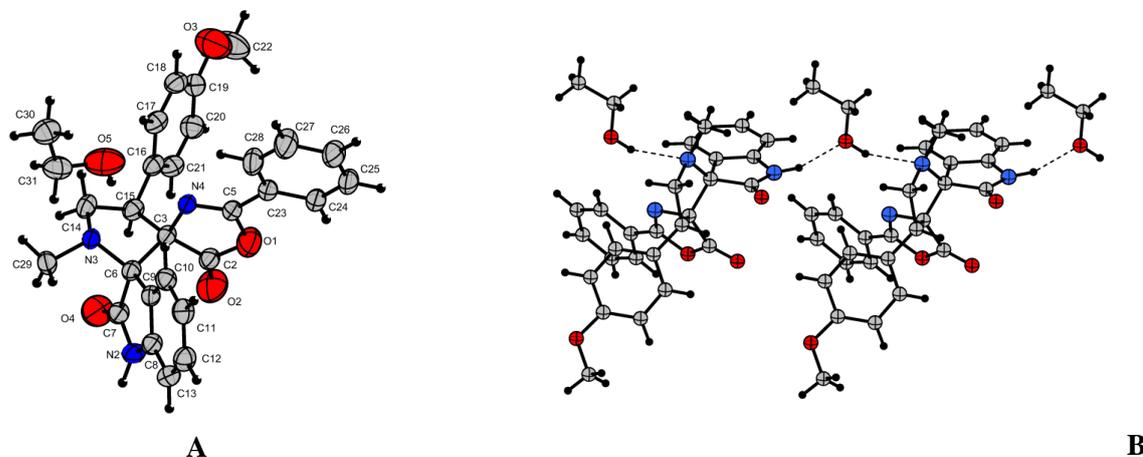


Рис 7. (А) Молекулярная структура соединения **159**. (В) Фрагмент упаковки молекул в кристалле соединения **159**, демонстрирующий образование цепочек чередующихся посредством водородных связей молекул. Водородные связи обозначены штриховыми линиями.

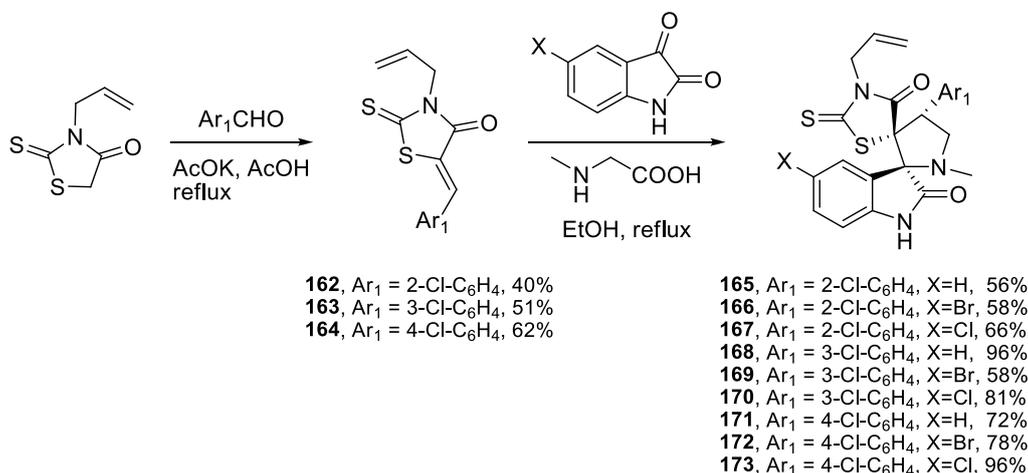
Все полученные диспироиндолиноны были протестированы *in vitro* на наличие противоопухолевой активности на клеточных культурах рака предстательной железы человека LNCap и PC3, колоректального рака HCT116^(+/+) и HCT116^(-/-), рака груди MCF7, карциномы легких человека A549, а также условно нормальной клеточной линии эмбриональных почек человека HEK и фибробластов легких (нераковых) VA13. Большая часть полученных соединений (**157–161**) не показала активности по отношению к исследуемым клеточным линиям. В то же время, наиболее эффективное соединение **161** показало высокую активность ($IC_{50} = 1,08 \pm 0,96$ мкМ) по отношению к p53-экспрессирующим клеткам LNCap и более низкую активность ($IC_{50} = 3,21 \pm 1,45$ мкМ) по отношению к неэкспрессирующим белок p53 клеткам PC3, однако, не показало никакой активности по отношению к клеткам HCT, как экспрессирующим (HCT+/+), так и не экспрессирующим (HCT-/-) p53. При сравнении данных по цитотоксичности диспирооксазолонов с предыдущими результатами для диспиротиоксоимидазолинонов можно сделать вывод, что изменение природы гетероцикла в исходном 1,3-диполярофиле приводит к получению класса соединений, лишь в отдельных случаях проявляющих выборочную активность к исследуемым клеточным культурам.

