

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА



*На правах рукописи*

**Садовников Кирилл Сергеевич**

**Новые производные изоксазола с потенциальной биологической активностью и флуоресцентными свойствами**

1.4.16 – медицинская химия

1.4.3 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2022

**Научные руководители** - **Василенко Дмитрий Алексеевич**  
*кандидат химических наук*

- **Аверина Елена Борисовна**  
*доктор химических наук*

**Официальные оппоненты** - **Брель Валерий Кузьмич**  
*доктор химических наук, профессор*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
“Институт элементоорганических соединений им. А.Н.  
Несмеянова Российской академии наук”, Отдел  
элементоорганических соединений, заведующий лабораторией  
фосфорорганических соединений № 112

**Сухоруков Алексей Юрьевич**  
*доктор химических наук, доцент*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
“Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Российской академии наук”, заведующий лабораторией  
органических и металлорганических азот-кислородных систем  
(№ 9), ведущий научный сотрудник

- **Белоглазкина Елена Кимовна**  
*доктор химических наук, доцент*

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова»,  
кафедра органической химии, профессор.

Защита диссертации состоится «25» ноября 2022 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, химический факультет, ауд. 446.

Е-mail: [natalylozinskaya@mail.ru](mailto:natalylozinskaya@mail.ru) (ученый секретарь)

[11seconds@mail.ru](mailto:11seconds@mail.ru) (соискатель).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ им. М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:  
<https://istina.msu.ru/dissertations/501401667/>

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.014.7

кандидат химических наук

Н.А. Лозинская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Изоксазольный цикл широко используется в дизайне лекарственных препаратов и биологически активных соединений, проявляющих противораковую, противовирусную, иммуномодулирующую, противовоспалительную, антибактериальную, противогрибковую, ноотропную и другие типы активности. Высокий интерес к использованию данного гетероцикла в органической и медицинской химии обуславливает необходимость разработки простых и эффективных методов синтеза функционализированных изоксазолов, которые можно легко модифицировать по различным положениям. В этом плане перспективны нитрозамещенные производные изоксазола, поскольку нитрогруппа может участвовать в разнообразных химических превращениях, включая реакции восстановления и последующего ацилирования, образования новых гетероциклических фрагментов. Кроме того, пятичленные нитрогетероциклы являются структурными аналогами известных антибактериальных и противогрибковых препаратов, что с учетом проблемы резистентности бактерий и грибов к большому количеству известных лекарств делает разработку методов их синтеза важной задачей. Производные изоксазола также представляют интерес для изучения противораковой активности, поскольку опухолевые заболевания занимают одно из первых мест среди социально значимых болезней в современном мире. Не менее важной задачей медицинской химии является изучение механизмов действия лекарственных соединений и визуализация процессов, протекающих в клетках. Одним из действенных инструментов для таких исследований является использование соединений с флуоресцентными свойствами. Следует отметить, что низкая токсичность и потенциальная биологическая активность производных изоксазола делает их перспективными объектами для изучения в качестве флуоресцентных сенсоров, тем не менее, изоксазолсодержащие флуорофоры в настоящее время остаются практически не изученными. В связи с этим разработка новых методов синтеза функционализированных производных изоксазола, в том числе, с флуоресцентными свойствами, а также направленный синтез соединений с ожидаемой биологической активностью, является актуальной проблемой органической и медицинской химии.

**Степень разработанности темы диссертации.** В литературе описаны различные синтетические подходы к получению производных изоксазола, а также направленный синтез этих гетероциклов для изучения биологической активности. В диссертационной работе представлен обзор литературы, посвященный получению изоксазолсодержащих соединений с противораковой активностью, материал собран по типу молекулярной мишени, приводятся предложенные авторами синтетические последовательности. Тем не менее, хемо- и региоселективные методы синтеза нитрозамещенных гетероциклов с большим разнообразием заместителей в литературе практически отсутствуют, поэтому существует необходимость их разработки.

**Целью настоящей работы** явилась разработка препаративно удобных методов получения 4-нитроизоксазолов, направленный синтез производных изоксазола с ампакинной, антимикробной и противораковой типами активности, а также синтез новых флуорофоров и изучение их фотофизических характеристик. В соответствии с указанной целью в работе были поставлены следующие задачи:

- разработать методы синтеза бис(5-аминоизоксазолов) и изучить их активность в качестве перспективных модуляторов AMPA рецептора;
- разработать препаративный метод синтеза 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов на основе реакции нитрования соответствующих 5-аминоизоксазолов и провести скрининг их антибактериальной и противогрибковой активности;
- разработать удобный, легко масштабируемый хемо- и региоселективный метод синтеза 3-арил-/гетарил-4-нитроизоксазолов;
- разработать синтетические подходы к флуорофорам двух структурных типов: 4-нитро-5-стирилизоксазолам и  $VF_2$ -комплексам изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетоннов. Получить большую серию соединений с различными заместителями в изоксазольном цикле и в ароматическом фрагменте для систематического изучения фотофизических характеристик, выявить основные закономерности “структура-свойство”;
- с использованием разработанных методов осуществить направленный синтез серии 3-арил-5-метил-4-ациламиноизоксазолов, исследовать их цитотоксичность по отношению к раковым и нормальным клеткам, установить зависимость “структура-активность”, для наиболее перспективных соединений провести дополнительные исследования с целью установления возможного механизма действия.

#### **Объекты и предмет исследования.**

Объектами исследования являлись изоксазолсодержащие соединения, а именно: бис(5-аминоизоксазолы), 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолы, 3-арил/гетарил-4-нитроизоксазолы, 4-нитро-5-стирилизоксазолы,  $VF_2$ -комплексы изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетоннов, 5-метил-4-ациламиноизоксазолы.

Предметом исследования являлась разработка методов синтеза, изучение реакционной способности, биологической активности и фотофизических свойств полученных в работе производных изоксазола.

#### **Методология и методы исследования.**

В работе использовали физико-химические методы анализа для подтверждения состава и структуры соединений:  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$  ЯМР спектроскопия, в том числе с привлечением двумерных методик (HMBC, HMQC), масс-спектрометрия (HRMS-ESI), элементный анализ и рентгеноструктурный анализ. Исследование фотофизических свойств проводили с помощью электронной спектроскопии поглощения и флуоресцентной спектроскопии. Взаимодействие соединений с AMPA рецептором изучалось методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp). Первичный скрининг антибактериальной и противогрибковой активности был проведен с использованием дисково-диффузионного метода. Цитотоксичность оценивали с использованием МТТ-теста на клеточных линиях рака человека.

**Научная новизна.** Разработан синтетический подход к бис(5-аминоизоксазолам), которые являются новым структурным типом положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора, найдено соединение, проявляющее активность в субнанолярном диапазоне концентраций.

Найдены условия хемоселективного нитрования 3-EWG-5-аминоизоксазолов с незащищенной аминогруппой под действием нитрата аммония в трифторуксусном ангидриде.

Разработан новый метод синтеза 4-нитро-5-аминоизоксазолов, для которых выявлена антибактериальная активность.

Разработан новый препаративный метод синтеза 3-арил\гетарил-4-нитроизоксазолов на основе реакции гетероциклизации  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных (арил-/гетарил)винилкетонс под действием *трет*-бутилнитрита в смеси диоксан-вода.

Синтезированы большие серии новых 3-арил\гетарил-4-нитро-5-стирилизоксазолов и  $BF_2$ -комплексов изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетонс, для которых впервые проведен систематический анализ зависимости фотофизических характеристик от природы заместителей в различных положениях изоксазольного цикла.

Осуществлен направленный синтез большой серии новых 5-метил-4-ациламиноизоксазолов в качестве ингибиторов полимеризации тубулина для изучения противораковой активности. Найдены соединения, проявляющие антимиотические свойства в субмикромольном диапазоне концентраций с высокой селективностью.

**Теоретическая и практическая значимость.** Предложен препаративный метод синтеза неизвестных ранее бис(5-аминоизоксазолов) с различными линкерами, показано, что бис(5-аминоизоксазол), содержащий 1,4-фениленбисметиленовый фрагмент в качестве линкера, является перспективным положительным модулятором АМРА-рецептора, потенцирующим каинат-индуцированные токи в широком диапазоне концентраций (от  $10^{-12}$  до  $10^{-6}$  М). Разработан новый метод синтеза 4-нитроизоксазолов на основе реакции хемоселективного нитрования 3-EWG-5-аминоизоксазолов, который представляет интерес для получения соединений с потенциальной антибактериальной и противогрибковой активностью. Найден новый реагент гетероциклизации  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных (арил-/гетарил)винилкетонс – *трет*-бутилнитрит в смеси диоксан-вода, позволяющий получать 3-арил\гетарил-4-нитроизоксазолы в граммовых количествах с высокими выходами. Для двух больших серий неизвестных ранее 3-арил\гетарил-4-нитро-5-стирилизоксазолов и  $BF_2$ -комплексов изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетонс проведено систематическое изучение фотофизических характеристик, в результате чего были найдены основные закономерности зависимости “структура-свойства”, а также продемонстрирована возможность использования 4-нитро-5-стирилизоксазолов в качестве сенсоров, в том числе, в живых клетках. Предложен универсальный синтетический подход к 5-метил-4-ациламиноизоксазолам, представляющим интерес для изучения противораковой активности, найдено соединение-лидер с противораковой активностью в субмикромольном диапазоне концентрации (для клеточной линии LNCaP  $IC_{50}=0.301 \mu M$ ) и высокой селективностью, которое представляет интерес для дальнейшей оптимизации структуры.

#### **Положения, выносимые на защиту**

- 1,4-Фениленбис(метилен)бис(5-аминоизоксазол-3-карбоксилат) потенцирует каинат-индуцированные токи в широком диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  до  $10^{-6}$  М с максимумом потенцирования 170% при  $10^{-11}$  М.
- Эффективным подходом к синтезу 3-EWG-4-нитро-5-аминоизоксазолов является нитрование 3-EWG-5-аминоизоксазолов под действием нитрата аммония в трифторуксусном ангидриде. 3-EWG-4-нитро-5-аминоизоксазолы обладают антибактериальными свойствами.
- *Трет*-бутилнитрит в смеси диоксан-вода является новым реагентом гетероциклизации  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных (арил-/гетарил)винилкетонс. В реакциях с участием этого реагента

образуются 3-(арил-/гетарил)-4-нитроизоксазолы с высокими выходами в граммовых количествах.

