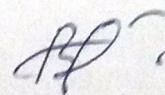


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



*На правах рукописи*

**ВАСИЛЕНКО Дмитрий Алексеевич**

**НОВЫЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ  
ИЗОКСАЗОЛОВ**

02.00.03 – органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза  
Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – **Аверина Елена Борисовна**  
доктор химических наук, доцент
- Официальные оппоненты** – **Брель Валерий Кузьмич**  
доктор химических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки «Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук»,  
заведующий лабораторией фосфорорганических соединений  
№ 112
- Элинсон Михаил Николаевич**  
доктор химических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки «Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского  
Российской академии наук», ведущий научный сотрудник  
лаборатории химии аналогов карбенов и родственных  
интермедиатов №1
- Ковалев Владимир Васильевич**  
доктор химических наук, главный научный сотрудник  
профессор кафедры химии нефти и органического катализа  
Химического факультета,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова».

Защита диссертации состоится «20» декабря 2017 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

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

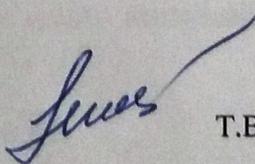
С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: [http://istina.msu.ru/dissertations/...](http://istina.msu.ru/dissertations/)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор химических наук, профессор



Т.В. Магдесиева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Хорошо известно, что производные изоксазолов обладают различными типами биоактивности, изоксазольный цикл входит в состав природных соединений и лекарственных препаратов. В частности, замещенными изоксазолами являются природные соединения – мусцимол, иботеновая кислота,  $\alpha$ -аминометилизоксазолпропионовая кислота (АМРА, агонист АМРА-рецептора). Фрагмент изоксазола входит в состав сульфамидных лекарственных препаратов (сульфизоксазолов), полусинтетических пенициллинов (оксациллин, клоксациллин и диклоксациллин), противоревматозных препаратов (лефлуноמיד), модуляторов центральной нервной системы (изокарбоксазид), соединений с антилепрозным действием, антагонистов тромбоцитарного фактора активации (РАФ), соединений с противовирусным, гиполипидемическим и ноотропным действием. Для оценки значимости изоксазольного кольца можно отметить, что по степени распространенности изоксазол занимает 33-е место среди 351 циклических систем, найденных в продаваемых на сегодняшний день лекарственных препаратах.

Для получения производных изоксазола заданного строения особую ценность имеют гетероциклы, содержащие функциональные группы, которые могут участвовать в различных химических превращениях, позволяющих осуществлять синтез молекул с необходимыми свойствами, что особенно важно для фармацевтики. Огромное число описанных в литературе реакций, приводящих к образованию изоксазольного цикла, в большинстве случаев можно отнести к двум основным синтетическим подходам: реакции конденсации гидросиламина с 1,3-дизэлектрофилами и реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилоксидов (или их синтетических аналогов) к алкенами и алкинам. Эти реакции, как правило, имеют ограничения по возможности получения соединений с несколькими функциональными группами, связанными с гетероциклом, а также не всегда протекают региоселективно. В связи с этим разработка новых методов синтеза производных изоксазолов и изучение синтетических подходов к гетероциклам заданной структуры является, безусловно, актуальной проблемой органической и медицинской химии.

Ранее в нашей группе был разработан общий препаративный метод синтеза функционализированных 5-нитроизоксазолов на основе реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием тетранитрометана (ТНМ), активированного триэтиламино (ТЭА). Метод позволяет синтезировать широкий спектр неизвестных ранее нитрозамещенных изоксазолов, содержащих дополнительную функциональную группу в положении 3 гетероцикла и представляющих большой интерес для использования в синтетической практике. Данная работа является развитием и новым этапом исследований реакции гетероциклизации электрофильных алкенов и направлена на разработку новых подходов к структурам с заданными свойствами.

**Целью работы** явилось изучение новых типов электрофильных алкенов в реакции гетероциклизации под действием активированного ТНМ, разработка на основе этой реакции препаративных методов синтеза новых производных изоксазола, целевой синтез гетероциклов с

необходимыми структурными фрагментами для изучения их биоактивности, а также установление соотношения «структура-активность» для синтезированных соединений.

**Научная новизна.** Впервые в реакции гетероциклизации под действием комплекса ТНМ-ТЭА были изучены электрофильные диены, содержащие два реакционных центра (две двойные связи) в молекуле, с целью получения изоксазолов димерного строения.

Было найдено, что введение арильного заместителя в  $\beta$ -положение  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного кетона принципиально меняет направление гетероциклизации и приводит к образованию 4-нитроизоксазолов. Новая реакция была систематически изучена на большом числе примеров, был продемонстрирован ее общий характер, и на ее основе разработан эффективный метод синтеза арилзамещенных 4-нитроизоксазолов.

На основе синтетически доступных электрофильных алкенов разработан новый универсальный метод синтеза 5-аминоизоксазолов, включающий реакцию гетероциклизации и последующее восстановление нитрозамещенных изоксазолов.

Найдена новая реакция восстановления 5-нитроизоксазолов, приводящая к неизвестному ранее типу производных изоксазола – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолам. Найдены основные закономерности реакции, на ее основе разработан препаративный метод синтеза новых производных изоксазола.

На основе реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием комплекса ТНМ-ТЭА создана новая универсальная стратегия для целевого синтеза производных изоксазола с определенными структурными фрагментами, включающая получение ненасыщенных сложных эфиров, их последующую гетероциклизацию и восстановление нитрозамещенных изоксазолов.

Синтезированы три большие серии новых 5-аминоизоксазолов, для которых были предсказаны противовирусная, противораковая (антимитотическая) и нейропротекторная типы активности, а также ряд 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов с предсказанной антиоксидантной активностью.

Впервые экспериментально установлено, что 5-аминоизоксазолы, содержащие адамантановый фрагмент в сложноэфирной группе, проявляют противовирусную активность по отношению к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) в диапазоне микромолярных концентраций при низкой цитотоксичности. Найдены корреляции между структурой идентифицированных ингибиторов репродукции вируса и противовирусной активностью.

Показано, что 5-аминоизоксазолы, содержащие алкоксиарильные заместители, обладают умеренной антимитотической активностью по отношению к карциноме легких клеточной линии A549.

Впервые было найдено, что 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолы, содержащие адамантановый фрагмент в молекуле, проявляют высокую антиоксидантную активность и высокую ингибирующую активность по отношению к липоксигеназе (LOX-1).

**Теоретическая значимость.** Найденные новые реакции гетероциклизации и разработка новых методов синтеза производных изоксазола расширяют теоретические представления об

особенностях формирования N,O-пятичленных гетероциклов и вносят новый вклад в развитие синтетических методов органической и медицинской химии.

**Практическая значимость.** Разработаны новые препаративные методы синтеза функционализированных 5-нитроизоксазолов димерного строения и арилзамещенных 4-нитроизоксазолов на основе реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием комплекса ТНМ-ТЭА. Найдены оптимальные условия восстановления 5-нитроизоксазолов, в результате чего разработаны удобные двухстадийные методы синтеза 5-аминоизоксазолов и неизвестных ранее производных изоксазола – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]-изоксазолов из синтетически доступных электрофильных алкенов. С использованием разработанных нами синтетических методов предложена универсальная методология, позволяющая получать производные изоксазола с заданными структурными фрагментами. Получен большой ряд новых 5-нитро-, 4-нитро- 5-амино- и 5-гидроксиламиноизоксазолов, содержащих карбонильные, ароматические, гетероциклические фрагменты и функциональные группы. Для трех серий 5-аминоизоксазолов была экспериментально изучена и выявлена их противовирусная, антимиотическая и нейропротекторная активности, для ряда 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов была обнаружена антиоксидантная активность и ингибирующая активность по отношению к липоксигеназе.

**Положения, выносимые на защиту:**

- Использование реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием комплекса ТНМ-ТЭА для синтеза бис(5-нитроизоксазолов) и разработка метода синтеза производных изоксазола димерного строения.

- Систематическое изучение новой реакции гетероциклизации  $\beta$ -арилзамещенных винилкетонов, приводящей к арилзамещенным 4-нитроизоксазолам и разработка нового препаративного метода синтеза 4-нитроизоксазолов.

- Оптимизация условий реакции восстановления 5-нитроизоксазолов и разработка препаративных методов синтеза 5-аминоизоксазолов и неизвестных ранее производных изоксазола – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов.

- Разработка надежной и высокоэффективной стратегии целевого синтеза производных изоксазолов с необходимыми структурными фрагментами в молекуле.