6. Синтез и биологическое тестирование диспироиндолинонов на основе 5-арилиденроданинов

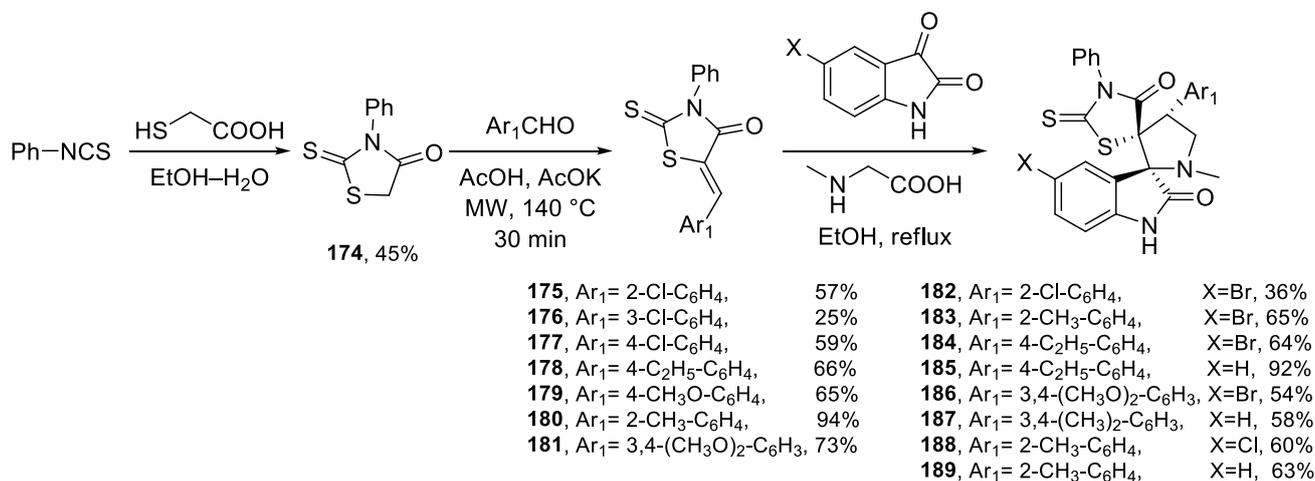
На заключительном этапе исследования, с учетом имеющихся литературных данных по противоопухолевой активности роданиновых производных, была получена серия N-аллил и N-

182–189, 204–210 и проведена оценка их биологической активности.

5-Арилидензамещенные 3-аллилроданины **162–164** были получены по известной методике конденсацией 3-аллилроданина с альдегидами в присутствии ацетата калия и далее введены в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с изатином и саркозином с получением диспиринопроизводных **165–173**.



Получение 5-арилидензамещенных 3-арилроданинов возможно двумя способами: исходя либо из арилизотиоцианатов, либо из ароматических аминов. По реакции фенилизотиоцианата с тиюксусной кислотой был получен роданин **174**, конденсация которого с альдегидами приводит к получению соединений **175–181**.