- 3-Арил\гетарил-4-нитро-5-стирилизоксазолы и  $\text{BF}_2$ -комплексы изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетонов являются флуорофорами нового структурного типа. Флуоресцентные свойства соединений зависят от электронной природы заместителей в изоксазольном цикле, ароматических кольцах и их расположения в молекуле. Изоксазолсодержащие флуорофоры проявляют сенсорные свойства по отношению к различным ионам металлов, сольватохромизм и умеренную противораковую активность.
- 5-Метил-4-ациламиноизоксазолы являются ингибиторами полимеризации белка тубулина, а также действуют на другую неустановленную мишень. Соединение-лидер (3-метил-*N*-(5-метил-3-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазол-4-ил)бензамид) проявляет цитотоксичность в субмикромольном диапазоне концентраций и характеризуется хорошим токсикологическим профилем. Инкапсулирование 5-метил-4-ациламиноизоксазолов в полисахаридные мицеллы «наноконтейнеры» позволяет улучшить их физико-химические и биологические свойства.

**Личный вклад автора** состоит в подборе и анализе литературы, постановке промежуточных задач, синтезе целевых и промежуточных соединений, подготовке соединений к изучению их физико-химических и биологических свойств, регистрации спектров поглощения и флуоресценции. Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач исследования, в обработке и интерпретации экспериментального материала, подготовке материалов к публикации в научных журналах и в представлении ключевых результатов на конференциях.

**Апробация работы и публикации.** Основное содержание работы изложено в 13 публикациях в виде 6 статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых виртуальными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованы ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 7 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях. Во всех работах вклад автора является определяющим.

Основные материалы работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на конференциях: V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии (Владикавказ, Россия, 2018); 21 Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт Петербург, Россия, 2019); Всероссийская конференция «Химия нитросоединений и родственных азот-кислородных систем» (Москва, Россия, 2019); The Fifth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Moscow, Russia, 2019); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, Россия, 2021), The Sixth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Moscow, Russia, 2022);

Работа выполнена при финансовой поддержке: РФФИ (гранты 19-73-00145, 19-13-00084, 22-15-00041), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение с ИОХ им. Н.Д. Зелинского № 075-15-2020-803).

**Структура и объем работы.** Материал диссертации изложен на 221 странице машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение и выводы, список литературы и

список работ, опубликованных автором по теме диссертации. Диссертация содержит 51 рисунок, 61 таблицу и 78 схем. Список литературы включает 254 наименования.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цели и задачи, изложены научная новизна и практическая значимость результатов исследования, указана их апробация.

**Обзор литературы** посвящен систематизации данных об использовании производных изоксазола в мишень-ориентированном дизайне лекарственных веществ с противоопухолевой активностью. Описаны синтетические подходы к целевым соединениям, приведены основные результаты их биологических испытаний.

**Экспериментальная часть** описывает синтез новых функционализированных производных изоксазола, результаты физико-химических методов анализа полученных соединений, а также методики биологических испытаний и фотофизических экспериментов.

Ранее в нашей лаборатории был разработан метод синтеза 3-EWG-5-нитроизоксазолов на основе реакции гетероциклизации электрофильных алкенов и тетранитрометана (ТНМ), активированного триэтиламино (ТЭА). Было также показано, что 5-нитроизоксазолы могут быть восстановлены в 5-аминоизоксазолы, что открывает новые пути функционализации изоксазольного цикла и позволяет синтезировать широкий спектр соединений с ожидаемой биологической активностью. Было найдено, что арилзамещенные винилкетоны при взаимодействии с ТНМ образуют 4-нитроизоксазолы вместо 5-нитроизоксазолов.

Данная диссертационная работа является новым этапом в изучении химии производных изоксазолов и включает следующие направления\разделы: 1) направленный синтез бис(5-аминоизоксазолов) в качестве бивалентных лигандов AMPA рецептора; 2) разработку хемоселективного метода синтеза 3-EWG-4-нитро-5-аминоизоксазолов и скрининг их антибактериальной активности; 3) разработку препаративно удобных методов синтеза 3-арилгетарил-4-нитроизоксазолов; 4) синтез 4-нитро-5-стирилизоксазолов и изучение их фотофизических характеристик; 5) синтез VF<sub>2</sub>-комплексов изоксазолсодержащих β-дикетонов и изучение их фотофизических характеристик; 6) синтез 5-метил-4-ациламиноизоксазолов для изучения противораковой активности.

### **1. Гетероциклизация электрофильных диенов. Синтез бис(5-аминоизоксазолов) – положительных модуляторов AMPA-рецептора**

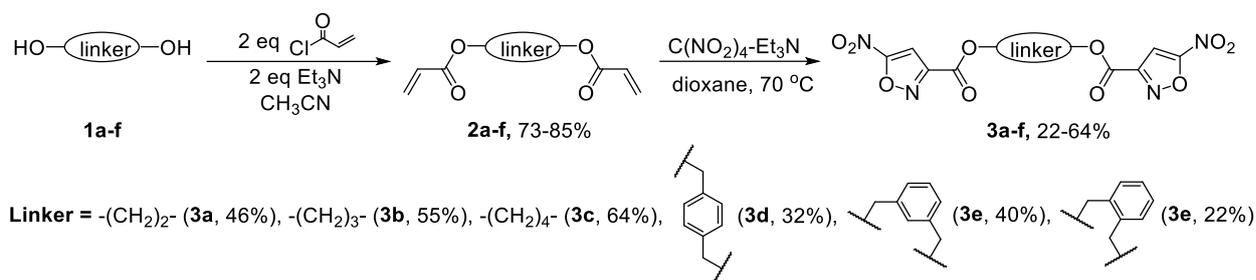
Ранее нами было показано, что разработанный нами метод синтеза 5-нитроизоксазолов может быть использован для синтеза бис(5-нитроизоксазолов)<sup>1</sup>. В рамках данной работы нами было предложено использовать этот подход для направленного синтеза бис(5-аминоизоксазолов), так как, согласно компьютерным расчетам, такие соединения представляют интерес в качестве бивалентных лигандов AMPA рецептора. Для этой цели исходя из диолов **1a-f** с помощью последовательности реакции ацилирования и гетероциклизации были получены

---

<sup>1</sup> Василенко Д.А., Кандидатская диссертация, 2017, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

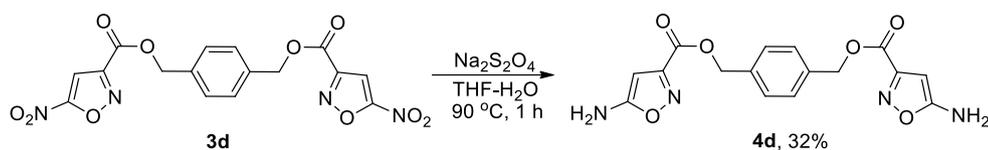
бис(5-нитроизоксазолы) **3a-f** с линейным алифатическим и бис(метилен)бензольными линкерами (схема 1).

### Схема 1



Согласно компьютерным расчетам, наибольший интерес в качестве положительного модулятора AMPA рецептора представляет бис(5-аминоизоксазол) **4d**, в котором гетероциклические фрагменты связаны ароматическим линкером. Целевой бис(амин) **4d** был получен восстановлением соответствующего нитропроизводного **3d** с использованием дитионита натрия (схема 2).

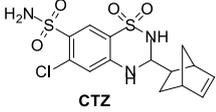
### Схема 2



Взаимодействие бис(изоксазола) **4d** с AMPA рецептором было изучено методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) с использованием свежесыведенных нейронов Пуркинье мозжечка новорожденных крыс<sup>2</sup>. Было показано, что исследуемый бис(изоксазол) **4d** потенцирует каинат-индуцированные токи в широком диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  до  $10^{-6}$  М с максимумом потенцирования 170% в субнаномолярной концентрации при  $10^{-11}$  М (табл.1).

Следует отметить, что значения эффективной концентрации для соединения **4d** значительно превосходит показатели для известного стандарта – циклотиазида (**CTZ**).

**Таблица 1.** Концентрационное влияние **4d** и **CTZ** на каинат-индуцированные токи AMPA-рецептора в клетках Пуркинье мозжечка крысы.

Соединение	Число нейронов	Концентрация соединения/М, текущая амплитуда (% к контролю, $\pm$ SD)						
		$10^{-12}$	$10^{-11}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$
<b>4d</b>	4	141 $\pm$ 7	172 $\pm$ 9	152 $\pm$ 7	144 $\pm$ 5	129 $\pm$ 4	113 $\pm$ 4	105 $\pm$ 3
	8						100 $\pm$ 3	145 $\pm$ 11

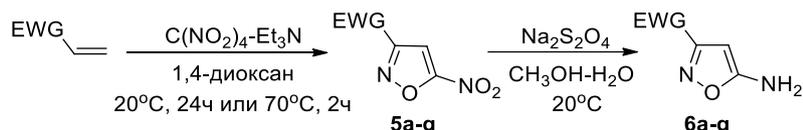
Таким образом, для бис(5-нитроизоксазолов) найдены условия восстановления нитрогруппы, в результате чего был получен бис(5-аминоизоксазол) **4d** – эффективный положительный модулятор AMPA рецептора, проявляющий активность в субнаномолярном диапазоне концентраций.

<sup>2</sup> Биологические испытания выполнены в ИФАВ РАН к.б.н. В.Л. Замойским и д.б.н. В.В. Григорьевым

## 2. Нитрование 3-EWG-5-амино-изоксазолов: синтез 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов

При отсутствии заместителя в положении 4 изоксазольного цикла 3-EWG-5-аминоизоксазолы представляют интерес для дальнейшей функционализации этого положения электрофильными агентами, в частности, для введения нитрогруппы. В связи с этим в данной части работы был осуществлен поиск оптимальных условий нитрования с целью получения 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов. Для этой цели с использованием разработанного ранее метода была получена серия 5-аминоизоксазолов **6a-g** (схема 3).

Схема 3



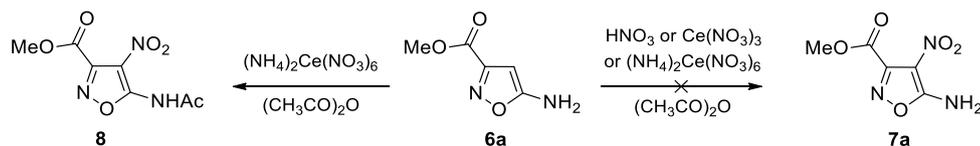
EWG = COOMe, **5a** (60%), **6a** (40%); COMe, **5b** (80%), **6b** (30%); COEt, **5c** (86%), **6c** (32%); CPh, **5d** (85%), **6d** (40%);

PO(OEt)<sub>2</sub>, **5e** (80%), **6e** (45%); , **5f** (75%), **6f** (38%); , **5g** (70%), **6g** (40%)

Учитывая низкую нуклеофильность 3-EWG-5-аминоизоксазолов, мы предположили, что введение нитрогруппы в положение 4 изоксазольного цикла можно осуществить без использования дополнительной стадии ацилирования аминогруппы.

