

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Каретников Георгий Леонидович

**Синтез галогенарлизоксазолов и их функционализация: разработка подходов
к новым тубулин-ингибирующим противоопухолевым агентам**

1.4.3 – Органическая химия

1.4.16 – Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре органической химии Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель

Бондаренко Оксана Борисовна

кандидат химических наук

Официальные оппоненты

Зефирова Ольга Николаевна

доктор химических наук, доцент; ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, профессор.

Семенов Виктор Владимирович

доктор химических наук; ФГБУН «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского Российской Академии Наук», лаборатория медицинской химии, заведующий лабораторией.

Голанцов Никита Евгеньевич

кандидат химических наук; ФГАО ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», факультет физико-математических и естественных наук, кафедра органической химии, доцент.

Защита состоится «8» ноября 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

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

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/594083922/> и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.1/2663>

Автореферат разослан « » октября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



О.А. Малошицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы все больше исследований направлено на поиск противоопухолевых препаратов в связи с актуальностью проблемы опухолевых заболеваний. Только в 2020 году в мире было выявлено более 19 млн онкологических заболеваний, более 10 млн которых привели к летальному исходу. Противоопухолевые препараты классифицируются на три группы в зависимости от кинетики пролиферации клеток. Лекарства первой группы мешают биосинтезу нуклеиновых кислот и транскрипции ДНК и влияют на структуру и функцию ДНК. Вторая группа препаратов влияет на эндокринную систему организма, а третья группа подавляет активность белка. Третья группа противоопухолевых препаратов наиболее распространена в клинической практике из-за их эффективного терапевтического действия и низкой токсичности. Одной из наиболее привлекательных мишеней для этой группы препаратов является белок тубулин, с которым они могут связываться и влиять на динамику микротрубочек – основу цитоскелета клетки. Отдельного упоминания заслуживает Комбретастатин А4 (КА-4), *цис*-стильбеноид, который до сих остается одним из самых мощных ингибиторов полимеризации тубулина. Однако сам Комбретастатин А4 не используется в терапевтической практике, в связи с плохой растворимостью в биологических системах и низким барьером перехода из активной *цис*- в неактивную *транс*-форму. Актуальным направлением является решение конфигурационной проблемы Комбретастатина-А4 посредством фиксации *цис*-формы гетероциклическим фрагментом, в частности, изоксазольным.

Степень разработанности темы. К настоящему времени опубликовано значительное число исследований по синтезу разнообразных аналогов Комбретастатина А4. В литературе также представлены исследования гетероциклических аналогов, которые показывают хорошие результаты в рамках биологических испытаний. На момент начала диссертационной работы, было опубликовано несколько исследований по синтезу аналогов КА-4 ряда изоксазола, однако подходы к их синтезу не обладают общностью, а биологические исследования полнотой SAR-анализа.

Целью исследования является разработка подходов к галогенаризоксазолам – универсальным базовым синтонам, их функционализация фармакофорными фрагментами, дизайн и синтез новых гетероциклических аналогов Комбретастатина А4 ряда диаризоксазолов, а также исследование антипролиферативных свойств полученных соединений.

Задачами исследования были: 1) Оптимизация реакции нитрозирования 2-арил-1,1-дигалогенциклопропанов: региоселективный синтез 3-арил-5-галогенизоксазолов. 2) Разработка региоселективного подхода к несимметричным 3,5-диарилизоксазолам путем комбинации реакций нитрозирования/кросс-сочетания Сузуки. 3) Разработка новой галогенирующей системы на основе $\text{NOHSO}_4/\text{NOSO}_3\text{Cl}$ и тетраметиламмоний галогенидов. 4) Исследование аффинности 3,4-диарилизоксазолов методом молекулярного докинга и выявление наиболее перспективных структур с точки зрения потенциальной биологической активности. 5) Разработка подходов к 3,4-диарилизоксазолам на основе данных компьютерного моделирования. 6) Синтез серий 3,5- и 3,4-диарилизоксазолов с применением разработанных синтетических стратегий. 7) Использование промежуточных 3-арил-4-иодизоксазолов в синтезе гибридных изоксазол-триазолов. 7) Изучение цитотоксичности полученных диарилизоксазолов и гибридных изоксазол-триазолов *in vitro*: выявление наиболее активных соединений. 8) Исследование механизма действия наиболее активных соединений. 9) Исследование противоопухолевой активности наиболее активных соединений *in vivo*.