- Целевой синтез новых производных изоксазола – трех серий 5-аминоизоксазолов и ряда 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов с целью поиска соединений-лидеров, обладающих в зависимости от строения противовирусной, антимиотической, нейропротекторной и антиоксидантной типами активности.

- Экспериментальное исследование биоактивности синтезированных производных изоксазола и выявление соединений, обладающих противовирусной, антимиотической, нейропротекторной или антиоксидантной активностью, а также ингибирующей активностью по отношению к липоксигеназе (LOX-1), изучение корреляций «структура-свойство».

**Личный вклад автора** состоит в подборе и анализе литературы, постановке промежуточных задач, планировании и проведении синтетических процедур, подготовке соединений к изучению их физико-химических и биологических свойств, анализе полученных

результатов, в проведении квантово-химических расчетов, подготовке материалов к публикации в научных журналах, представлении ключевых результатов работы на конференциях.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертационной работы опубликовано 22 печатные работы: 4 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых виртуальными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 18 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях. Результаты работы были представлены, в том числе, на следующих конференциях: International Conference "Molecular Complexity in Modern Chemistry" (Москва, 2014), XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, 2015), IV Всероссийская конференция по органической химии и XVIII Молодежная школа-конференция по органической химии (Москва, 2015), 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChemRussia 2015 (Новосибирск, 2015), Anatolian Conference on Synthetic Organic Chemistry (Анталия, Турция, 2015), Всероссийская Симпозиум: Второй Междисциплинарный Симпозиум по медицинской, органической и биологической химии – 2015 (Новый свет, Крым, 2015), Dombay Organic Conference Cluster DOCC-2016 (Домбай, 2016), XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChemRussia 2017 (Казань, 2017).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 175 страницах машинописного текста и состоит из 6 разделов: введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Список литературы включает 326 наименования.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

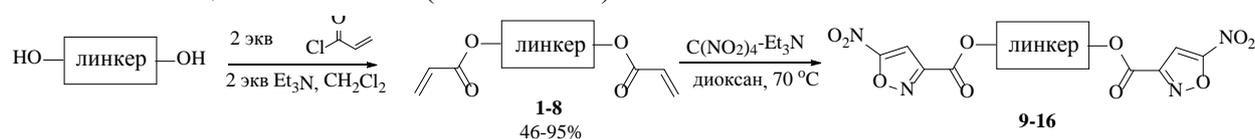
Ранее в нашей лаборатории была найдена новая реакция гетероциклизации электрофильных алкенов под действием тетранитрометана (ТНМ), активированного триэтиламинол (ТЭА), приводящая к 5-нитроизоксазолам, содержащим дополнительные функциональные группы в третьем положении гетероцикла. При этом в реакции гетероциклизации изучались исключительно электрофильные алкены мономерного строения, из которых образовывались соединения, содержащие один гетероциклический фрагмент в молекуле.

Предметом исследования данной диссертационной работы является синтез различных новых производных изоксазола на основе реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием комплекса ТНМ-ТЭА и целевой синтез гетероциклов с прогнозируемой биоактивностью. Исследование включает следующие этапы: 1) изучение в реакции гетероциклизации новых типов электрофильных алкенов; 2) разработку препаративных методов синтеза новых производных изоксазола на основе реакций восстановления нитроизоксазолов; 3) целевой синтез изоксазолов определенного строения с ожидаемой биоактивностью; 4) изучение биоактивности гетероциклов ряда изоксазола, полученных в ходе целевого синтеза.

## 1. Изучение электрофильных алкенов димерного строения в реакциях гетероциклизации под действием ТНМ-ТЭА

Известно, что бис(гетероциклические) соединения представляют интерес в качестве бивалентных лигандов, которые могут проявлять высокую биоактивность. В связи с практической значимостью димерных гетероциклов в настоящей работе впервые в реакции гетероциклизации под действием комплекса ТНМ-ТЭА были изучены диены, содержащие два реакционных центра (две электрофильные двойные связи) в молекуле. Препаративно доступным классом соединений данного структурного типа являются ненасыщенные сложные эфиры, которые легко синтезируются реакцией ацилирования диолов. Для синтеза бис(эфиров) **1-8** использовались диолы, содержащие в качестве линкера между двумя функциональными группами линейную алифатическую цепочку различной длины, ароматическое кольцо или каркасный фрагмент. Гетероциклизацию диенов **1-8** проводили в условиях, описанных для непредельных эфиров карбоновых кислот, в результате чего была получена серия бис(изоксазолов) **9-16** с хорошими препаративными выходами (табл. 1).

Таблица 1. Синтез бис(изоксазолов) **9-16**



Бис(5-нитро-изоксазол)	Линкер	Выход, %*	Бис(5-нитро-изоксазол)	Линкер	Выход, %*
<b>9</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	46	<b>13</b>		22
<b>10</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	55	<b>14</b>		51
<b>11</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	64	<b>15</b>		65
<b>12</b>		32	<b>16</b>		43

\*Выходы указаны для хроматографически очищенных соединений

Оказалось, что в случае линейных линкеров выходы изоксазолов **9-11** зависят от расстояния между реакционными центрами и растут в ряду гетероциклов **9-11**. Бензилсодержащие изоксазолы **12** и **13** характеризуются более низкими выходами по сравнению с алкилзамещенными аналогами за счет возможного окисления по бензильному положению.

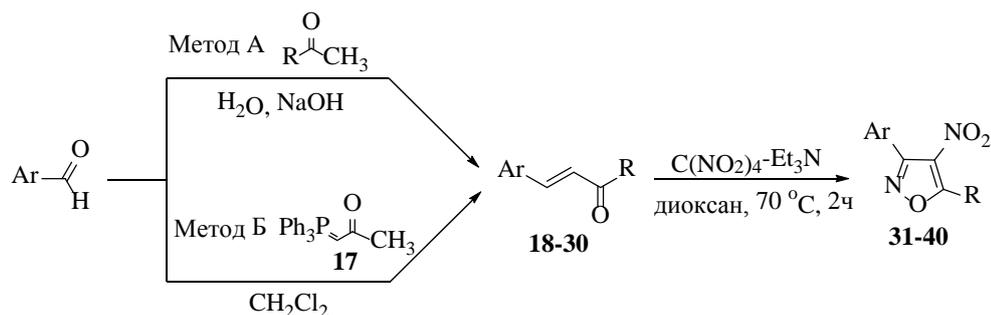
Димерная структура бис(изоксазолов) **9-16** подтверждена данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, а также рентгеноструктурным анализом на примере соединения **11**.

## 2. Изучение $\beta$ -арилзамещенных $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов в реакциях гетероциклизации

При попытке ввести в гетероциклизацию под действием комплекса ТНМ-ТЭА  $\beta$ -арилзамещенные винилкетоны мы неожиданно обнаружили, что реакция протекает с хемоселективным образованием 4-нитроизоксазолов. Таким образом, было найдено, что введение арильного заместителя в молекулу ненасыщенного кетона принципиально меняет направление гетероциклизации. В рамках настоящей диссертационной работы предполагалось изучить новую реакцию гетероциклизации арилзамещенных алкенов на большой серии объектов, чтобы установить основные закономерности протекания и показать ее общий характер.

Исходные арилзамещенные электрофильные алкены **18-30**, необходимые для изучения в реакции гетероциклизации, были получены с хорошими выходами из ароматических альдегидов с использованием реакции конденсации альдегидов с метилкетонами (метод А) или по реакции Виттига (метод Б). Далее алкены **18-30** были введены в реакцию гетероциклизации под действием комплекса ТНМ-ТЭА, полученные результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Синтез  $\beta$ -арилзамещенных  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов и их гетероциклизация под действием комплекса ТНМ-ТЭА



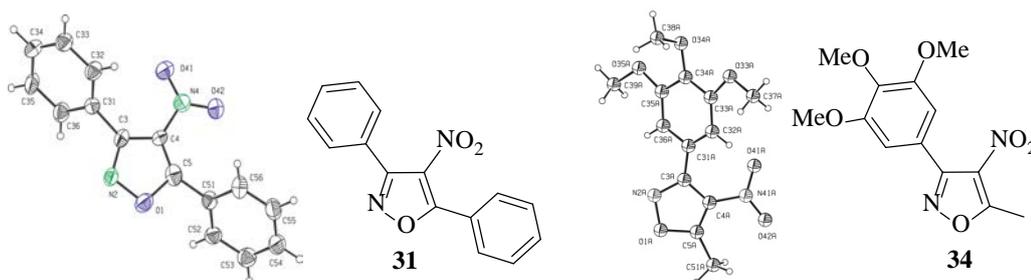
Ar	R	Алкен, выход, %* (Метод)	4-Нитроизоксазол, выход, %*
		<b>18</b> , 85 (А)	<b>31</b> , 63
	Me	<b>19</b> , 77 (А)	<b>32</b> , 44
	Me	<b>20</b> , 82 (А)	<b>33</b> , 73
	Me	<b>21</b> , 44 (А)	<b>34</b> , 71
	Me	<b>22</b> , 53 (Б)	<b>35</b> , 52
	Me	<b>23</b> , 95 (Б)	<b>36</b> , 39
	Me	<b>24</b> , 36 (Б)	<b>37</b> , 42

	Me	<b>25</b> , 75 (Б)	<b>38</b> , 68
		<b>26</b> , 93 (А)	<b>39</b> , 30
	Me	<b>27</b> , 33 (А), 75 (Б)	<b>40</b> , 32
	Me	<b>28</b> , 83 (Б)	---
	Me	<b>29</b> , 78 (Б)	---
	CF <sub>3</sub>	<b>30</b> , 46 (А)	---

\* Выходы указаны для хроматографически очищенных соединений.