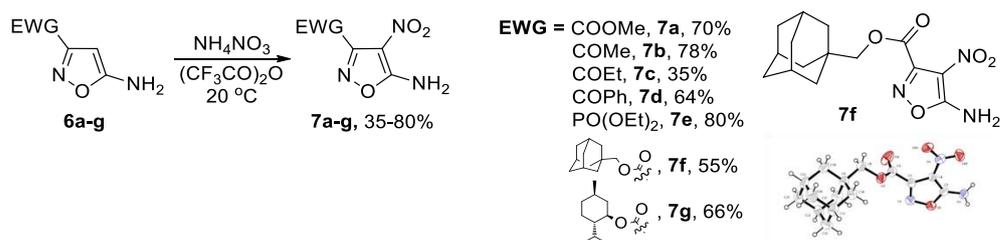
В ходе поиска оптимальных условий нитрования модельного соединения **6a** было показано, что нитрование под действием ацетилнитрата, генерируемого *in situ* в смеси уксусного ангидрида с азотной кислотой приводит к деструкции гетероцикла, а с нитратом церия или церий аммоний нитратом наряду с реакцией нитрования протекает ацилирование аминогруппы с образованием соединения **8** (схема 4).

Схема 4



Дальнейший поиск нитрующих реагентов показал, что наилучшие результаты дает нитрующая смесь на основе нитрата аммония в трифторуксусном ангидриде в качестве растворителя. В найденных оптимальных условиях была получена серия 5-амино-4-нитроизоксазолов **7a-g** (схема 5).

Схема 5



Скрининг антибактериальной и противогрибковой активности соединений **7a-g**, **8** был проведен в научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (“НИИНА”) с использованием дисково-диффузионного метода<sup>3</sup>. Зоны ингибирования роста культур измеряли по истечении 24 часов. Было показано, что соединения **7d**, **7f** и **8** проявляют активность по отношению к бактериальным грамположительным клеткам *B. Subtilis* (**7f**, **8**) и грамотрицательным *E. Coli* (**7d**, **8**), при этом гетероцикл **8** также показал противогрибковую активность по отношению к грибковой культуре *A. Niger*.

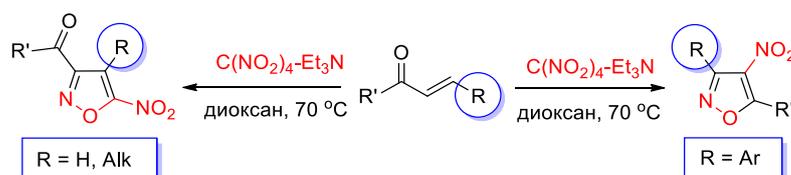
Для проявивших активность в первичном скрининге соединений **7d**, **7f** и **8** было дополнительно изучено их действие на культуру резистентного стафилококка (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) с положительным контролем. В качестве контроля использовали стандартные диски с антибиотиками по 30 мкг ванкомицина (для *B. Subtilis* и MRSA), 10 мкг гентамицина (для *E. Coli*) и 40 мкг флуконазола (для грибов *A. Niger* и дрожжей *C. Albicans*). Было показано, что ацилированный 5-амино-4-нитроизоксазол **8** проявляет антибактериальную активность по отношению ко всем изучаемым культурам (*B. Subtilis*, MRSA, *E. Coli*), сопоставимую с активностью антибиотиков положительного контроля. Изоксазолы **7d** и **7f** также показали хорошие результаты по отношению к бактериям *B. Subtilis* и MRSA.

Таким образом, была разработана простая и эффективная методика синтеза 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов из 3-EWG-5-аминоизоксазолов со свободной аминогруппой и различными функциональными группами в положении 3 гетероцикла. В результате изучения антибактериальной и противогрибковой активности 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов на серии культур было найдено, что гетероцикл **8** является наиболее перспективным объектом для дальнейшего изучения биологической активности.

### 3. Разработка метода синтеза 3-арил\гетарилзамещенных 4-нитроизоксазолов

Ранее мы показали, что арилзамещенные винилкетоны под действием комплекса ТНМ-ТЭА образуют 4-нитроизоксазолы вместо ожидаемых 5-нитроизоксазолов (схема 6).

Схема 6

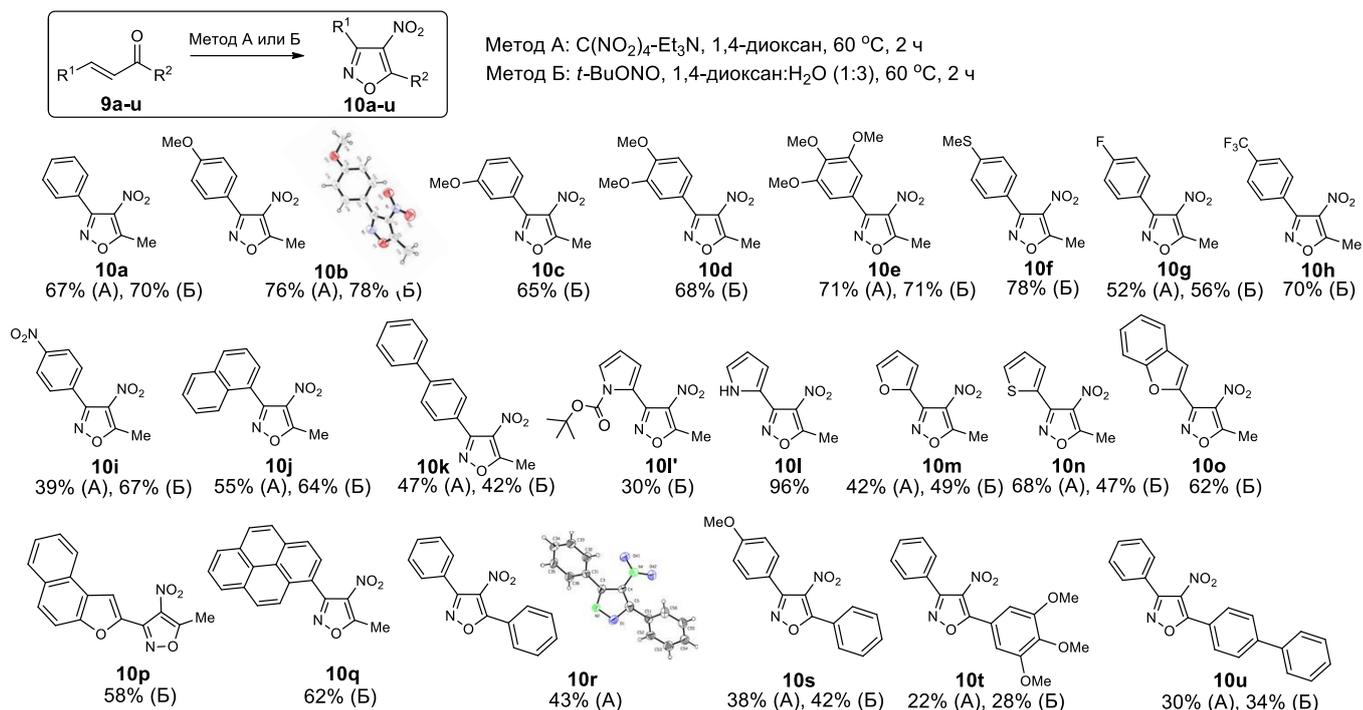


Мы предположили, что образование 4-нитроизоксазолов протекает по радикальному механизму с участием нитрозных газов (смеси NO и NO<sub>2</sub>), источником которых выступает ТНМ. С учетом данной функции тетранитрометана в реакции гетероциклизации в рамках данной работы была поставлена задача найти более дешевый, синтетически доступный и более безопасный источник нитрозных газов. В ходе оптимизации были опробованы различные системы на основе NaNO<sub>2</sub>/AcOH и *t*-BuONO/H<sub>2</sub>O, в результате было найдено, что полная конверсия алкена **9b** в изоксазол **10b** происходит при использовании 10 экв. *t*-BuONO в растворе

<sup>3</sup> Биологические испытания выполнены к.х.н. Алферовой В.А.

диоксан/вода (0.25 мл/0.75 мл) при 60 °С в течение 2 часов. В этих условиях 4-нитроизоксазол **10b** был выделен с выходом 78% (схема 7).

Схема 7



В найденных оптимальных условиях мы ввели в реакцию гетероциклизации ряд  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов, содержащих различные арильные и гетарильные заместители. Для сравнения эффективности 2 типов реагентов (ТНМ и  $t\text{-BuONO}$ ) в ряде случаев для получения 4-нитроизоксазолов использовались обе системы. Как показано на схеме 8, электронная природа заместителей в ароматическом кольце слабо влияла на реакционную способность  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов **9a–u**, хотя, в целом, изоксазолы с электронодонорными группами (**10b–f**) были получены с большими выходами, чем с электроноакцепторными (**10g–i**). Найденные условия гетероциклизации могут быть также использованы для синтеза 4-нитроизоксазолов с полиароматическими заместителями (**10j, 10k, 10o–q**). Возможность синтеза 4-нитроизоксазолов с гетероциклическим заместителем в положении 3 гетероцикла была изучена на примере  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов (**9l–p**). Оказалось, что в условиях гетероциклизации пирролсодержащий алкен **9l** претерпевает деструкцию, в связи с чем изоксазол **10l** был получен при использовании в реакции Вос-защитенного алкена **9l'** и последующего удаления защиты. Мы также показали возможность получения 3,5-диарил-4-нитроизоксазолов **10r–u**, которые образуются в результате гетероциклизации соответствующих алкенов **9r–u**. Умеренные выходы некоторых продуктов реакции, по-видимому, связаны с низкой растворимостью как исходных алкенов, так и целевых 4-нитроизоксазолов.

С использованием доступного и безопасного в работе *трет*-бутилнитрита в качестве реагента гетероциклизации оказалось возможным масштабирование реакции. На примере соединений **10b, 10d, 10e** было показано, что 4-нитроизоксазолы могут быть получены в

граммовых количествах с высокими выходами: при использовании 20 ммоль исходных алкенов выходы 4-нитроизоксазолов **10b**, **10d**, **10e** составили 72, 62, 65%, соответственно.

Таким образом, нами был разработан общий препаративный метод синтеза 3-арил-4-нитроизоксазолов из легкодоступных и удобных в работе реагентов с получением целевых гетероциклов с высокими выходами в граммовых количествах.

#### 4. 5-Стирил-4-нитроизоксазолы: синтез и флуоресцентные свойства

Разработанный метод синтеза 3-арил-4-нитроизоксазолов был далее использован для получения  $\pi$ -сопряженных 4-нитро-5-стирилизоксазолов «push-pull» типа, в которых фрагмент донора электронов сопряжен с акцептором электронов через винильную группу.