Объектами исследования являлись 2-арил-1,1-дигалогенциклопропаны, 3-арил-5-галоген- и 3-арил-4,5-дигалогенизоксазолы, 3,5- и 3,4-диарилизоксазолы, гибридные изоксазол-триазолы.

Предметом исследования являлись методы конструирования и функционализации изоксазольного цикла: нитрозирование 2-арил-1,1-дигалогенциклопропанов и [3+2]-циклоприсоединение нитрилоксидов к кратным связям, галогенирование изоксазолов с использованием $\text{NOHSO}_4/\text{Me}_4\text{NHal}$ и $\text{NOSO}_3\text{Cl}/\text{Me}_4\text{NHal}$, использование 5-бром- и 4-иодизоксазолов в синтезе 3,5- и 3,4-диарилизоксазолов, комбинация реакций Соногаширы и азид-алкинового циклоприсоединения в синтезе гибридных изоксазол-триазолов, а также исследование зависимости цитотоксичности полученных соединений от их структуры.

Научная новизна состоит в том, что: 1) разработан высокорегииоселективный двух-стадийный подход к несимметричным 3,5-диарилизоксазолам, исходя из 2-арил-1,1-дибромциклопропанов, на основе комбинации реакций нитрозирования/кросс-сочетания Сузуки; 2) разработана новая препаративная галогенирующая система на основе нитрозирующих реагентов и тетраметиламмоний галогенидов; 3) впервые получены аналоги Комбретастатина А4 ряда 3,4-диарилизоксазола с учетом структурно-ориентированного варьирования заместителя в 5-м положении изоксазольного цикла,

предсказанного методом молекулярного докинга; 4) разработан новый подход к гибридным 4-триазилилизоксазолам. 5) исследована антипролиферативная активность полученных соединений, установлена ее зависимость от структуры, выявлены 2 наиболее активных 3,4-диарилизоксазола, проявляющие более высокую активность *in vivo*, чем КА-4.

Практическая и теоретическая значимость работы: 1) Разработана методология региоселективного двухстадийного синтеза 3,5-диарилизоксазолов. 2) Разработана новая система для галогенирования изоксазолов, пиразолов и других ароматических субстратов донорного характера. 3) Синтезирована панель новых аналогов Комбретастина А4 ряда диарилизоксазолов. 4) Показана возможность синтеза гибридных 4-триазилилизоксазолов. 5) Исследована биологическая активность полученных соединений *in vitro* и *in vivo*: выявлено два перспективных противоопухолевых агента.

Методология диссертационного исследования. Методологическая часть исследования состояла в разработке подходов к синтезу высокозамещенных изоксазолов, в том числе диарил- и триазилилизоксазолов. Для этого был использован широкий спектр синтетических и инструментальных методов. Синтез исходных соединений включал в себя реакции Виттига, циклопропанирования по Макоши, и конденсации карбонильных соединений. Конструирование изоксазольного цикла осуществлялось с использованием реакций нитрозирования, нитрилоксидного синтеза и взаимодействия арилацетоуксусного эфира с гидросиламином. Функционализация изоксазолов проводилась посредством реакций галогенирования (иодирования), кросс-сочетания Сузуки и Соногаширы, азид-алкинового циклоприсоединения и диформетоксилирования. Очистка полученных соединений проводилась методами колоночной хроматографии, перекристаллизации, вакуумной перегонки и экстракции. Структура, состав и чистота полученных соединений определялась методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , масс-спектрометрии высокого разрешения, ГХ-МС, элементного анализа и РСА. Молекулярное моделирование проводилось с использованием программных пакетов AutoDockTools, AutoDockVina и Chem3D.