Реакция гетероциклизации для большинства алкенов протекает гладко с хорошими выходами. Более низкие выходы в случае некоторых гетероциклов связаны с лабильностью заместителей в условиях реакции (соединение **37**) или со сложностью выделения продукта реакции, примеры **36**, **39** и **40**. Оказалось, что алкен **28**, содержащий гидроксигруппу в ароматическом кольце, в реакции с тетранитрометаном образует сложную смесь продуктов. Алкены **29** и **30** не вступают в реакцию гетероциклизации, что может быть связано со спецификой их строения (наличие дополнительных электроноакцепторных групп в молекуле алкена).

Строение всех полученных 4-нитроизоксазолов **31-40** установлено на основании данных спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, состав подтвержден данными масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS-ESI) или элементного анализа. Структура 4-нитроизоксазолов была однозначно доказана с использованием метода рентгеноструктурного анализа на примере соединений **31** и **34** (рис. 1).



**Рисунок 1.** Данные рентгеноструктурного анализа 3,5-дифенил-4-нитроизоксазола **31** и 5-метил-4-нитро-3-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазола **34**

Таким образом, на основе реакции гетероциклизации β-арилзамещенных α,β-ненасыщенных кетонов разработан новый препаративный метод синтеза 3-арилзамещенных 4-нитроизоксазолов, позволяющий получать широкий круг гетероциклов с разнообразными заместителями.

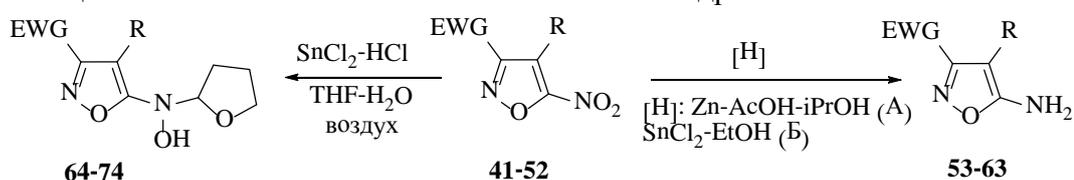
### **3. Изучение 5-нитроизоксазолов в реакциях восстановления. Синтез 5-амино- и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов**

До наших работ 5-нитроизоксазолы в реакции восстановления не изучались. В связи с лабильностью изоксазольного цикла для их восстановления был опробован ряд мягких

восстановительных систем, таких как Zn/NH<sub>4</sub>Cl, Zn/AcOH, Fe/CaCl<sub>2</sub>, SnCl<sub>2</sub>/HCl, SnCl<sub>2</sub>/EtOH, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O/Ni<sub>Ra</sub>, HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>-Pd/C, Al/Hg.

5-Нитроизоксазолы хемоселективно восстанавливаются в соответствующие 5-аминоизоксазолы только при использовании систем Zn/AcOH/*i*-PrOH или SnCl<sub>2</sub>/EtOH. В первом случае (метод А) наибольший выход аминоизоксазола при полной конверсии исходного нитроизоксазола был получен в реакции с 10-кратным мольным избытком цинка при пониженной температуре (0-(-10)°C) и выдерживании реакционной смеси в течение 3-5 часов. Примерно тот же результат был получен при использовании 5-кратного мольного избытка восстановителя SnCl<sub>2</sub>/EtOH (метод Б) по отношению к 5-нитроизоксазолам. При этом реакция протекала при комнатной температуре и завершалась за 2 ч (табл. 3). Общий характер реакции был продемонстрирован на большой серии гетероциклов, результаты приведены в таблице 3.

**Таблица 3.** Синтез 5-аминоизоксазолов **53-63** и 5-гидроксиламиноизоксазолов **64-74**



5-Нитро-изоксазол	EWG	R	Амин	Выход 5-амино-изоксазола, %*	Гидроксил-амин	Выход гидроксил-амин, %*
<b>41</b>	C(O)Me	H	<b>53</b>	50 (А), 55 (Б)	<b>64</b>	57
<b>42</b>	C(O)Et	H	<b>54</b>	40 (А), 49 (Б)	<b>65</b>	53
<b>43</b>	C(O)Ph	H	<b>55</b>	50 (Б)	<b>66</b>	54
<b>44</b>	-C(O)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -		<b>56</b>	48 (Б)	<b>67</b>	68
<b>45</b>	COOMe	H	<b>57</b>	73 (А), 60 (Б)	<b>68</b>	77
<b>46</b>	COOBu <sup>t</sup>	H	<b>58</b>	45 (А), 25 (Б)	<b>69</b>	65
<b>47</b>	COOCH <sub>2</sub> Ph	H	<b>59</b>	72 (Б)	<b>70</b>	68
<b>48</b>	COOEt	Et	<b>60</b>	70 (Б)	<b>71</b>	70
<b>49</b>	COOEt	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl	<b>61</b>	65 (Б)	<b>72</b>	71
<b>50</b>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	H	<b>62</b>	90 (Б)	<b>73</b>	82
<b>51</b>	C(O)NH <sub>2</sub>	H	<b>63</b>	50 (Б)	--	--
<b>52</b>	NO <sub>2</sub>	H	--	--	<b>74</b>	46

\*Выходы указаны для хроматографически очищенных соединений. В скобках указаны восстановительные системы.

5-Аминоизоксазолы **53-63** были получены с хорошими препаративными выходами. При восстановлении нитроизоксазолов **48-50** для достижения полной конверсии необходимо было увеличить избыток восстановителя (7-10 экв) и использовать более длительное время проведения реакции (3 ч).

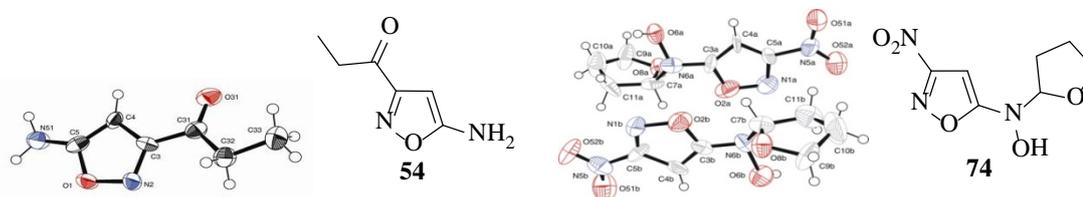
В ходе изучения 5-нитроизоксазолов в условиях реакции восстановления мы обнаружили, что при использовании в качестве восстановителя системы SnCl<sub>2</sub>/HCl в смеси

растворителей ТГФ-Н<sub>2</sub>О (1:1) образуются необычные продукты реакции – 5-гидроксиламиноизоксазолы, содержащие фрагмент тетрагидрофурана в молекуле (табл. 3). Мы провели оптимизацию условий найденной новой реакции с варьированием соотношения реагентов, времени и температуры. Оказалось, что при использовании тщательно очищенного ТГФ в реакции восстановления 5-нитроизоксазолов соответствующие гидроксиламины не образуются. Мы предположили, что эта реакция носит радикальный характер с участием перекисных производных тетрагидрофурана, образующихся при хранении.

Было найдено, что необходимым условием образования 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов является предварительное продувание ТГФ воздухом в течение длительного времени (не менее 20 ч). Реакция протекает в течение 2-3 часов с полной конверсией при соотношении реагентов 5-нитроизоксазол:SnCl<sub>2</sub> = 1:3 и температуре 0-(+5)<sup>o</sup>C.

Большая серия гидроксиламинов **64-74** различного строения была получена с хорошими препаративными выходами. Следует отметить, что при восстановлении 3,5-динитроизоксазола **52** в стандартных условиях и с двукратным избытком SnCl<sub>2</sub> образуется исключительно продукт восстановления только одной нитрогруппы.