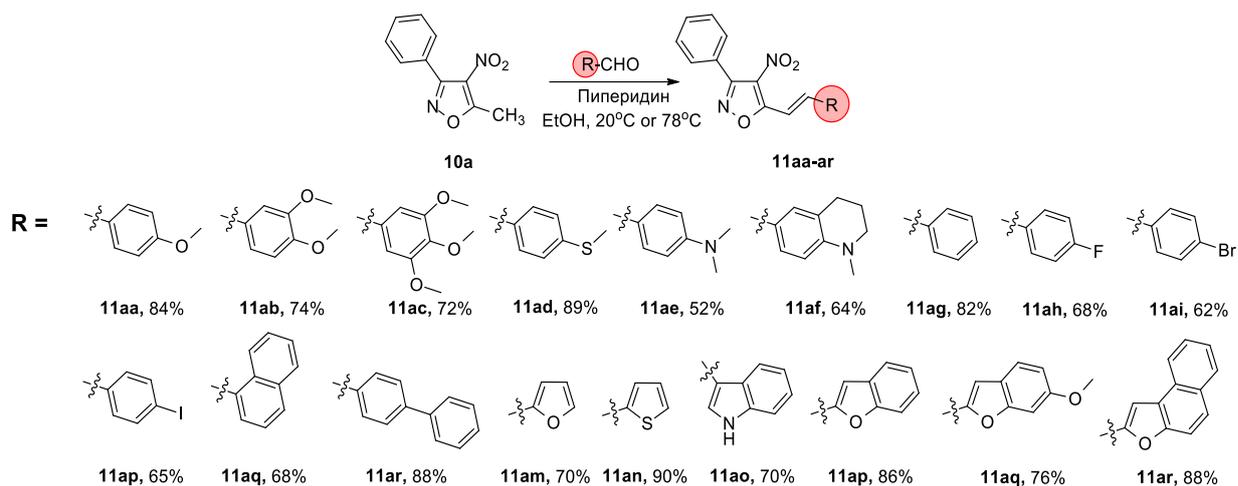
В ходе оптимизации реакции конденсации проведенной на модельном 5-метил-4-нитроизоксазоле **10a** и анисовом альдегиде было найдено, что наилучший выход продукта **11aa** достигается при использовании в качестве растворителя этанола в присутствии основания – пиперидина при комнатной температуре в течение 24 ч или при кипячении в этаноле в течение 2 ч.

На первом этапе нами было изучено влияние ароматических или гетероароматических фрагментов в стирильном фрагменте изоксазольного цикла на фотофизические свойства 5-стирилизоксазолов. Для этой цели в оптимальных условиях была проведена конденсация 3-фенил-4-нитроизоксазола **10a** с различными альдегидами, в результате чего с высокими выходами была получена большая серия алкенов **11aa–ar** (схема 8).

Для всех синтезированных соединений **11aa–ar** были изучены фотофизические свойства: зарегистрированы спектры УФ и флуоресценции, измерены коэффициенты поглощения и квантовые выходы флуоресценции, репрезентативные результаты приведены в табл. 2.

Данные таблицы 2 показывают, что на флуоресцентные свойства молекулы оказывает заметное влияние электронная природа заместителя в ароматическом кольце стирильного фрагмента. Было найдено, что при наличии фенильного или *n*-фторфенильного заместителей в стирильном фрагменте изоксазолов **11ag** и **11ah** флуоресценция в видимой области спектра не наблюдается. Изоксазол **11ad**, содержащий *n*-тиометильную группу в ароматическом кольце стирильного фрагмента, характеризуется одним из наиболее высоких квантовых выходов флуоресценции, а гетероцикл **11ae** с *n*-(диметил)фенильным фрагментом имеет наиболее длинноволновый максимум флуоресценции и наибольший коэффициент поглощения. Замена в стирильном фрагменте ароматических заместителей на гетероароматические, в целом, не приводит к заметным изменениям флуоресцентных свойств исследуемой  $\pi$ -системы, однако увеличение протяженности  $\pi$ -системы приводит к увеличению квантовых выходов и смещению полосы флуоресценции в красную область (соединения **11ak**, **al**, **ap–ar**). Так, соединение **11ar** с нафтофурановым заместителем в стирильном фрагменте имеет наибольший квантовый выход в данной серии при максимуме полосы излучения более 550 нм.

## Схема 8



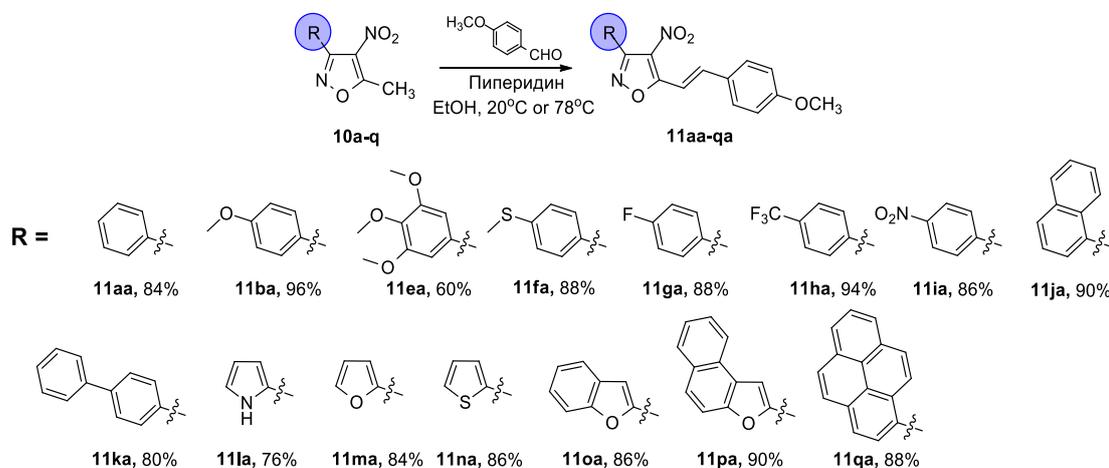
**Таблица 2.** Выборочные фотофизические характеристики 5-стирилизоксазолов **11aa–ar** (растворитель – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

N	R	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ , nm	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ , nm	$\Delta\lambda$ , cm <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\psi$ , %
11aa		396	518	5948	16907	0.64
11ad		407	549	6355	25961	<b>3.56</b>
11ae		484	610	4268	34436	0.06
11ag		360	–	–	21401	–
11ah		360	–	–	24018	–
11ak		392	523	6390	14406	1.52
11al		382	515	6761	24456	2.21
11m		392	498	5430	23777	0.32
11ap		403	514	5359	23100	2.93
11ar		440	557	4774	26187	<b>4.31</b>

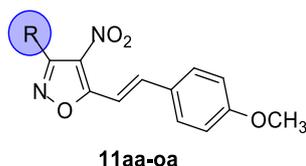
Следующим этапом работы явилось изучение влияния заместителей в положении 3 изоксазольного цикла на флуоресцентные свойства 5-стирилизоксазолов. Для этого в реакции конденсации был использован ряд 3-арил\гетарил-4-нитро-5-метилизоксазолов **10a–q**, в качестве карбонильной компоненты был выбран анисовый альдегид, который удобен для спектрального анализа. В результате был синтезирован ряд гетероциклов **11aa–qa** с высокими выходами (схема 9).

Фотофизические свойства соединений **11aa–qa** исследовали методами УФ- и флуоресцентной спектроскопии в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при комнатной температуре, также были измерены коэффициенты поглощения и квантовые выходы флуоресценции, выборочные результаты приведены в табл. 3.

### Схема 9.



**Таблица 3.** Выборочные фотофизические характеристики 5-стирилизоксазолов **11aa–qa** (растворитель – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).



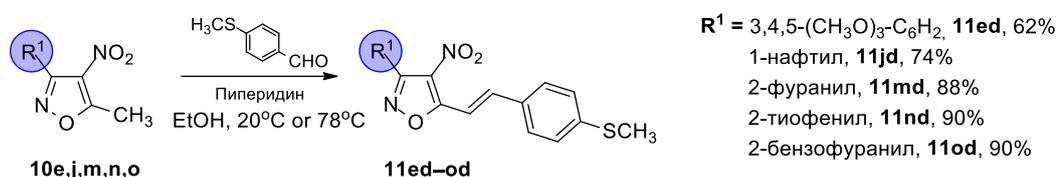
N	R	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ , nm	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ , nm	$\Delta\lambda$ , cm <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\psi$ , %
<b>11aa</b>		396	518	5948	16907	0.64
<b>11ba</b>		395	522	6159	23116	0.50
<b>11ha</b>		398	523	6005	23603	0.75
<b>11ia</b>		398	526	6078	38680	0.82
<b>11ja</b>		397	516	5809	24156	1.06
<b>11oa</b>		400	530	6132	25234	1.20
<b>11qa</b>		396	–	–	30588	–

Основные максимумы поглощения для исследованных соединений **11aa–qa** находятся в области 395–400 нм, причем наибольшим коэффициентом поглощения обладает соединение **11ia** с *p*-NO<sub>2</sub>-группой в ароматическом заместителе положения 3. Было найдено, что максимумы эмиссии гетероциклов **11aa–qa** находятся в диапазоне 512–530 нм, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния природы арильного фрагмента в положении 3 гетероцикла на флуоресцентные свойства. Тем не менее, можно отметить, что соединения с электроноакцепторными заместителями в ароматическом фрагменте, например, с CF<sub>3</sub>-группой

(гетероцикл **11ha**) или NO<sub>2</sub>-группой (гетероцикл **11ia**), обладают более высоким квантовыми выходами флуоресценции, что может быть связано с более эффективным внутримолекулярным переносом заряда π-системы. Кроме того, увеличение протяженности π-системы за счет заместителей в положении 3 изоксазольного цикла также приводит к увеличению квантового выхода (соединения **11ja**, **11ka**). Однако оказалось, что для изоксазола **11qa**, который содержит полиароматический пиреновый фрагмент в положении 3 гетероцикла, флуоресценция отсутствует.

С учетом полученных данных о влиянии заместителей в положениях 3 и 5 изоксазольного цикла на фотофизические свойства 5-стирилизоксазолов был синтезирован ряд стирилизоксазолов **11ed–od**, содержащих фрагменты, обеспечивающие наиболее длинноволновые максимумы флуоресценции и наилучшие квантовые выходы (схема 10).

Схема 10.