Структура соединения **184** была определена методом рентгеноструктурного анализа (Рис. 8), показавшего относительную (5'S*, 5R*, 4'R*) конфигурацию стереоцентров.

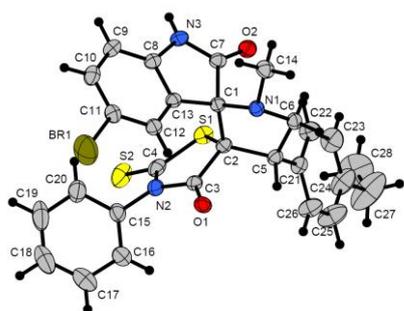
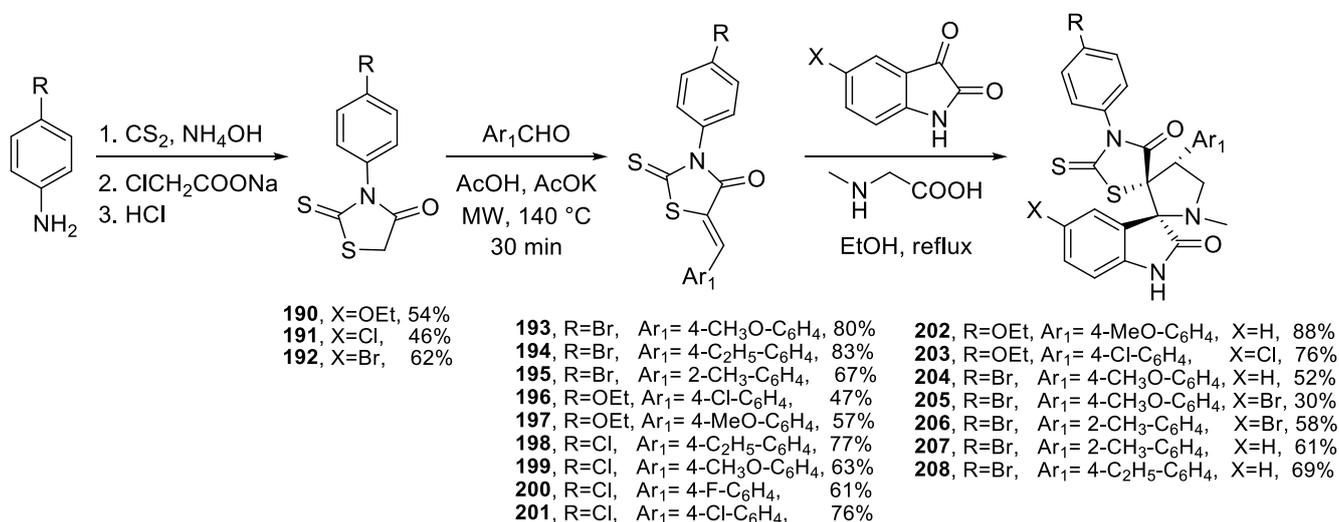


Рис 8. Молекулярная структура соединения **184**.

Далее проводили конденсацию полученных 3-арилроданинов **190–192** с альдегидами при микроволновом излучении в присутствии ацетата калия с получением соответствующих 5-арилидензамещенных роданинов **193–201**. На заключительной стадии 5-арилидензамещенные роданины **193–201** вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с саркозином и замещенным изатином в этаноле с получением целевых диспироданинов **202–208**.



Структура соединения **203** была подтверждена методом рентгеноструктурного анализа (Рис. 9), показавшего относительную (*5'S**, *5R**, *4'R**) конфигурацию стереоцентров.

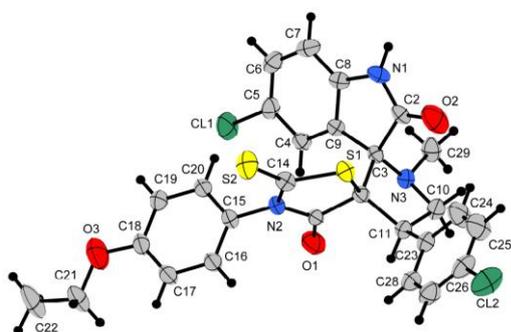


Рис 9. Молекулярная структура соединения **205**.