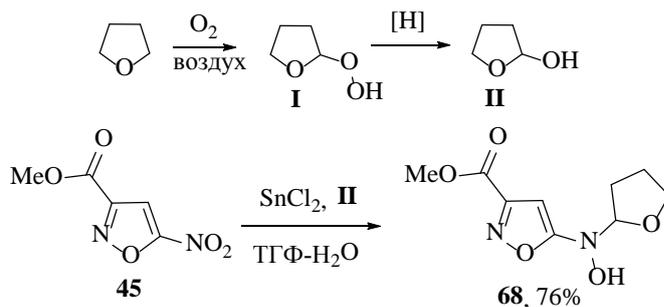
Строение всех полученных 5-аминоизоксазолов **53-63** и 5-гидроксиламинов **64-74** установлено на основании данных спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, состав подтвержден данными масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS-ESI) или элементного анализа. Структура 5-аминоизоксазолов на примере соединения **54** и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов на примере соединения **74** были подтверждены данными РСА (рис. 2).



**Рисунок 2.** Данные РСА 1-(5-аминоизоксазол-3-ил)пропан-1-она (**54**) и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]-3-нитроизоксазола (**74**)

На основании полученных нами результатов и литературных данных мы предположили, что процесс образования N-тетрагидрофурансодержащих гидроксиламинов может протекать с участием  $\gamma$ -бутиролактола (**II**), который образуется в результате разложения перекиси ТГФ (**I**) – продукта барботирования тетрагидрофурана воздухом (схема 1). Для подтверждения такого предположения на модельном 5-нитроизоксазоле **45** мы провели реакцию его восстановления SnCl<sub>2</sub> в среде ТГФ-Н<sub>2</sub>О с использованием абсолютного ТГФ в присутствии 1.5 экв  $\gamma$ -бутиролактола или в его отсутствие. Оказалось, что при добавлении  $\gamma$ -бутиролактола образование гидроксиламина **68** происходит с высоким выходом (76%), в то время как при использовании свежеперегнанного ТГФ реакция не идет.

### Схема 1



Таким образом, в результате изучения реакций восстановления 5-нитроизоксазолов мы разработали удобный двухстадийный регио- и хемоселективный метод синтеза 5-аминоизоксазолов, а также нашли новую реакцию восстановления 5-нитроизоксазолов, и разработали метод синтеза неизвестного ранее структурного типа гетероциклов – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов.

#### 4. Целевой синтез 5-амино- и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов для изучения биоактивности

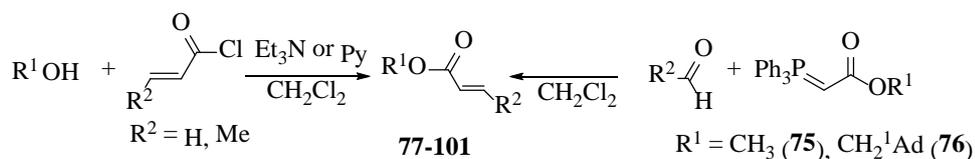
Разработанные нами методы синтеза новых производных изоксазола были использованы для целевого синтеза гетероциклов с необходимыми структурными фрагментами, отвечающими за определенные типы биоактивности. Совместно с сотрудниками нашей кафедры мы провели анализ структур изоксазолов различного строения и выбрали для синтеза три серии 5-аминоизоксазолов с потенциальной противовирусной (содержащих каркасные адамантановые и бициклононанные фрагменты в молекуле), антимиотической (содержащих алкоксиарильные заместители) и нейропротекторной (содержащих алкилфенильный заместитель в сложноэфирной группе или в положении 4 гетероцикла) типами активностей, а также ряд 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов с предполагаемой антиоксидантной активностью.

Для синтеза перспективных изоксазолов мы разработали синтетическую стратегию, включающую получение электрофильных алкенов определенного строения, которые далее использовали в реакции гетероциклизации под действием активированного тетранитрометана. Полученные 5-нитроизоксазолы, вводили в реакцию восстановления нитрогруппы с целью получения соответствующих целевых 5-аминоизоксазолов и 5-гидроксиламиноизоксазолов.

##### 3.4.1. Синтез электрофильных алкенов 77-102

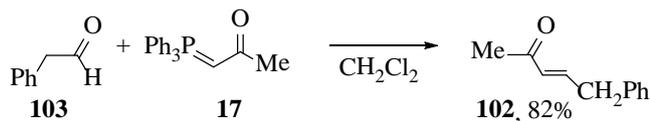
Синтез сложных эфиров осуществляли с использованием реакции ацилирования спиртов или реакции Виттига (схема 2, табл. 4).

### Схема 2



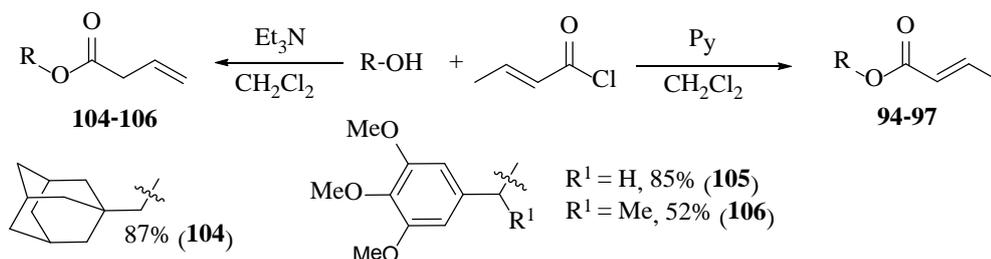
Непредельные сложные эфиры **98-101** (схема 2, табл. 4), а также  $\alpha,\beta$ -непредельный кетон **102** (схема 3) были получены по реакции Виттига.

### Схема 3



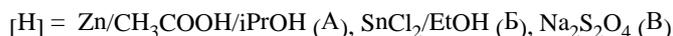
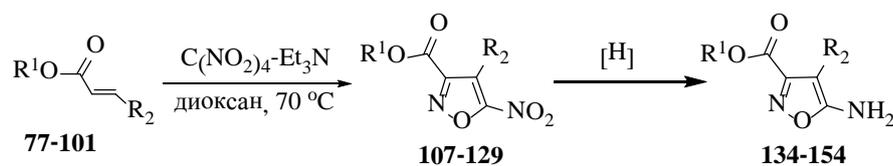
Сложные эфиры **77-93** были получены с хорошими препаративными выходами ацилированием спиртов хлорангидридом акриловой кислоты в присутствии триэтиламина в качестве основания (табл. 4). Мы обнаружили, что при использовании в тех же условиях хлорангидрида кротоновой кислоты вместо ожидаемых эфиров  $\alpha,\beta$ -ненасыщенной кислоты образуются продукты миграции двойной связи – сложные эфиры бут-3-еновой кислоты (соединения **104-106**, схема 4)

### Схема 4

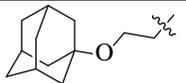
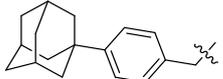
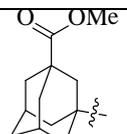
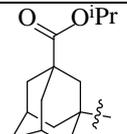
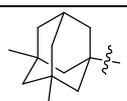
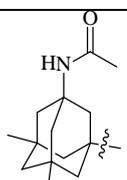
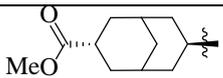
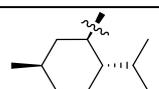
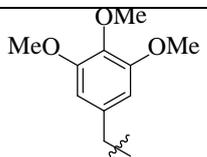
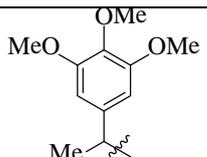
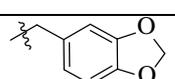
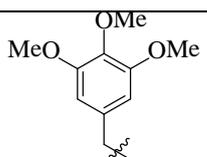
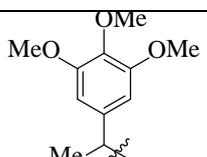


В связи с этим потребовалась оптимизация условий ацилирования. Были изучены различные условия ацилирования (Zn/бензол или  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , NaN/TГФ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  без растворителя,  $\text{Py}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), и было найдено, что только при использовании пиридина в условиях низкой концентрации реагентов (пятикратное разбавление) в хлористом метиле образуются целевые алкены **94-97** (табл. 4).