Результаты измерения спектров УФ и флуоресценции подтвердили ранее обнаруженные общие закономерности «структура-свойство» 5-стирилизоксазолов: соединений **11jd–od** с гетарильными или нафтильными заместителями в положении 3 и *n*-тиометилфенильной группой в стирильном фрагменте показали достаточно высокие квантовые выходы и длинноволновые максимумы (>550 нм) полос флуоресценции. Для соединения **11jd** с наибольшим квантовым выходом флуоресценции (4.63%) данной серии 5-стирилизоксазолов было изучено влияние различных растворителей и ионов металлов на флуоресцентные свойства. Было показано, что для нового класса π-сопряженных систем на основе изоксазола наблюдается эффект сольватохромизма. Для изучения хемосенсорных свойств гетероцикла **11jd** были измерены спектры флуоресценции в присутствии большого ряда ионов металлов (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup>, Y<sup>3+</sup>) в различных концентрациях. Наибольший отклик в спектрах флуоресценции (тушение флуоресценции) был получен при добавлении к раствору производного изоксазола **11jd** ионов редкоземельных металлов Ga<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup> и Y<sup>3+</sup>.

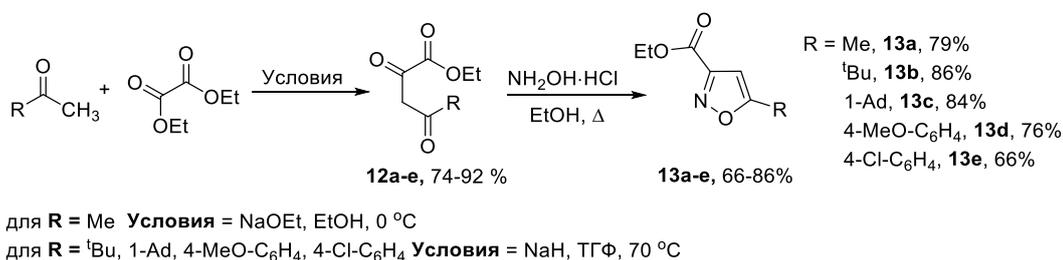
Таким образом, был разработан универсальный метод синтеза 3-арил-4-нитро-5-стирилизоксазолов с использованием доступных исходных соединений, получены серии π-сопряженных систем на основе изоксазола с большим разнообразием заместителей. Для всех синтезированных соединений изучены фотофизические свойства, найдены корреляции между структурными параметрами и спектральными данными, такими как максимумы полос поглощения и флуоресценции, квантовый выход, коэффициент экстинкции и др. Показано, что для 5-стирилизоксазолов характерен эффект сольватохромизма, наблюдаются хемосенсорные свойства к ряду ионов редкоземельных металлов.

## 5. BF<sub>2</sub>-комплексы изоксазолсодержащих β-дикетонов – новый структурный тип флуорофоров

В данной части работы предложен синтетический подход к дифторборным комплексам изоксазолсодержащих β-дикетонов, которые являются новым структурным типом флуорофоров с ценными фотофизическими свойствами.

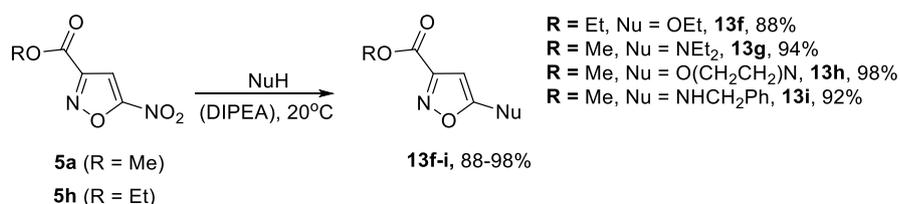
Синтез изоксазолсодержащих дикетонов с различными ароматическими и гетероциклическими заместителями включал получение сложных эфиров изоксазол-3-карбоновой кислоты, и их последующую конденсацию с метилкетонами. Сложные эфиры **13a-e** были синтезированы стандартным методом путем гетероциклизации 1,3-дикетонов **12a-e** под действием гидроксилamina в этаноле, при этом исходные дикетоны **12a-e** были получены в реакции конденсации соответствующих метилкетонов с диэтилоксалатом (схема 11)

Схема 11.



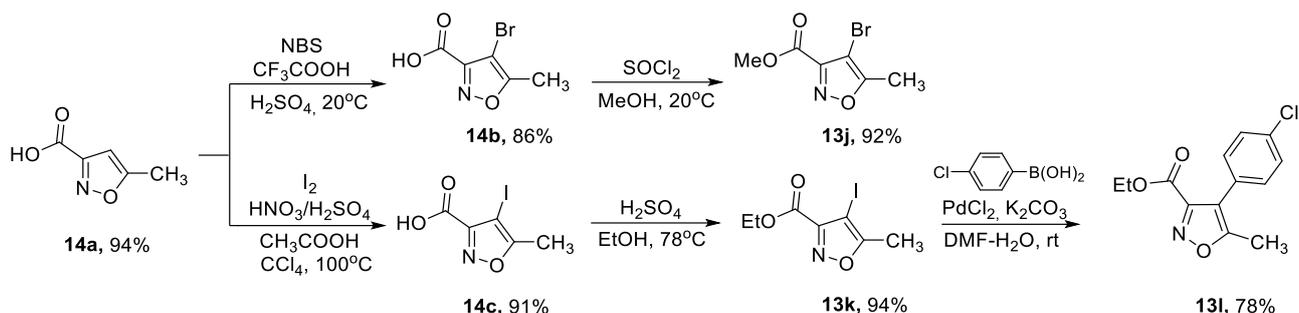
Для получения эфиров **13f-i**, содержащих amino- или алкоксигруппы в изоксазольном цикле был использован разработанный в нашей лаборатории метод функционализации производных изоксазола с использованием реакции нуклеофильного замещения нитрогруппы 5-нитроизоксазолов **5a,h** на различные нуклеофилы (схема 12).

Схема 12.



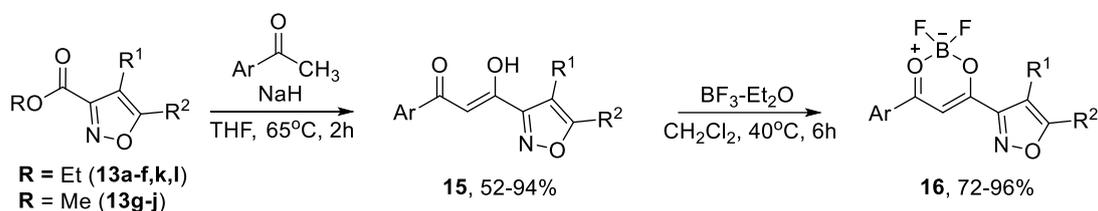
Введение заместителя в положении 4 изоксазольного цикла проводили исходя из изоксазол-3-карбоновой кислоты **14a** с использованием реакции электрофильного замещения с участием галогенов. 4-Галогенизоксазол-3-карбоновые кислоты **14b** и **14c** далее подвергались этерификации с образованием гетероциклов **13j,k**. Использование 4-иодизоксазола **13k** в реакции кросс-сочетания Сузуки позволило получить 4-арилзамещенный изоксазол **13l** с хорошим выходом (схема 13).

### Схема 13.



Производные изоксазола **13a-l** были далее введены в реакцию сложноэфирной конденсации с ароматическими метилкетонами, в результате чего была получена серия  $\beta$ -дикетонов **15aa-la**. Их последующее взаимодействие с избытком эфирата трехфтористого бора (4-5 экв.) привело к образованию  $\text{BF}_2$ -комплексов **16aa-la** с высокими выходами.

### Схема 14.



Для  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{Me}$ ,  $\text{Ar} = 4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4$  (**15aa**, 92%; **16aa**, 92%),  $4\text{-MeO-3,5-}^t\text{Bu}_2\text{-C}_6\text{H}_2$  (**15ab**, 90%; **16ab**, 91%),  $3,4,5\text{-(MeO)}_3\text{C}_6\text{H}_2$  (**15ac**, 88%; **16ac**, 87%),  $4\text{-MeS-C}_6\text{H}_4$  (**15ad**, 86%; **16ad**, 92%),  $4\text{-CF}_3\text{-C}_6\text{H}_4$  (**15ae**, 84%; **16ae**, 85%),  $4\text{-F-C}_6\text{H}_4$  (**15af**, 86%; **16af**, 83%),  $4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$  (**15ag**, 90%; **16ag**, 88%),  $\text{Ph}$  (**15ah**, 88%; **16ah**, 90%),  $4\text{-Ph-C}_6\text{H}_4$  (**15ai**, 90%; **16ai**, 92%),  $1\text{-Napht}$  (**15aj**, 82%; **16aj**, 93%)

Для  $\text{Ar} = 4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = ^t\text{Bu}$  (**15ba**, 94%; **16ba**, 96%),  $1\text{-Ad}$  (**15ca**, 78%; **16ca**, 88%),  $4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4$  (**15da**, 82%; **16da**, 89%),  $4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$  (**15ea**, 72%; **16ea**, 87%),  $\text{OEt}$  (**15fa**, 74%; **16fa**, 86%),  $\text{NEt}_2$  (**15ga**, 71%; **16ga**, 84%),  $\text{O(CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$  (**15ha**, 72%; **16ha**, 85%),  $\text{PhCH}_2\text{NH}$  (**15ia**, 52%; **16ia**, 72%)

Для  $\text{Ar} = 4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{R}^1 = \text{Me}$ ,  $\text{R}^2 = \text{Br}$  (**15ja**, 82%; **16ja**, 85%),  $\text{I}$  (**15ka**, 84%; **16ka**, 91%),  $4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$  (**15la**, 81%; **16la**, 85%)

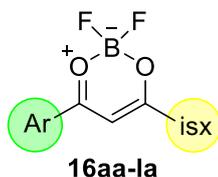
Для всех  $\text{BF}_2$ -комплексов **16aa-la** были зарегистрированы спектры УФ и флуоресценции, измерены коэффициенты поглощения и квантовые выходы флуоресценции, выборочные данные приведены в табл. 4. На основании полученных данных был проведен анализ зависимости фотофизических характеристик от структуры изученных соединений.

Было найдено, что для соединений **16aa-la** наиболее длинноволновые максимумы поглощения находятся в видимой области при 355–418 нм, а максимумы эмиссии лежат в диапазоне 337–596 нм.

Согласно табл. 4, флуоресцентные свойства  $\text{BF}_2$ -комплексов **16aa-la** зависят от природы заместителей в ароматическом кольце и в изоксазольном цикле. Так, сравнение  $\text{BF}_2$ -комплекса фенилдикетоната **16ah** с аналогами **16aa**, **16ad** и **16ae**, показывает, что введение акцепторной группы  $-\text{CF}_3$  в ароматическое кольцо (соединение **16ae**) приводит к уменьшению квантового выхода, при этом введение сильных мезомерных донорных групп  $-\text{OMe}$ ,  $-\text{SMe}$  (соединения **16aa**, **16ad**) значительно увеличивает квантовые выходы. На примере соединений **16af** и **16ag**, содержащих *n*-галогенфенильный фрагмент, можно видеть, что квантовый выход флуоресценции растет с уменьшением электроотрицательности атома галогена. Кроме того,

увеличение протяженности  $\pi$ -системы для соединений **16ai** и **16aj**, как и следовало ожидать, приводит к росту квантового выхода.