Дополнительно для полученных роданинов **165–173**, **182–189** и **204–210** было проведено исследование на цитотоксичность на опухолевых клеточных линиях рака груди

Для соединений **165–173**, **182–189** и **204–210** была проведена оценка их биологической активности на 60 типах опухолевых клеточных линий (NCI 60 cell lines). Было показано, что соединения **172** и **173** обладают значительной цитотоксичностью и селективностью на клеточных линиях рака почек различной морфологии.

MCF7, карциномы легких человека A549, а также условно нормальной клеточной линии эмбриональных почек человека НЕК и фибробластов легких (нераковых) VA13. Соединения **185** и **189** имеют значения цитотоксичности $IC_{50} = 5,3 \pm 0,7$ мкМ и $4,2 \pm 0,5$ мкМ на клеточной линии MCF7 и $IC_{50} = 7,1 \pm 0,5$ мкМ и $5,6 \pm 0,4$ мкМ на клеточной линии A549 соответственно. На неопухолевых клеточных линиях НЕК293Т и VA13 эти соединения показали на порядок меньший цитотоксический эффект ($IC_{50} = 13,9 \pm 1,7$ и $11,5 \pm 0,7$ мкМ соответственно).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан универсальный синтетический подход к новому классу N-арилзамещенных и N-незамещенных диспироиндолинонов на основе 2-тиоксотетрагидро-4Н-имидазол-4-онов. Предложен препаративно удобный метод получения данных соединений реакцией 5-арилметилена-2-тиоксотетрагидро-4Н-имидазол-4-онов, изатинов и N-замещенных глицинов.
2. Впервые показана возможность получения диастереомерно чистых диспиропроизводных тиогидантоинов с хиральными 1-фенилэтильными заместителями при атомах азота 2-тиогидантоинового и изатинового фрагментов.
3. Предложен удобный метод получения N-арилзамещенных и N-незамещенных диспиропроизводных 5-арилиденгидантоинов на основе соответствующих 5-арилиден-2-тиогидантоинов.
4. Разработаны методы получения диспиропроизводных 1,3-оксазолонов и роданинов, исходя из арилиденовых производных соответствующих гетероциклов, изатинов и саркозина.
5. При исследовании цитотоксичности полученных серий спиро- и диспироиндолинонов показан селективный цитотоксический эффект производных тиогидантоинов по отношению к клеткам колоректального рака HCT116, производных гидантоинов – по отношению к клеткам рака легкого A549, производных 1,3-оксазолонов – по отношению к клеткам рака простаты LNCap, производных роданинов – по отношению к клеткам рака почек.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Белоглазкина А.А.** и др. Синтез и исследование цитотоксичности новых диспиропроизводных 5-арилденноксазолонов – потенциальных ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2. / **Белоглазкина А.А.**, Скворцов Д.А., Тафеенко В.А., Мажуга А.Г., Зык Н.В., Белоглазкина Е.К. // Известия АН. Серия Химическая. -.2018. – V.3. – P.562-569. (IF = 0.809)
2. **Beloglazkina A. A.** et al. Synthesis and biological testing of (5Z)-2-aryl-5-arylmethylidene-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-ones as antimitotic agents. / **Beloglazkina A. A.**, Wobith B., Barskaia E. S., Zefirov N. A., Majouga A.G., Beloglazkina E. K., Zyk N.V., Kuznetsov S. A., Zefirova O. N. // Medicinal Chemistry Research. – 2016. – V.25. – № 6 – P.1239-1249. (IF = 1.607)
3. Барская Е.С. и др. Синтез и биотестирование 2-арил-5-арилметилензамещенных 1,3-оксазол-5(4H)-онов и N-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов в качестве аналогов комбретастина А-4. / Барская Е.С., **Белоглазкина А.А.**, Вобит Б., Зефилов Н.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Кузнецов С.А., Зефилова О.Н. // Известия АН. Серия Химическая. -.2015. – V.7. – P.1560-1563. (IF = 0.809)
4. Beloglazkina E.K., Majouga A.G.; Ivanenkov Y.A.; **Beloglazkina A.A.**; Kukushkin M.E.; Barashkin A.A. Method for the preparation of dispiroindolinones // Patent RU 201812301, June 25, 2018.
5. Ivanenkov Y.A.; Majouga A.G.; Beloglazkina E.K.; **Beloglazkina A.A.**; Veselov M.S.; Kukushkin M.E. New dispiro-indolinones, MDM2/p53 interaction inhibitors, method for production and application // Patent RU 2015113026, April 9, 2015.
6. Белоглазкина А.А., Кукушкин М.Е., Барашкин А.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К. Диспиропроизводные имидазол-4-онов и 1,3-оксазолонов – новый класс потенциальных противоопухолевых препаратов // *Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015»*. Сборник тезисов докладов. Красновидово. 18-21 января **2015**. – С. 59.
7. **Белоглазкина А.А.**, Кукушкин М.Е., Барашкин А.А., Иваненков Я.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Скворцов Д.А., Зык Н.В. Новый подход к синтезу диспироиндолинонов как низкомолекулярных ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на основе различных гетероциклических фрагментов. // *Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "KOST-2015"*. Сборник тезисов докладов. Москва. 18-23 октября **2015**. – С. 394.
8. **Beloglazkina A.A.**, Barashkin A.A., Ivanenkov Y.A., Majouga A.G., Beloglazkina E.K., Kukushkin M.E., Skvortsov D.A., Zyk N.V. Design and synthesis of novel small molecular inhibitors of p53-MDM2 interaction on the basis of various types of spiro-indolinones. // *XVI International*

Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry. Book of abstracts. Metz (France) 7-11 June 2015. – P. 85.

9. **Белоглазкина А.А.**, Барашкин А.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Имидазол-4-оны и их диспиропроизводные - новый класс потенциальных противоопухолевых препаратов. // *XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал.* – **2016.** – Т. 15. – № 1. – С. 10–11.

10. **Белоглазкина А.А.**, Кукушкин М.Е., Барашкин А.А., Иваненков Я.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Скворцов Д.А., Зык Н.В. Низкомолекулярные ингибиторы белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на основе спироиндолинонового фрагмента. // *I Всероссийская молодёжная школа-конференция “Успехи синтеза и комплексообразования”.* Сборник тезисов докладов. Москва. 25-28 апреля **2016.** – С. 49.

11. **Beloglazkina A.A.**, Kukushkin M.E., Barashkin A.A., Majouga A.G., Beloglazkina E.K., Ivanenkov Ya A., Zyk N.V. Synthesis and biological testing of novel inhibitors of protein-protein interaction p53-MDM2 on the base of dispirooxindolones. // *International conference «Dombay Organic Conference Cluster» (DOCC-2016). Book of abstracts.* Домбай. 28 мая – 4 июня **2016.** – С. 187.

12. **Beloglazkina A.A.**, Kukushkin M.E., Novotortsev V.K., Filatov V.E., Vorobyeva N.A., Skvortsov D.A., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G. Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small molecule inhibitors // *EFMC-ISMC 2016 XXIV International Symposium on Medicinal Chemistry. Book of abstracts.* Manchester (United Kingdom). 28 August – 1 September **2016.** – P. 138.

13. Белоглазкина А.А., Кукушкин М.Е., Барашкин А.А., Карпов Н.А., Мефедова С.О., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Противоопухолевые препараты на основе диспиропроизводных различных типов: синтез и биологическое тестирование // *Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней. Сборник тезисов докладов.* Красновидово. 13 – 18 января **2017.** С. 149.