**Таблица 4.** Синтез электрофильных алкенов **77-101**, 5-нитроизоксазолов (**107-129**) и 5-аминоизоксазолов (**134-154**)



$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	Алкен, выход %*	5-Нитроизоксазол, выход %*	5-Аминоизоксазол, выход %*
	H	<b>77</b> , 84	<b>107</b> , 57	<b>134</b> , 62 (А)
	H	<b>78</b> , 90	<b>108</b> , 58	<b>135</b> , 67 (Б)
	H	<b>79</b> , 83	<b>109</b> , 68	<b>136</b> , 75 (Б)
	H	<b>80</b> , 78	<b>110</b> , 84	<b>137</b> , 78 (Б)

	H	<b>81, 72</b>	<b>111, 55</b>	<b>138, 52 (B)</b>
	H	<b>82, 82</b>	<b>112, 36</b>	<b>139, 56 (B)</b>
	H	<b>83, 52</b>	<b>113, 44</b>	<b>140, 55 (B)</b>
	H	<b>84, 61</b>	<b>114, 33</b>	<b>141, 68 (B)</b>
	H	<b>85, 54</b>	<b>115, 63</b>	<b>142, 34 (A)</b>
	H	<b>86, 43</b>	<b>116, 32</b>	<b>143, 65 (B)</b>
	H	<b>87, 50</b>	<b>117, 44</b>	<b>144, 49 (B)</b>
	H	<b>88, 85</b>	<b>118, 67</b>	<b>145, 88 (B)</b>
	H	<b>89, 70</b>	<b>119, 38</b>	<b>146, 67 (B)</b>
	H	<b>90, 64</b>	<b>120, 29</b>	<b>147, 30 (B)</b>
	H	<b>91, 66</b>	<b>121, 58</b>	<b>148, 65 (B)</b>
PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	<b>92, 70</b>	<b>122, 32</b>	---
PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	<b>93, 31</b>	<b>123, 26</b>	---
	Me	<b>94, 53</b>	<b>124, 33</b>	<b>149, 50 (B)</b>
	Me	<b>95, 34</b>	<b>125, 37</b>	<b>150, 50 (B)</b>

	Me	96, 39	126, 57	151, 58 (B)
	Me	97, 78	127, 54	152, 74 (B)
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	98, 84	128, 37	153, 64 (B)
		99, 95	---	---
		100, 96	---	---
Me	CH <sub>2</sub> Ph	101, 79	129, 48	154, 93 (B)

\* Выходы указаны для хроматографически очищенных соединений.

#### 4.1. Целевой синтез нитроизоксазолов с каркасными и ароматическими заместителями

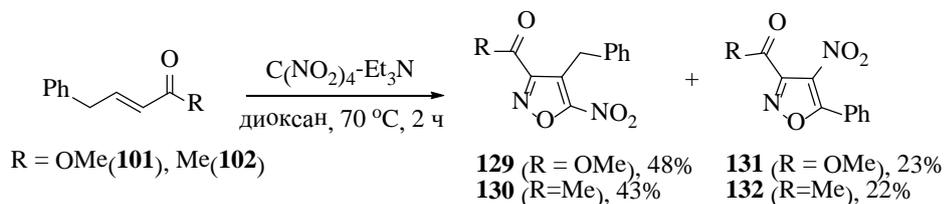
Ненасыщенные сложные эфиры **77-101** и кетон **102** были введены в реакцию гетероциклизации под действием ТНМ, активированного триэтиламином. В результате была получена большая серия 5-нитроизоксазолов **107-129** с выходами от умеренных до высоких в зависимости от заместителей при двойной связи (табл. 4, схема 5).

В целом, адамантансодержащие гетероциклы **107-116** были получены с хорошими препаративными выходами (табл. 4). При наличии в молекуле электрофильного алкена арилалкильного фрагмента гетероциклизация протекала с более низким выходом за счет частичного окисления бензильного атома углерода в условиях реакции (табл. 4, алкены **89-96, 98**). В случае алкенов, содержащих алкоксиарильный фрагмент (табл. 4, алкены **89-91, 94-96**) в качестве побочных продуктов были выделены ароматические альдегиды или кетоны, которые образовывались за счет частичной деструкции исходных алкенов.

Оказалось, что алкены **99** и **100** не вступают в реакцию гетероциклизации. В случае алкена **99**, содержащего 1-адамантилметильный заместитель при двойной связи, такой результат можно объяснить чувствительностью реакции к стерическим факторам: наличие объемного заместителя в β-положении двойной связи электрофильного алкена препятствует первой стадии гетероциклизации – присоединению по Михаэлю тринитрометильного аниона. Присутствие пиридинового фрагмента в молекуле алкена **100**, по-видимому, приводит к образованию его нереакционноспособного комплекса с ТНМ.

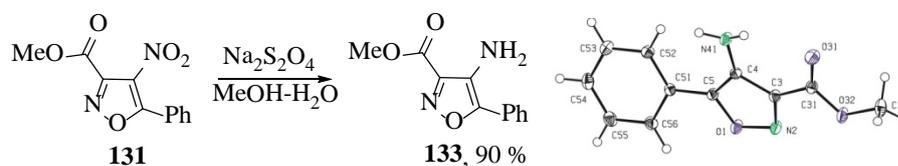
В реакциях гетероциклизации алкенов **101** и **102** наряду с целевыми 5-нитроизоксазолами **129** и **130** наблюдалось также образование 4-нитроизоксазолов **131** и **132** (схема 5). Соединения **129-132** были выделены в индивидуальном состоянии, строение установлено на основании спектров ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, состав подтвержден данными масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS-ESI).

#### Схема 5



Однозначное доказательство строения 4-нитроизоксазолов **131** и **132** было получено с использованием метода рентгеноструктурного анализа, выполненного для продукта восстановления гетероцикла **131** (схема 6).

Схема 6



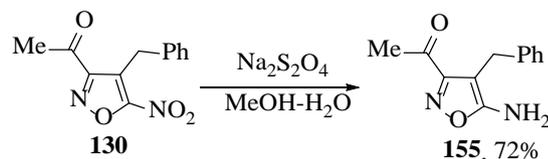
#### 4.2. Синтез целевых 5-амино- и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов.

Следующим этапом нашей работы явилось получение целевых 5-амино- и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов восстановлением соответствующих 5-нитроизоксазолов в найденных нами условиях (см. раздел 3).

Для синтеза 5-аминоизоксазолов были использованы реакции восстановления нитрогруппы под действием систем Zn/CH<sub>3</sub>COOH/*i*-PrOH (А) или SnCl<sub>2</sub>/EtOH (Б). Указанные системы оказались эффективными для восстановления нитрозамещенных гетероциклов **107-115**, содержащих каркасные алифатические фрагменты, и получения aminoизоксазолов **134-142** с хорошими препаративными выходами (табл. 4).

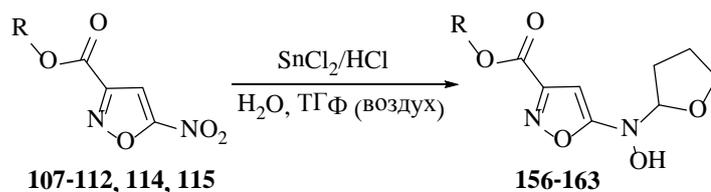
Оказалось, что при действии Zn/CH<sub>3</sub>COOH/*i*-PrOH или SnCl<sub>2</sub>/EtOH на алкоксиарилсодержащие 5-нитроизоксазолы **119-121**, **124-126** продукты восстановления выделить не удастся, поскольку в этих условиях происходит деструкция гетероциклов. В связи с этим, мы изучили возможность использования еще одного мягкого восстановителя – дитионита натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), который позволяет проводить реакцию восстановления в нейтральных условиях. Восстановление 5-нитроизоксазолов **116-121**, **124-129** под действием дитионита натрия протекает хемоселективно с образованием соответствующих 5-аминоизоксазолов **143-154** с удовлетворительными выходами (табл. 4). Эти же условия были использованы и для синтеза 5-аминоизоксазола **155** (схема 7), содержащего кето-группу в положении 3 гетероцикла. Мы показали, что реакцию восстановления под действием дитионита натрия можно проводить в различных растворителях в широком температурном интервале. Выбор растворителя и температуры определялись растворимостью исходных 5-нитроизоксазолов в условиях проведения синтезов.

Схема 7



Серия 5-нитроизоксазолов **107-112**, **114**, **115**, содержащих адамантановый заместитель в сложноэфирном фрагменте, была использована для получения 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов **156-163**, необходимых для изучения биоактивности. Реакцию восстановления проводили в найденных нами условиях (раздел 3) с использованием предварительно активированного тетрагидрофурана, целевые гетероциклы были получены с хорошими выходами (табл. 5).

**Таблица 5.** Синтез 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов **156-163**



5-Гидрокси-аминоизоксазол	R	Выход, %*	5-Гидрокси-аминоизоксазол	R	Выход, %*
<b>156</b>		46	<b>160</b>		52
<b>157</b>		50	<b>161</b>		62
<b>158</b>		75	<b>162</b>		54
<b>159</b>		47	<b>163</b>		60

\*Выходы указаны для хроматографически очищенных соединений.