**Таблица 4.** Фотофизические характеристики для выборочных BF<sub>2</sub>-комплексов **16** (растворитель – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).



N	Ar	Isx	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ , nm	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ , nm	$\Delta\lambda$ , cm <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\psi$ , %
<b>16aa</b>			393	438	2614	49495	99.8
<b>16ad</b>			418	501	3963	52961	48.8
<b>16ae</b>			355	388	2396	31574	5.7
<b>16ah</b>			357	389	2304	23916	8.8
<b>16ai</b>			392	464	3959	45512	74.5
<b>16ca</b>			393	437	2562	39911	99.9
<b>16da</b>			396	553	7169	49162	0.7
<b>16ea</b>			396	442	2628	43416	71.4
<b>16fa</b>			395	440	2589	46004	56.7
<b>16ha</b>			386	578	8606	45899	0.1
<b>16la</b>			391	442	2951	37791	7.5

Было также найдено, введение в положение 4 изоксазольного цикла атомов галогенов или *n*-хлорфенильного заместителя (соединения **16ja-la**) практически не меняет положения максимумов поглощения и флуоресценции по сравнению с комплексом **16aa**, содержащим 5-метилизоксазольный фрагмент, однако значительно понижает квантовые выходы (табл. 4).

Наличие объемных *трет*-бутильной или 1-адамантильной группы в положении 5 изоксазольного кольца соединений **16ba**, **16ca** практически не изменяет фотофизические характеристики по сравнению соединением сравнения **16aa**, однако введение в положение 5 изоксазольного цикла донорного *n*-метоксифенильного заместителя (соединение **16da**) приводит к батохромному смещению максимума флуоресценции почти на 100 нм и уменьшению квантового выхода до 0.7%. Аналогичный эффект наблюдается при введении донорных амино- (соединения **16ga-ia**) и алкокси- (соединение **16fa**) групп в изоксазольный цикл. Введение акцепторного *n*-хлорфенильного заместителя в изоксазольное кольцо (соединение **16ea**) приводит к относительно небольшому снижению квантового выхода по отношению к соединению **16aa** с сохранением положения максимумов полос поглощения и флуоресценции.

На примере соединения **16aa**, было показано, что для нового класса  $\pi$ -сопряженных систем на основе изоксазола наблюдается эффект сольватохромизма. С увеличением диэлектрической проницаемости растворителя происходит батохромный сдвиг максимумов полос флуоресценции в спектрах производного изоксазола **16aa**.

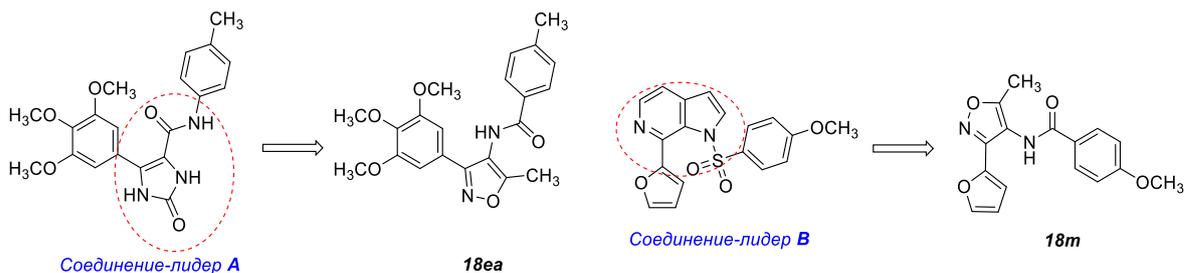
Наряду с фотофизическими свойствами для ряда  $\text{BF}_2$ -комплексов (**16ac**, **16af**, **16ag**, **16ah**, **16ai**, **16aj**) и  $\beta$ -дикетонов (**15ac**, **15ag**, **15ah**, **15aj**) мы также провели скрининг противораковой активности с использованием МТТ-теста на 4 клеточных раковых линиях НСТ-116 (клетки карциномы прямой кишки человека), MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы человека), A549 (клетки аденокарциномы легкого человека) и SW480 (клетки аденокарциномы толстой кишки человека). Для оценки селективности действия исследуемых соединений, было также изучена их цитотоксичность по отношению к условно нормальным клеткам фибробластов легочной ткани (WI38). В целом,  $\beta$ -дикетоны и их  $\text{BF}_2$ -комплексы показали невысокую цитотоксичность, за исключением соединений **16af** и **16ah**, которые оказались активны на клетках НСТ-116 в низком микромолярном диапазоне концентраций ( $\text{IC}_{50} = 10.2-10.9$  мкМ), причем для этих же соединений наблюдается хорошая селективность к клеткам фибробластов WI38 ( $\text{IC}_{50} = 40-60$  мкМ).

Таким образом, разработан универсальный метод синтеза изоксазолсодержащих  $\beta$ -дикетонов и их  $\text{BF}_2$ -комплексов, изучены их фотофизические свойства, найдены корреляции между структурными параметрами и спектральными данными, такими как максимумы полос поглощения и флуоресценции, квантовый выход, коэффициент экстинкции и др. На примере нескольких структур, показана перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств данного структурного типа соединений.

## **6. 5-Метил-4-ациламиноизоксазолы: синтез и изучение антимиотической активности**

Следующим этапом исследований явилось использование 4-нитроизоксазолов для получения соединений противоопухолевого действия. В качестве соединений-лидеров для поиска активных структур среди производных изоксазола были выбраны аналоги комбретастина **A** и **B**, которые связываются с колхициновым сайтом связывания тубулина и проявляют цитотоксическую активность в наномолярном диапазоне концентраций. Соединения **A** и **B** состоят из 3 структурных субъединиц – центрального гетероциклического фрагмента и двух ароматических циклов, связанных линкерами. Мы провели биоизостерную замену

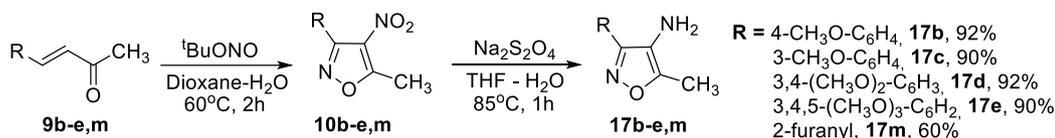
центральных синтетически труднодоступных гетероциклов на фрагмент изоксазола с целью изучения антимитотической активности (рис. 1).



**Рисунок 1.** Соединения-лидеры **A** и **B**, и их аналоги **18ea** и **18m**

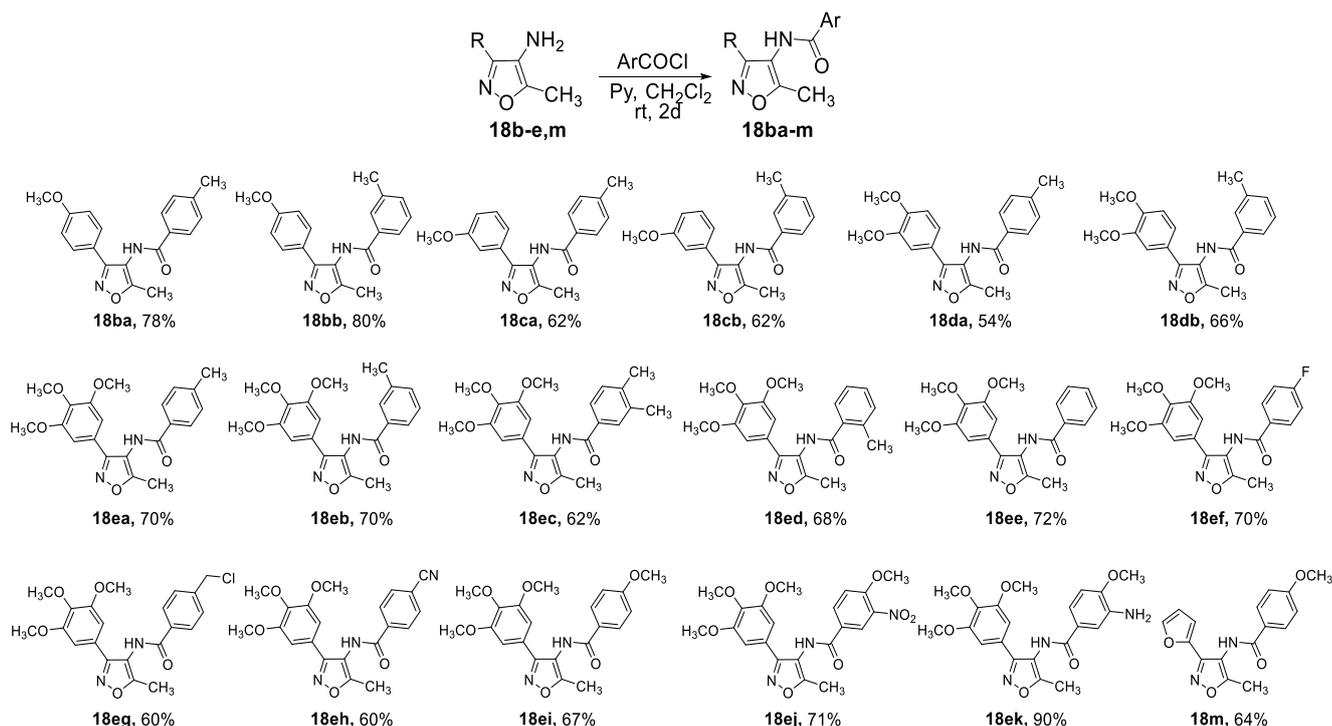
На первом этапе синтеза целевых молекул **18ae** и **18m** и их структурных аналогов была получена серия 4-аминоизоксазолов **17b-e,m** с использованием синтетической схемы, включающей образование 4-нитроизоксазолов **10b-e,m** реакцией гетероциклизации соответствующих  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов **9b-e,m**, и последующее восстановление нитрогруппы (схема 15).

**Схема 15.**



Ацилирование аминогруппы 4-аминоизоксазолов **17b-e,m** проводилось под действием хлорангидридов замещенных бензойных кислот в присутствии пиридина в качестве основания. Целевые 4-ациламиноизоксазолы **18ba-m** были получены с выходами от умеренных до высоких в зависимости от легкости выделения (схема 16).