Положения, выносимые на защиту:

1) Варьирование условий нитрозирования 2-арил-1,1-диброциклопропанов хлорсульфатом нитрозония позволяет региоселективно получать как 3-арил-5-бромизоксазолы, так и 3-арил-4,5-дибромизоксазолы.

- 2) Введение 3-арил-5-бромизоксазолов в реакцию Сузуки открывает возможность комбинаторного синтеза и позволяет эффективно и региоселективно получать несимметричные 3,5-диарилизоксазолы, в том числе, аналоги КА-4.
- 3) Галогенирующая система на основе $\text{NOHSO}_4/\text{NOSO}_3\text{Cl}$ и тетраметиламмоний галогенидов является универсальной для галогенирования изоксазолов, пиразолов и других ароматических субстратов донорного характера.
- 4) Использование различных подходов к формированию изоксазольного цикла, включающих нитрозирование дигалогенциклопропанов, нитрилоксидный синтез и модификацию изоксазолонов, позволяет варьировать заместитель в 5-м положении.
- 5) 3-Арил-4-иодизоксазолы – базовые структуры для синтеза как 3,4-диарилизоксазолов в условиях реакции Сузуки, так и гибридных изоксазол-триазолов путем комбинации реакций Соногаширы и азид-алкинового циклоприсоединения.
- 6) Синтезированные новые аналоги Комбретастина А4 ряда 3,5- и 3,4-диарилизоксазолов обладают высокой биологической активностью *in vitro* и *in vivo* в качестве тубулин-ингибирующих противоопухолевых агентов.

Личный вклад автора. Автором осуществлен сбор и анализ литературных данных по теме исследования. Автор принимал участие в разработке синтетических стратегий составления плана исследований. Автором осуществлен дизайн структур методом молекулярного докинга, синтез целевых соединений, регистрация спектров ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка материалов исследования к публикации в научных изданиях. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад соискателя был основополагающим.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.4.3 – органическая химия, 1.4.16 – медицинская химия.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2019, 2020), Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения» (2019, 2020, 2021, 2022), Международная конференция «Advances in synthesis and catalysis» (2019, 2022), Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений КОСТ (2021).

Структура и объем работы. Работа состоит из шести разделов: введения, обзора литературы на тему «Гетероциклические аналоги Комбретастина А4 – природного цитостатика», обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 184 листах машинописного текста, содержит 95 схем, 18 рисунков, 15 таблиц. Список цитируемой литературы включает 163 наименования.

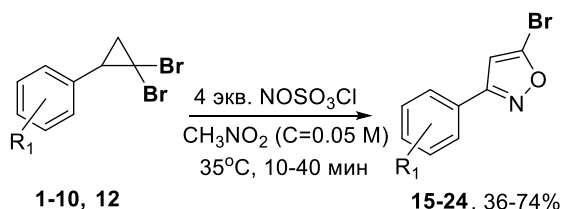
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез 3,5-диарилизоксазолов

Ранее, в нашей научной группе, был разработан подход к синтезу 3-арил-5-галогенизоксазолов нитрозированием *гем*-дигалогенарилциклопропанов с применением различных нитрозирующих реагентов. Галогенизоксазолы, в свою очередь, позволяют модифицировать изоксазольный цикл и расширять класс представителей ди- и тризамещенных изоксазолов, в том числе аналогов Комбретастина А4.