### 5. Изучение биоактивности производных изоксазола

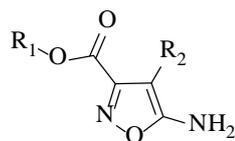
В данном разделе представлены результаты экспериментального изучения биоактивности синтезированных в работе новых производных изоксазола. Исследования выполнены совместно с сотрудниками кафедры МХиТОС, а также в сотрудничестве с Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН имени М. П. Чумакова и ИФАВ РАН.

#### 5.1 Изучение противовирусной активности 5-аминоизоксазолов<sup>1</sup>

Для серии синтезированных 5-аминоизоксазолов **134-144**, содержащих объемные каркасные фрагменты, а также гетероциклов **58** и **59**, содержащих *трет*-бутильный и бензильный заместители в сложноэфирной группе, были экспериментально изучены противовирусная активность (вирус клещевого энцефалита (ВКЭ)) и цитотоксичность в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН имени М. П. Чумакова, результаты приведены в таблице 6. Исследование противовирусной активности соединений проводили методом ингибирования образования вирусами бляшек в культуре клеток почки эмбриона свиньи. Для изучаемых соединений также были определены значения  $CC_{50}$  острой (24 часа) и хронической (7 дней) цитотоксичности.

<sup>1</sup>Работа выполнена совместно с зав. лаб. медицинской химии В.А. Палюлином, к.х.н. Д.И. Осолодкиным, к.х.н. Е.В. Дуевой

**Таблица 6.** Выборочные результаты экспериментального изучения противовирусной активности ряда 5-аминоизоксазолов



5-Аминоизоксазол	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	CC <sub>50</sub> , мкМ		EC <sub>50</sub> , мкМ
			24 ч	7 дней	
<b>134</b>		H	>500	382	11 ± 4
<b>135</b>		H	350	160	11 ± 2
<b>136</b>		H	88	88	1.7 ± 0.1
<b>152</b>		Me	118	62	22.4 ± 0.6
<b>153</b>		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	>500	416	3.7 ± 0.2
<b>137</b>		H	>500	416	14 ± 2
<b>139</b>		H	386	273	20 ± 3
<b>142</b>		H	354	354	13 ± 2

Согласно полученным результатам 5-аминоизоксазолы **58**, **59**, **134-137**, **139**, **141**, **142** ингибируют репродукцию вируса клещевого энцефалита в культуре клеток в микромолярном диапазоне концентраций EC<sub>50</sub>. В целом, наличие адамантанового фрагмента в молекуле аминизоксазола оказалось важным для проявления противовирусной активности, при этом способ связывания с адамантановым полициклом (по положению 1 или 2), по-видимому, не оказывает существенного влияния на величину активности, однако 2-адамантилоксикарбонилзамещенный 5-аминоизоксазол **135** оказался в 2 раза более токсичным по сравнению с региоизомером **134**.

Увеличение гидрофобности и объема заместителя в положении 3 изоксазольного цикла за счет наличия метильных групп в адамантановом каркасе соединения **142** не отражается на величине его активности по сравнению с гетероциклом **134**. Введение сложноэфирной или амидной групп в адамантановый каркас (гетероциклы **140**, **141**, **143**) приводит к значительному снижению активности (**141**) или ее полному исчезновению (**140**, **143**). Введение бициклононанового фрагмента в молекулу 5-аминоизоксазола (соединение **144**) также приводит к потере активности. Сравнение соединений **134** и **136** показывает, что увеличение длины линкера, связывающего адамантановый фрагмент с изоксазольным циклом, на одну метиленовую группу приводит к возрастанию активности почти в 10 раз, однако дальнейшее увеличение расстояния между фармакофорами приводит к понижению (**137**) или потере (**138**)

активности. Наличие ароматического кольца в качестве линкера (**139**) также приводит к увеличению значения эффективной концентрации  $EC_{50}$  (табл. 6).

Из всех изученных соединений наилучшую активность проявило соединение **136** ( $EC_{50} = 1.7$  мкМ), содержащее адамантилметильный заместитель в сложноэфирном фрагменте. Мы показали, что замена аминогруппы в положении 5 гетероцикла на нитрогруппу (соединение **109**) приводит к понижению активности на порядок, что подтверждает важность наличия аминоизоксазольного фрагмента для связывания с белком E оболочки вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Введение метильной группы (соединение **152**) приводит к падению активности почти в 10 раз (табл. 6). В то же время введение фенилэтильного заместителя (соединение **153**) практически не изменяет значение  $EC_{50}$  (3.7 мкМ), однако при этом значительно снижается цитотоксичность. Таким образом, терапевтический индекс (ТИ), определяемый как отношение  $CC_{50}/EC_{50}$ , для изоксазола **153** имеет высокий показатель (ТИ=134), что особенно важно при создании лекарственных препаратов.

Таким образом, для большой серии 5-аминоизоксазолов была изучена противовирусная активность по отношению к ВКЭ и было показано, что этот ранее не изученный класс соединений является перспективным для поиска соединений-лидеров. Мы нашли ряд факторов, определяющих зависимость активности соединений от их структуры, в частности, показали, что наличие адамантанового фрагмента и 5-аминоизоксазольного цикла является наиболее важным для эффективного связывания с белком E ВКЭ. Мы показали, что большинство изученных соединений проявляет активность по отношению к ВКЭ в микромолярных концентрациях, при этом наиболее перспективным является соединение-лидер **153**, обладающее хорошим терапевтическим индексом (>100) и высокой активностью ( $EC_{50} = 3.7$  мкМ).

### *5.2. Изучение антимитотической активности в ряду 5-аминоизоксазолов <sup>2</sup>*

Для 5-аминоизоксазолов **146-151** было изучено их действие на жизнеспособность эпителиальной карциномы легких клеточной линии A549 путем измерения активности митохондрий в стандартном колориметрическом анализе с 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-2Н-тетразолил бромидом (МТТ-тест). Было показано, что 5-аминоизоксазолы **146** и **148** проявляют умеренную цитотоксичность со значениями  $EC_{50}$  в микромолярном диапазоне концентраций (35-38 мкМ). Оказалось, что введение метильного заместителя в положение 4 изоксазольного цикла (соединения **149-151**) или в бензильное положение сложноэфирной группы (соединения **147, 150**) привело к снижению цитотоксичности ( $EC_{50}>100$  мкМ). Интересно отметить, что примерно одинаковые значения  $EC_{50}$  для **146** и **148** свидетельствуют об эквивалентности триметоксифенильного и метилendioксифенильного заместителей для антимитотической активности этих соединений.

Для соединений **146, 148** и **152** было проведено изучение их влияния на рост опухолевых клеток с использованием их прямого подсчета с помощью электронной микроскопии в течение 24, 48 и 72 ч культивирования. Как и следовало ожидать, изучаемые гетероциклы значительно замедляют пролиферацию клеток, степень ингибирования роста клеток коррелирует с цитотоксичностью соединений **146, 148** и **152**. Для этих изоксазолов было изучено влияние на

---

<sup>2</sup> Совместно с проф. О.Н. Зефириной

сеть микротрубочек с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии. Было показано, что соединения **146**, **148** и **152** не изменяют микротрубочки и их динамику в A459 клетках при 100 мкМ в течение 48 часов. Следовательно, цитотоксические и антипролиферативные свойства соединений **146**, **148** и **152**, скорее всего, не связаны с действием на полимеризацию тубулина.

Таким образом, мы показали, что 5-аминоизоксазолы, содержащие алкоксиарильные фрагменты, проявляют умеренную антимиотическую активность, при этом механизм их действия на тубулин отличается от известных аналогов и представляет интерес для дальнейших исследований.

### *5.3. Изучение производных изоксазола в качестве отрицательных модуляторов NMDA-рецептора<sup>3</sup>*

Экспериментальная оценка сродства нитроизоксазолов **122** и **123** к сайту связывания ифенпродила проводилась радиолигандным методом на клеточных мембранах, выделенных из гиппокампа крысы, с использованием в качестве стандарта меченного тритием ифенпродила. Было показано, что изоксазол **122** не проявляет активности по отношению к NMDA-рецептору в изученных концентрациях, а для гетероцикла **123** величина IC<sub>50</sub> составляет около 100 мкМ. Отметим, что гетероциклы **122** и **123** отличаются длиной метиленового мостика сложноэфирной группы, при этом соединение с более длинным линкером проявляет большую ингибирующую активность.