**Схема 16.**



## 6.1. Изучение противораковой активности 4-ациламиноизоксазолов **18ba-m**<sup>4</sup>

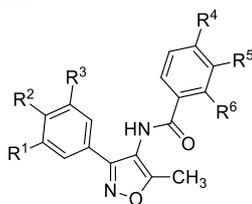
В ходе первичных исследований с помощью иммуофлуоресцентной микроскопии была изучена способность целевых 4-ациламиноизоксазолов **18ea** и **18m**, а также, аминоизоксазолов **17e**, **17m**, ингибировать полимеризацию тубулина в микротрубочки (МТ) в клетках эпителиальной карциномы легкого А549. Было найдено, что 4-аминоизоксазолы **17e** и **17m** и фуранзамещенный ациламиноизоксазол **18m** не оказывают влияния на микротрубочки и на пролиферацию раковых клеток. Более интересные результаты были получены для соединения **18ea**, которое продемонстрировало способность вызывать частичную деполимеризацию МТ в клетках А549 при высоких концентрациях (100  $\mu\text{M}$ ) и полностью ингибировать рост раковых клеток при концентрации 5  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} = 0.99 \mu\text{M}$ ). Следует отметить, что при концентрации 10  $\mu\text{M}$  не наблюдается деполимеризация МТ, однако происходит округление клеток, сильное отслаивание их от субстрата (42% при 10  $\mu\text{M}$ , 70% при 100  $\mu\text{M}$ ), а также клеточный апоптоз. Эти данные говорят о том, что 4-ациламиноизоксазол **18ea**, скорее всего, действует не только на тубулин, но и на другую неустановленную молекулярную мишень, взаимодействие с которой вносит существенный вклад в цитотоксическую активность соединения. С целью достижения большей селективности по отношению к раковым клеткам была также изучена противораковая активность аналогов 4-ациламиноизоксазола **18ea**, содержащих различные ароматические фрагменты в молекуле (табл. 5).

Изучение взаимосвязи “структура-активность” аналогов соединения **18ea** (табл. 5) показало, что удаление *n*-метильного заместителя в бензамидном фрагменте (**18ea**) приводит к снижению активности по отношению к тубулину и общей цитотоксичности. Такой же эффект наблюдался при замене метильной группы на другие заместители (**18ef**, **18eg**, **18ei**) независимо от их электронных свойств, объема и других параметров. Изменение положения метильной группы приводит к уменьшению активности в отношении к полимеризации тубулина в следующей последовательности: *p*- $\text{CH}_3 \approx m$ - $\text{CH}_3 > o$ - $\text{CH}_3 (\approx \text{H})$ , при этом аналогичным образом меняется цитотоксичность по отношению к клеточной линии LNCaP (табл. 5).

Можно также отметить, что, *n*- или *m*-метильный заместитель в бензамидной части 3-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазола (**18ea** и **18eb**) является важным структурным фрагментом для обеспечения цитотоксической активности и воздействия на МТ. Удаление одной или двух метоксигрупп из 3,4,5-триметоксифенильного фрагмента приводит к резкой потере активности: соединения **18ba–db** не оказывают воздействие на МТ, проявляют слабую цитотоксичность, либо ее отсутствие. Таким образом, исследование SAR показало, что 3,4,5-триметоксифенильный фрагмент в положении 3 изоксазольного цикла является ключевой структурной единицей, определяющей эффективность производных изоксазола как в отношении тубулина, так и других молекулярных мишеней.

<sup>4</sup> Биологические испытания выполнены на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ к.х.н. Ю.А. Грачевой, в Institute of Biological Sciences, Cell Biology and Biosystems Technology, University of Rostock д.б.н. С.А. Кузнецовым, в Центре медицинской химии, Тольяттинского государственного университета к.х.н. А.С. Буневым и в ИФАВ РАН д.х.н. Е.Ф. Шевцовой и к.м.н. П.Н. Шевцовым

**Таблица 5.** Данные иммунофлуоресцентной микроскопии и ингибирования роста клеток серии ациламиноизоксазолов **18ea** – **18ek**.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	Эффект на МТ и клеточную морфологию (100 μМ 24 ч)	Ингибирование роста клеток LNCaP, %		
								5μМ	10μМ	20μМ
<b>18ea</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	10 μМ: нормальные МТ, меньше прикрепленных клеток, апоптоз, рост клеток отсутствует 100 μМ: частичная деполимеризация МТ, много округлых клеток, отслоение клеток, апоптоз	81.3±3.7	84.6±1.7	93.1±1.1
<b>18eb</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	Много округлых клеток, отслоение клеток, нормальные МТ, в некоторых клетках частичная дезорганизация МТ	83.8±1.6	84.5±2.7	90.6±1.1
<b>18ec</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	N.d.	82.3±0.8	84.7±1.5	93.4±1.4
<b>18ed</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	Нет эффекта	9.9±16.3	8.3±17.3	52.3±3.5
<b>18ee</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	Нет эффекта	2.2±3.9	2.8±12.6	14.8±6.4
<b>18ef</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	F	H	H	Нет эффекта	1.6±14.3	8.7±5.4	63.6±4.2
<b>18eg</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	H	10 μМ: не влияет на МТ 100 μМ: отсутствие клеток в субстрате, полное отделение клеток	75.2±0.5	90.0±0.9	98.0±1.2
<b>18eh</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CN	H	H	N.d.	1.0±5.7	0.8±5.2	24.9±4.1
<b>18ei</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	Нет эффекта	80.1±3.8	86.3±1.3	88.1±1.5
<b>18ej</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H	N.d.	11.1±9.6	28.4±6.8	78.7±4.2
<b>18ek</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	Нормальные МТ, только в некоторых клетках частичная дезорганизация МТ, нет изменений в клеточной морфологии.	84.7±3.2	86.6±0.3	87.7±2.1
Кол- хи- цин							Полная деполимеризация МТ, (1 μМ, 24 ч)	n.d.	n.d.	n.d.

Дополнительное биотестирование ряда производных изоксазола **18** на серии раковых и условно нормальных клеточных линиях выявило достаточно высокую цитотоксичность для большинства соединений (табл. 6).

**Таблица 6.** Результаты МТТ-теста для ряда 4-ациламиноизоксазолов **18**

	<b>18ea</b>	<b>18eb</b>	<b>18eg</b>	<b>18ei</b>	<b>18ek</b>	<b>18db</b>
	IC <sub>50</sub> , μМ					
<i>LNCaP</i>	0.335±0.033	0.301±0.036	0.773±0.29	4.85±0.67	1.56±0.25	n.d.
<i>A-375</i>	0.157±0.084	1.67±0.23	n.d.	2.86±0.39	1.18±0.16	n.d.
<i>A431</i>	0.319±0.43	2.68±0.53	11.11±5.78	4.00±0.62	n.d.	n.d.
<i>PC3</i>	>75	>75	n.d.	>75	>75	>75
<i>A549</i>	0.271±0.046	1.21±0.18	n.d.	2.18±0.37	1.25±0.19	>75
<i>WI-26 VA4</i>	0.269±0.021	2.26±0.20	1.33±0.57	3.26±0.22	1.56±0.12	>75
<i>HUVEC</i>	0.346±0.024	5.58±0.52	n.d.	7.95±0.65	3.72±0.23	n.d.
<i>Primary fibroblast</i>	>75	>75	4.71±2.82	>75	>75	>75

**LNCaP** – клетки аденокарциномы предстательной железы, **A-375** – клетки злокачественной меланомы, **A431** – клетки эпидермальной карциномы, **PC3** – клетки рака простаты, **A549** – клетки аденокарциномы эпителия легкого, **WI-26 VA4** – клетки легкого человека, **HUVEC** – эндотелиальные клетки пупочной вены, **Primary fibroblast** – клетки соединительной ткани организма

В целом, 3,4,5-триметоксифенилзамещенные изоксазолы **18ea**, **18eb**, **18eg**, **18ek**, **18ei** показали активность по отношению ко всем изученным клеточным линиям, при этом гетероцикл

**18ea** оказался наиболее цитотоксичным как для раковых, так и для условно нормальных клеток. Следует отметить, что цитотоксичность его близкого аналога **18eb** в отношении линии клеток аденокарциномы предстательной железы человека LNCaP ( $IC_{50} = 0.301 \mu M$ ) была примерно на порядок выше, чем в отношении условно нормальных клеток линии WI-26 VA4 ( $IC_{50} = 2.26 \mu M$ ) и HUVEC ( $IC_{50} = 5.58 \mu M$ ) и значительно выше, чем у первичных фибробластов ( $IC_{50} > 75 \mu M$ ). Таким образом, соединение **18eb** продемонстрировало значительно лучший токсикологический профиль *in vitro* по сравнению с другими изученными соединениями.

## 6.2. Изучение механизма действия 4-ациламиноизоксазолов **18ba-m**

Для подтверждения взаимодействия соединений **18ea** и **18eb** с сайтом связывания колхицина в димере  $\alpha, \beta$ -тубулина было изучено их влияние на полимеризацию тубулина и белков, ассоциированных с микротрубочками (Tb+MAP). Действие **18ea** и **18eb** на тубулин определялось изменением величины скорости полимеризации тубулина относительно контрольного образца (ДМСО). В целом, полученные результаты подтверждают, что соединения **18ea** и **18eb** действуют как ингибиторы полимеризации тубулина, что является одним из механизмов их цитотоксичности и антипролиферативного действия.

## 6.3. Изучение влияния 4-ациламиноизоксазолов **18ba-m** на клеточный цикл.

В ходе предварительных исследований было показано, что изучаемый класс соединений кроме тубулина взаимодействует с другой мишенью, в ходе чего индуцируется апоптоз. Для выяснения возможных механизмов цитотоксичности полученных веществ, для более активных соединений **18ea, eb, eg, ek** было выполнено исследование их влияния на клеточный цикл и индукцию апоптоза. Полученные цитометрические данные свидетельствуют о том, что обработка клеток LNCaP соединениями **18ea, eb, eg** приводит к существенному увеличению доли популяции аннексин V-FITC-позитивных клеток раннего апоптоза, а также клеток с поздним апоптозом после 24-часовой инкубации. Таким образом, обработка клеток раствором изучаемых соединений приводит к 2–3 кратному увеличению доли апоптических клеток по сравнению с необработанным контролем.

Для установления пути гибели клеток была исследована возможность производных изоксазолов **18ea, eb, eg, ek** вызывать активацию каспаз 3/7. Согласно полученным данным рассмотренные соединения активируют каспазы, что приводит к гибели клетки по типу апоптоза, что также подтверждает результаты цитометрических экспериментов.

Для выяснения влияния 4-ациламиноизоксазолов на клеточный цикл, клетки карциномы толстой кишки HCT116 обрабатывали соединениями **18ea** и **18eb** в концентрациях  $2 \times IC_{50}$  в течение 24 ч. Как показано в табл. 10, после 24 часов не было зарегистрировано значительных изменений в распределении клеточного цикла. При этом после 48 часов наблюдалось значительное увеличение клеток в G2/M-фазе, одновременно с уменьшением доли клеток в S-фазе.