14. **Белоглазкина А.А.**, Котовский Г.А., Барашкин А.А., Кунин М.А., Карпов Н.А., Кукушкин М.Е., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Доклинические исследования лекарственных средств на основе органического диспиропроизводного для терапии колоректального рака. // *XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал.* – **2017.** – Т. 16. – № S1. – С. 10–10.

15. Барашкин А.А., **Белоглазкина А.А.**, Котовский Г.А., Кунин М.А., Карпов Н.А., Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Разработка потенциальных противоопухолевых препаратов —

ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на основе диспироиндолинонов. // *XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты»*. Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – № S1. – С. 8–9.

16. **Белоглазкина А.А.** Противоопухолевые препараты ряда диспироиндолинонов на основе различных типов гетероциклических фрагментов// *XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017". Сборник тезисов докладов*. Москва. 10 – 14 апреля 2017.

17. **Beloglazkina A.A.**, Barashkin A.A., Kotovskii G.A., Kunin M.A., Karpov N.A., Kukushkin M.E., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Skvortsov D.A., Vorobyeva N.A., Majouga A.G. Novel anticancer drugs dispiro-oxindole series based on various types of heterocycles: synthesis and biological testing // *The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing». Book of abstracts*. Москва. 24 – 28 апреля 2017.

18. **Белоглазкина А.А.**, Барашкин А.А., Котовский Г.А., Кунин М.А., Карпов Н.А, Мефедова С.Р., Кукушкин М.Е., Белоглазкина Е.К., Скворцов Д.А., Воробьева Н.А., Мажуга А.Г., Зык Н.В. Новые противоопухолевые препараты ряда диспироиндолинонов на основе различных типов гетероциклических фрагментов // *VII Молодежная конференция ИОХ РАН. Сборник тезисов докладов*. Москва. 17 – 18 мая 2017. С. 17.

19. Kukushkin M.E., Novotortsev V.K., Filatov V.E., **Beloglazkina A.A.**, Vorobyeva N.A., Skvortsov D.A., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G. Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small molecule inhibitors. // *10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry. Book of abstracts*. Dubrovnik (Croatia). 25 – 28 June 2017. P. 65.

20. **А.А. Белоглазкина**, А.А. Барашкин, Н.А. Карпов, С.О. Мефедова, Е.К. Белоглазкина, Н.В. Зык, А.Г. Мажуга Использование реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения для получения диспиропроизводных на основе индолинона // *Всероссийская молодежная научная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»*. Сборник тезисов докладов. Шерегеш. 09 – 16 марта 2018. С. 43.

21. **Белоглазкина А.А.**, Барашкин А.А., Кукушкин М.Е., Мефедова С.Р., Карпов Н.А., Скворцов Д.А., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г. Синтез и биологическое тестирование низкомолекулярных ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на основе диспирозоединений // *V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии. Сборник тезисов докладов*. Владикавказ. 10 – 14 сентября 2018. С. 173.

22. Белоглазкина Е.К., Барашкин А.А., Кукушкин М.Е., **Белоглазкина А.А.**, Зык Н.В., Мажуга А.Г. Новые структурные типы спиро- и диспироиндолинонов – потенциальных ингибиторов

p53-MDM2 взаимодействия // V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии. Сборник тезисов докладов. Владикавказ. 10 – 14 сентября 2018. С. 50.

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю проф., д.х.н. Мажуге А.Г., а также проф., д.х.н. Белоглазкиной Е.К. и проф., д.х.н. Зыку Н.В. за чуткое руководство и всестороннюю поддержку; к.х.н., с.н.с. Скворцову Д.А., Кукушкину М.Е., Барашкину А.А., Кунину М.А., Карпову Н.А, Мефедовой С.Р., Полякову В.С. за помощь в работе и обсуждении результатов; а также Кузнецову Д.М. за помощь в подготовке автореферата к публикации. Автор благодарит к.х.н, с.н.с. Тафеенко В.С. за проведение рентгеноструктурного анализа, а также Петрова Р.А. и Комарова А.И. за помощь в проведении физико-химических исследований.