Таким образом, были получены первые результаты по изучению 5-нитроизоксазолов в качестве лигандов ифенпродилового сайта NMDA рецептора. Было найдено, что соединение **123** проявляет ингибирующую активность в концентрации примерно 100 мкМ. Проведенные исследования открывают возможность использования данного структурного типа гетероциклов для их изучения в качестве отрицательных модуляторов NMDA-рецепторов и указывают на необходимость дальнейшей оптимизации структуры производных изоксазола с целью выявления более активных аналогов.

### *5.4. Изучение антиоксидантной активности и ингибирующей активности по отношению к липоксигеназе (LOX).<sup>4</sup>*

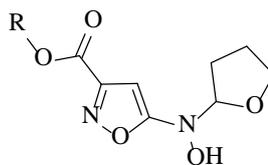
Для синтезированных нами 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов **156-163**, содержащих объемный липофильный адамантановый фрагмент в молекуле, были изучены антиоксидантные свойства, а также ингибирующая активность по отношению к липоксигеназе (на модельной соевой липоксигеназе LOX-1).

На первом этапе работы была проведена предварительная оценка общей антиоксидантной активности 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов **156-163**. Одним из наиболее распространенных способов оценки неспецифической антиоксидантной активности является тест с дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ-тест). Результаты ДФПГ-теста показывают, что наиболее активными являются соединения **156**, **157**, **159**, **163** (табл. 7), при этом наилучшие антиоксидантные свойства проявляет соединение **156** (табл. 7), которое реагирует с ДФПГ в течение нескольких секунд при эквимольном соотношении реагентов.

<sup>3</sup> Совместно с зав. лаб. медицинской химии В.А. Палюлином, к.х.н. Д.С. Карловым

<sup>4</sup> Совместно с проф. Е.Р. Милаевой, к.х.н. Ю.А. Грачевой, к.х.н.Е.Ф. Шевцовой

**Таблица 7.** Выборочные результаты экспериментального изучения антиоксидантных свойств и ингибирующей активности гидроксиламинов **156-163** по отношению к LOX-1



№	Гидро-ксиламин	R	ПОЛ, Fe <sup>3+</sup> IC <sub>50</sub> , мкМ	ПОЛ, Fe <sup>2+</sup> IC <sub>50</sub> , мкМ	ДФПГ EC <sub>50</sub> , мкМ	LOX-1 IC <sub>50</sub> , мкМ
1	<b>156</b>		1.37 ± 0.32	0.33 ± 0.19	16 ± 2	25 ± 3
2	<b>157</b>		1.21 ± 0.20	10.54 ± 1.34	71 ± 8	4 ± 0,6
3	<b>158</b>		22 ± 3	6.58 ± 1.44	70 ± 5	16 ± 2
4	<b>159</b>		5.25 ± 0.8	3.15 ± 0.93	21 ± 3	0.4 ± 0.1
5	<b>163</b>		1.48 ± 0.23	5.16 ± 2.4	38 ± 5	1 ± 0.4

Другим распространенным способом оценки антиоксидантной активности соединений является способность ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ). Все синтезированные соединения ингибируют Fe<sup>2+</sup>- и Fe<sup>3+</sup>-индуцированное ПОЛ, при этом наиболее активным также является соединение **156**. В целом, результаты обоих тестов для изученных соединений коррелируют (табл. 7).

Следующим этапом было изучение ингибирующего действия гидроксиламинов **156-163** на активность LOX-1. Наиболее активными являются соединения **157, 159** и **163** (табл. 7), для которых IC<sub>50</sub> находится в диапазоне от 0.4 до 4 мкМ. На примере соединений **156, 158, 159** было показано, что активность гидроксиламинов растет при удлинении линкера, связывающего изоксазольный цикл и адамантовый каркас. Однако дальнейшее увеличение длины линкера ведет к полной потере активности (**160, 161**). Оказалось, что эффективность ингибирования LOX-1 зависит от положения связи карбоксильной группы с адамантовым каркасом: замещение по положению 2 адамантана, по-видимому, более перспективно, чем по положению 1 (соединения **156, 157**). Введение дополнительных липофильных заместителей в адамантовый каркас приводит к росту активности гетероцикла **163** по сравнению с **156**, а введение полярной сложноэфирной группы наоборот приводит к падению активности соединения **162**.

Было также изучено влияние соединений **156-163** на функции митохондрий. Обработка митохондрий изоксазолами **156, 158-163** привела к стимулированию процессов дыхания и фосфорилирования.

Таким образом, впервые были изучены антиоксидантные свойства для нового структурного типа гетероциклов – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов. Было

показано, что изученные соединения **156-163**, в целом, проявляют высокую антиоксидантную активность, а также ингибирующую активность по отношению к липоксигеназе. Найдено соединение-лидер **159**, ингибирующее LOX-1 в наномолярной концентрации ( $EC_{50} = 400$  нМ). Было также найдено, что 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолы **156-163** обладают низкой токсичностью, стимулируют дыхательную функцию митохондрий, в связи с чем данный класс соединений может быть использован в качестве нового скаффолда для разработки препаратов, стимулирующих процессы метаболизма в организме.

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На серии ненасыщенных сложных эфиров димерного строения показана применимость реакции гетероциклизации электрофильных алкенов под действием комплекса ТНМ-ТЭА для синтеза бис(5-нитроизоксазолов). Разработан препаративный метод синтеза производных изоксазола димерного строения.

2. Установлено, что направление реакции гетероциклизации принципиально изменяется при введении арильного заместителя в  $\beta$ -положение  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного кетона. Найдено, что гетероциклизация  $\beta$ -арилзамещенных винилкетонов протекает с образованием 4-нитроизоксазолов, причем в образовании гетероцикла участвует кето-группа. На большой серии  $\beta$ -арилзамещенных винилкетонов показан общий характер реакции и установлены основные закономерности ее протекания. Разработан новый препаративный метод синтеза 4-нитроизоксазолов, позволяющий получать широкий круг соединений с разнообразными ароматическими заместителями.

3. В результате изучения реакций восстановления 5-нитроизоксазолов был разработан удобный двухстадийный регио- и хемоселективный метод синтеза 5-аминоизоксазолов, включающий реакцию гетероциклизации синтетически доступных электрофильных алкенов и последующее восстановление образующихся нитрозамещенных гетероциклов.

4. Систематически изучена новая реакция восстановления 5-нитроизоксазолов, приводящая к неизвестным ранее производным – 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]-изоксазолам. Установлены основные закономерности протекания реакции, на основе которой был разработан препаративный метод синтеза новых производных изоксазола.

5. На основе разработанных нами методов и подходов была предложена универсальная синтетическая стратегия для целенаправленного получения производных изоксазола различного строения, состоящая из последовательности трех стадий: (1) получение ненасыщенных сложных эфиров, как наиболее доступных и переменных электрофильных алкенов; (2) гетероциклизация алкенов под действием активированного тетранитрометана, приводящая к 5-нитроизоксазолам; (3) восстановление нитрогруппы.

6. Осуществлен синтез трех серий новых 5-аминоизоксазолов с потенциальной противовирусной, противораковой (антимитотической) и нейропротекторной типами активности, а также ряд 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов с предполагаемой антиоксидантной активностью, а также ингибирующей активностью по отношению к липоксигеназе.

7. Изучена противовирусная активность ряда 5-аминоизоксазолов, содержащих адамантановый фрагмент в сложноэфирной группе, по отношению к вирусу клещевого энцефалита. Установлены основные структурные требования к гетероциклу для обеспечения высокой активности в ингибировании процесса репродукции вируса клещевого энцефалита. Найдено соединение-лидер, обладающее хорошим терапевтическим индексом ( $EC_{50}/CC_{50} = 137$ ) и высокой противовирусной активностью ( $EC_{50} = 3.7$  мкМ).

8. Показано, что 5-аминоизоксазолы, содержащие алкоксиарильные заместители в сложноэфирной группе, являются перспективными структурами для поиска соединений-лидеров, проявляющих антимиотическую активность. Было найдено, что изученные гетероциклы проявляют умеренную цитотоксичность на клеточной линии A549 карциномы легких ( $EC_{50} = 35-93$  мкМ).

9. Показано, что 5-нитроизоксазолы, содержащие бензильный фрагмент в молекуле, являются перспективными соединениями для поиска эффективных отрицательных модуляторов NMDA рецептора.