#### 6.4. Инкапсулирование 4-ациламиноизоксазолов в полимерные носители на примере соединения **18ea**<sup>5</sup>

Для соединения **18ea** с целью увеличения растворимости в воде была опробована его иммобилизация полимерным носителем. В качестве полимерного носителя были предложены природные водорастворимые биосовместимые микрогели (наноконтейнеры) на основе натриевой соли альгиновой кислоты, подшитых ионами  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ . Микрогели (Alg)- $\text{Ca}^{2+}$ -Izoxazole (**III**) и (Alg)- $\text{Mg}^{2+}$ -Izoxazole (**IV**), представляют интерес для таргетной доставки лекарств и обеспечивают водорастворимую форму активного вещества. Для оценки противораковой активности иммобилизованного изоксазола **18ea**, а также цитотоксичности самих микрогелей для образцов **I-IV** были проведены биологические испытания с помощью МТТ теста на линии раковых клеток (НСТ116) и условно нормальных клеток (табл. 7).

**Таблица 7.** Цитотоксичность водорастворимых наноконтейнеров, в том числе, содержащих изоксазол **18ea**, по отношению к опухолевым и нормальным клеткам.

Соединение	IC <sub>50</sub> , $\mu\text{M}$	
	НСТ116	Фибробласты человека
<b>18ea</b>	0.18	0.21
<b>(I)</b>	0.1	>50
<b>(II)</b>	3.25	>50
<b>(III)</b>	0.1	0.31
<b>(IV)</b>	0.22	3.42

Из данных таблицы 7 следует, что микрогели **I** и **II** не проявляют токсичности по отношению к здоровым клеткам, но обладают противораковой активностью по отношению к линии клеток НСТ116. Так же было найдено, что изоксазолсодержащие микрогели **III** и **IV** проявляют сходную активность к линиям НСТ116, но при этом являются более токсичными. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что микрогель **IV** имеет лучший токсикологический профиль чем изоксазол **18ea** и микрогель **III**.

Таким образом, получена представительная серия новых 5-метил-4-ациламиноизоксазолов, для которых была изучена противораковая активность. Показано, что для соединений данного структурного типа наряду с тубулином имеется дополнительная неустановленная молекулярная мишень. Найдены активные в субмикромольном диапазоне концентраций производные изоксазола **18ea** и **18eb**, перспективные для дальнейшего изучения, при этом обнаружено, что соединение **18eb** характеризуется хорошим токсикологическим профилем *in vitro*.

#### Заключение и выводы

1. С учетом данных компьютерного моделирования был получен 1,4-фениленди(метилен) бис(5-аминоизоксазол-3-карбоксилат), который оказался эффективным положительным модулятором АМРА рецептора с активностью в субнаномольном диапазоне концентраций и максимумом потенцирования 170% при  $10^{-11}$  М.
2. Разработан хемоселективный метод синтеза 3-EWG-5-амино-4-нитроизоксазолов на основе реакции нитрования 5-аминоизоксазолов под действием нитрата аммония в

<sup>5</sup> Исследования выполнены на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ к.х.н. В.В. Спиридоновым.

трифторуксусном ангидриде без использования защиты аминогруппы. Показано, что 4-нитро-5-аминоизоксазолы представляют интерес для разработки препаратов с антибактериальным действием. Найдено, что метиловый эфир 5-ацетида-4-нитроизоксазол-3-карбоновой кислоты проявляет антибактериальную активность, сопоставимую с известными стандартами.

3. Найден новый реагент гетероциклизации  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных (арил-/гетарил)винилкетонов – *трет*-бутилнитрит в смеси диоксан-вода, с использованием которого разработан препаративный метод синтеза 3-арил-/гетарил-4-нитроизоксазолов, позволяющий получать библиотеки соединений с высокими выходами в граммовых количествах.

4. Разработан синтетический подход к изоксазолсодержащим флуорофорам двух структурных типов: 3-арил/гетарил-4-нитро-5-стирилизоксазолов и BF<sub>2</sub>-комплексов  $\beta$ -дикетонов. Для больших серий новых флуорофоров проведено систематическое изучение фотофизических свойств и найдены основные закономерности зависимости спектральных параметров (квантовый выход, коэффициент экстинкции и др.) от структуры. Показано, что изоксазолсодержащие флуорофоры проявляют сольватохромизм, сенсорные свойства и противораковую активность.

5. Проведен направленный синтез большой серии новых 3-арил-4-ацетида-5-метилизоксазолов в качестве ингибиторов полимеризации белка тубулина. Показано, что производные изоксазола, содержащие триметоксифенильный фрагмент в положении 3 гетероцикла проявляют цитотоксичность по отношению к различным опухолевым клеточным линиям в микромолярном и субмикромолярном диапазоне концентраций. Показано, что соединение-лидер – (3-метил-*N*-(5-метил-3-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазол-4-ил)бензамид) проявляет цитотоксичность по отношению к андроген-чувствительной аденокарциноме простаты человека (линия LNCaP) в концентрации IC<sub>50</sub>=0.301  $\mu$ M и высокую селективность. Продемонстрирована возможность инкапсулирования 5-метил-4-ацетида-5-метилизоксазолов в полисахаридные мицеллы-«наноконтейнеры», что представляет интерес для таргетной доставки лекарственных препаратов и улучшения их токсикологического профиля.

### Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

Публикации в журналах Scopus, Web of Science, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. Vasilenko D.A., **Sadovnikov K.S.**, Sedenkova K.N., Kurova A.V., Grishin Y.K., Kuznetsova T.S., Rybakov V.B., Volkova Y.A., Averina E.B. Synthesis of 4-Nitroisoxazoles via NO/NO<sub>2</sub> Mediated Heterocyclization of Aryl Substituted  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketones // *Synthesis*, **2020**, 52, 1398–1406 (<https://doi.org/10.1055/s-0039-1690053>, IF = 3.157 (WOS, 2020)).
2. **Sadovnikov K.S.**, Vasilenko D.A., Sedenkova K.N., Rybakov V.B., Grishin Y.K., Alferova V.A., Kuznetsova T.S., Averina E.B. Straightforward chemoselective 4-nitration of 5-aminoisoxazole // *Mendeleev Communications*, **2020**, 30, 487–489 (<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.07.027>, IF = 1.786 (WOS, 2020)).
3. Vasilenko D.A., **Sadovnikov K.S.**, Sedenkova K.N., Karlov D.S., Radchenko E.V., Grishin Y.K., Rybakov V.B., Kuznetsova T.S., Zamoyski V.L., Grigoriev V.V., Palyulin V.A., Averina E.B. A Facile Approach to Bis(isoxazoles), Promising Ligands of the AMPA Receptor // *Molecules*, **2021**, 26, 6411 (<https://doi.org/10.3390/molecules26216411>, IF = 4.411 (WOS, 2021)).
4. Vasilenko D.A., Dronov S.E., Parfiryev D.U., **Sadovnikov K.S.**, Sedenkova K.N., Grishin Y.K., Rybakov V.B., Kuznetsova T.S., Averina E.B. 5-Nitroisoxazoles in SNAr reactions: access to polysubstituted isoxazole derivatives // *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2021**, 19, 6447–6454 (<https://doi.org/10.1039/D1OB00816A>) IF = 3.876 (WOS, 2021)).

5. **Sadovnikov K.S.**, Vasilenko D.A., Gracheva Y.A., Zefirov N.A., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Grishin Y.K., Vasilichin V.A., Shtil A.A., Shevtsov P.N., Shevtsova E.F., Kuznetsova T.S., Kuznetsov S.A., Bunev A.S., Zefirova O.N., Milaeva E.R., Averina E.B. Novel substituted 5-methyl-4-acylaminoisoxazoles as antimitotic agents: Evaluation of selectivity to LNCaP cancer cells // *Archiv der Pharmazie*, **2022**, 355, e2100425 (<https://doi.org/10.1002/ardp.202100425>, IF = 4.613 (WOS, 2021)).
6. Spiridonov V.V., **Sadovnikov K.S.**, Vasilenko D.A., Sedenkova K.N., Lukmanova A.R., Markova A.A., Shibaeva A.V., Bolshakova A.V., Karlov S.S., Averina E.B., Yaroslavov A.A. Synthesis and evaluation of the anticancer activity of the water-dispersible complexes of 4-acylaminoisoxazole derivative with biocompatible nanocontainers based on Ca<sup>2+</sup> (Mg<sup>2+</sup>) cross-linked alginate // *Mendeleev Communications*, **2022**, 32, 591–593 (<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.09.007>, IF = 1.837 (WOS, 2021)).

### Другие публикации

#### Тезисы докладов:

1. Василенко Д.А., **Садовников К.С.**, Кузнецова Т.С., Аверина Е.Б. Разработка новых синтетических подходов к функционализированным изоксазолам с потенциальной биологической активностью // Сборник тезисов V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии – Владикавказ, Россия. – 2018. – С. 179
2. **Садовников К.С.**, Тухбатуллина А.Р., Василенко Д.А., Аверина Е.Б. Новые типы флуорофоров на основе 4-нитроизоксазолов // 21 Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Санкт Петербург, Россия. – 2019. – С. 142.
3. Василенко Д.А., **Садовников К.С.**, Тухбатуллина А.Р., Аверина Е.Б. Новая реакция гетероциклизации β-арилзамещенных α,β-ненасыщенных кетонов. Синтез 4-нитроизоксазолов и π-сопряженных систем на их основе с ценными фотофизическими свойствам // Всероссийская конференция «Химия нитросоединений и родственных азот-кислородных систем» – Москва, Россия. – 2019. – С. 102.
4. **Sadovnikov K.S.**, Tukhbatullina A.R., Vasilenko D.A., Averina E.B. Novel π-conjugated systems based on 4-nitroisoxazoles: synthesis and fluorescent properties // The Fifth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» – Moscow, Russia. – 2019. – P. 232.
5. Аверина Е.Б., Василенко Д.А., **Садовников К.С.**, Седенкова К.Н., Осолодкин Д.И., Зефирова О.Н., Палюлин В.А., Милаева Е.Р. Новые методы синтеза и функционализации производных изоксазола. Поиск соединений с различными типами биологической активности // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» – Волгоград, Россия. – 2021. – С 27.
6. **Садовников К.С.**, Василенко Д.А., Зефирова О.Н., Грачева Ю.А., Милаева Е.Р., Бунев А.С., Аверина Е.Б. Дизайн, синтез и противоопухолевая активность новых N-ацилзамещенных 3-арил-4-аминоизоксазолов // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» – Волгоград, Россия. – 2021. – С 348.
7. **Sadovnikov K.S.**, Vasilenko D.A., Averina E.B. Novel isoxazole containing BF<sub>2</sub>-complexes: synthesis and fluorescent properties // The Sixth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» – Moscow, Russia. – 2022. – P. 237.