10. Найдено, что 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолы, содержащие адамантановый фрагмент в молекуле, проявляют высокую антиоксидантную активность и высокую ингибирующую активность по отношению к липоксигеназе. Найдено соединение-лидер, ингибирующее LOX-1 в наномолярной концентрации (400 нМ). Показано, что изученные 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолы усиливают дыхательную функцию митохондрий и представляют интерес для разработки новых препаратов, стимулирующих процессы метаболизма в организме.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

1. Averina, E.B. Chemoselective Reduction of Functionalized 5-Nitroisoxazoles: Synthesis of 5-Amino- and 5-[Hydroxy(tetrahydrofuran-2-yl)amino]isoxazoles / E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, Y.V. Samoilichenko, Y.K. Grishin, V.B. Rybakov, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // *Synthesis*. – 2014. – V. 46, № 8. – P. 1107–1113.
2. Averina, E.B. Synthesis and biological evaluation of novel 5-hydroxylaminoisoxazole derivatives as lipoxygenase inhibitors and metabolism enhancing agents / E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, Y.A. Gracheva, Y.K. Grishin, E.V. Radchenko, V.V. Burmistrov, G.M. Butov, M.E. Neganova, T.P. Serkova, O.M. Redkozubova, E.F. Shevtsova, E.R. Milaeva, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – V. 24, № 4. – P. 712–720.
3. **Vasilenko, D.A.** Synthesis and antimitotic activity of novel 5-aminoisoxazoles bearing alkoxyaryl moieties / **D.A. Vasilenko**, E.B. Averina, N.A. Zefirov, B. Wobith, Y.K. Grishin, V.B. Rybakov, O.N. Zefirova, T.S. Kuznetsova, S.A. Kuznetsov, N.S. Zefirov // *Mendeleev Commun.* – 2017. – V. 27, № 3. – P. 228–230.
4. **Василенко Д.А.** Синтез и практическое применение N-[гидрокси(тетрагидрофуран-2-ил)аминов] / **Д.А. Василенко**, Е.Б. Аверина, К.Н. Седенкова, Т.С. Кузнецова, Н.С. Зефирова // *Изв. АН. Сер. хим.* – 2017. – № 11. – С. 1963–1981.
5. Averina, E.B. Unusual reduction of functionalized 5-nitroisoxazoles by  $SnCl_2/HCl-THF$ . Synthesis and antioxidant properties of substituted 5-[hydroxy(tetrahydrofuran-2-yl)amino]isoxazoles /

- E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, S.I. Orlova, E.R. Milaeva, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // Abstr. of the 6th International Conference "Chemistry of Nitrogen containing Heterocycles" – Kharkiv, Ukraine. – 2012. – P. 116.
6. Averina, E.B. The reduction of 5-nitroisoxazoles. Chemoselective synthesis of 5-amino- and 5-[hydroxy(tetrahydrofuran-2-yl)amino]isoxazoles / E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // Abstr. of the 15<sup>th</sup> Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry. – Olomouc, Czech Republic. – 2013. – P. 5.
7. **Василенко**, Д.А. Синтез 5-[гидроксил(тетрагидрофуран-2-ил)амино]изоксазолов и изучение их антиоксидантной активности / **Василенко** Д.А. // Тез. докл. Межд. молодежного форума «Ломоносов-2013». – Москва, Россия. – 2013.
8. **Василенко**, Д.А. Новый Метод Синтеза Функционализированных 5-Аминоизоксазолов и Изучение их Биоактивности / Д.А. **Василенко**, Е.Б. Аверина, Т.С. Кузнецова, Е.В. Дуева, Д.И. Осолодкин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефирова // Тез. докл. III Всероссийская конф. с междунар. участием «Успехи синтеза и комплексообразования». – Москва, Россия. – 2014. – С. 127.
9. Averina, E.B. Electrophilic Alkenes in the Synthesis of Polyfunctionalized Isoxazoles. Ready Access to 5-Amino- and 5-[Hydroxy(tetrahydrofuran-2-yl)amino]isoxazoles / E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // Тез. докл. Уральского научного форума «Современные проблемы органической химии». – Екатеринбург, Россия. – 2014. – С. 44.
10. Averina, E.B. Nitrating and nitrosating reagents in novel heterocyclization reactions. Ready access to highly substituted pyrimidine and isoxazole derivatives / E.B. Averina, K.N. Sedenkova, **D.A. Vasilenko**, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // Abstr. of the Intern. conf. «Molecular complexity in modern chemistry MCMC-2014». – Moscow, Russia. – 2014. – P. 119.
11. Kuznetsova, T.S. Synthesis and assessment of novel 5-aminoisoxazole and 4-aminopyrimidine derivatives as antiviral agents / T.S. Kuznetsova, E.B. Averina, K.N. Sedenkova, E.V. Dueva, **D.A. Vasilenko**, D.I. Osolodkin, V.A. Palyulin, N.S. Zefirov. // Abstr. of the «Anatolian Conference on Synthetic Organic Chemistry». – Antalya, Turkey. – 2015. – P. 79.
12. Аверина, Е.Б. Структурный дизайн и синтез новых производных изоксазола и пиримидина с заданным типом биоактивности / Е.Б. Аверина, К.Н. Седенкова, **Д.А. Василенко**, Т.С. Кузнецова, Н.С. Зефирова // Тез. докл. Второго Междисциплинарного Симпозиума по медицинской, органической и биологической химии – Новый Свет, Крым, Россия. – 2015. – С. 84.
13. Averina, E.B. Novel heterocyclization reaction of electrophilic alkenes. Synthesis and biological evaluation of 5-amino- and 5-hydroxylaminoisoxazoles / E.B. Averina, **D.A. Vasilenko**, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov // Abstr. of the Intern. Congress on Heterocyclic Chemistry "KOST-2015". – Moscow, Russia. – 2015. – P.88.
14. Gracheva Yu.A. Novel hydroxylaminoisoxazoles as perspective lipoxygenase inhibitors / Yu.A. Gracheva, **D.A. Vasilenko**, E.B. Averina, M.E. Neganova, O.M. Redkozubova, E.F. Shevtsova, E.R. Milaeva // Abstr. of the 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChemRussia 2015. – Novosibirsk, Russia. – 2015. – P.186.

15. **Василенко, Д.А.** Новые синтетические подходы к биоактивным производным изоксазолов – 5-амино- и 5-[гидрокси(тетрагидрофуран-2ил)амино]изоксазолам / **Василенко Д.А.** // Тез. Докл. Межд. научной конф. студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015». – Москва, Россия. – 2015.
16. **Василенко, Д.А.** Синтез новых биоактивных производных изоксазола. / **Д.А. Василенко, Е.Б. Аверина, Т.С. Кузнецова, Н.С. Зефирова** // Тез. докл. IV Всероссийской конф. по органической химии и XVIII Молодежная школа-конф. по органической химии. – Москва, Россия. – 2015. – С. 80.
17. **Василенко, Д.А.** Разработка новых синтетических подходов к нитрозамещенным изоксазолам / **Д.А. Василенко, К.С. Садовников, Е.Б. Аверина, Т.С. Кузнецова, Н.С. Зефирова** // Тез. докл. I Всероссийской Молодежной школы-конф. «Успехи синтеза и комплексообразования». – Москва, Россия. – 2016. – С. 101.
18. **Vasilenko, D.A.** Novel ligands of NMDA-receptor based on isoxazole scaffold / **D.A. Vasilenko, A.V. Kurova, D.S. Karlov, E.B. Averina, V.A. Palyulin, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov** // Abstr. of the Dombay Organic Conference cluster DOCC-2016. – Dombay, Russia. – 2016. – P. 273.
19. **Averina, E.B.** Synthesis of novel biologically active compounds based on isoxazole and pyrimidine scaffolds / **Е.Б. Аверина, К.Н. Седенкова, Д.А. Василенко, А.А. Назарова, А.А. Терехин, Т.С. Кузнецова, Н.С. Зефирова** // Abstr. of XX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. – Ekaterinburg, Russia. – 2016. – V. 4. – P. 401.
20. **Vasilenko, D.A.** Novel synthetic approach to functionalized 4-nitro- and 4-aminoisoxazoles / **D.A. Vasilenko, A.V. Kurova, E.B. Averina, T.S. Kuznetsova, N.S. Zefirov** // Abstr. of the Fourth International Scientific Conference: “Advances in Synthesis and Complexing”. – Moscow, Russia. – 2017. – P. 222.
21. **Vasilenko, D.A.** Novel synthetic approach to 4-nitroisoxazoles - versatile precursors for bioactive compounds / **D.A. Vasilenko, E.B. Averina, T.S. Kuznetsova** // Abstr. of the 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. – Kazan, Russia. – 2017. – P. 169.
22. **Averina, E.B.** Novel synthetic approach to isoxazole derivatives – promising compounds for biological evaluation / **Е.Б. Аверина, Д.А. Василенко, Т.С. Кузнецова, В.А. Палюлин, Н.С. Зефирова** // Abstr. of the 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. – Kazan, Russia. – 2017. – P. 38.