1.1. Нитрозирование 2-арил-1,1-дибромциклопропанов

На начальном этапе работы была поставлена задача оптимизации условий нитроирования 2-арил-1,1-дибромциклопропанов с тем, чтобы добиться селективного получения 3-арил-5-бромизоксазолов и снизить образование побочных ациклических продуктов и 3-арил-4,5-бромизоксазолов - продуктов вторичного превращения, изоксазольного цикла в результате *in situ* окисления бромид-аниона образующегося в ходе реакции. В итоге было установлено, что оптимальными условиями для селективного синтеза 3-арил-5-бромизоксазолов являются четырехкратный избыток хлорсульфата нитрозония по отношению к исходному дибромциклопропану, количество нитрометана соответствующее 0.05 М концентрации циклопропана и температура 35°C (схема 1).



№	R ₁	Выход*, %	№	R ₁	Выход*, %
13	4-F	40	20	2-F	64
15	4-OMe, 3-NO ₂	36	21	2-CF ₃	60
16	H	40	22	3-CF ₃	60
17	2-Cl	54	23	4-CF ₃	50
18	3-Cl	50	24	3-NO ₂	74
19	4-Cl	50			

*Выход, в пересчете на прореагировавшие дибромциклопропаны 1-12

Схема 1.

Также было установлено, что увеличение концентрации циклопропана до 0.2 М при четырехкратном избытке NOSO_3Cl позволяет с высокими выходами и высокой региоселективностью получать соответствующие 3-арил-4,5-дибромизоксазолы (схема 2). В случае циклопропанов **2**, **7**, **10** для полноты конверсии 5-бромизоксазолов **17**, **21**, **24** в соответствующие 4,5-дибромизоксазолы **25**, **27**, **29**, в реакционную смесь, спустя 3 часа после начала реакции, добавляли 1 эквивалент Me_4NBr как дополнительный источник бромид анионов.

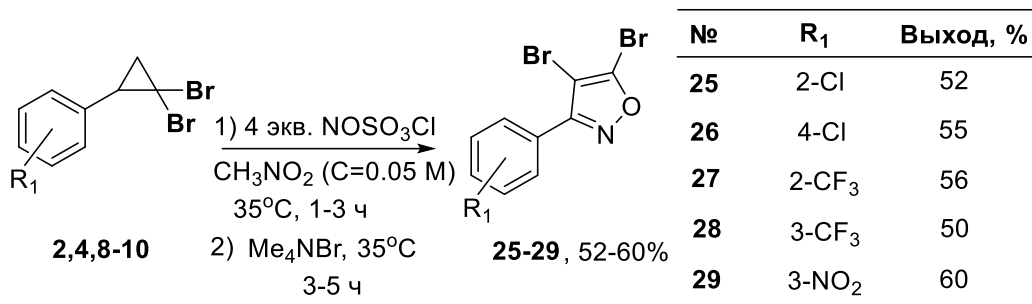


Схема 2.

1.2. Использование 3-арил-5-бромизоксазолов в синтезе несимметричных 3,5-диарилизоксазолов

Галогенизоксазолы являются удобными прекурсорами для функционализации изоксазольного цикла. Используя галогенизоксазолы ($\text{Hal} = \text{Br}, \text{I}$) в реакции Сузуки, можно проводить арилирование гетероцикла. Известно, что одним из существенных недостатков при получении 3,5-диарилизоксазолов несимметричного строения, зачастую, является отсутствие региоселективности, приводящее к образованию смеси двух региоизомерных 3,5-диарилизоксазолов. В связи с этим следующей задачей настоящей работы была разработка условий региоселективного синтеза несимметричных 3,5-диарилизоксазолов, исходя из доступных 2-арил-1,1-дибромциклопропанов, путем комбинации реакций нитрозирования/кросс-сочетания Сузуки. В диссертации подробно рассмотрена оптимизация условий реакции Сузуки с учетом варьирования растворителей, катализатора и основания. В оптимизированных условиях была получена серия несимметричных 3,5-диарилизоксазолов с различными заместителями в бензольных кольцах. Во всех случаях реакция протекала гладко с выходами от умеренных до высоких (схема 3).

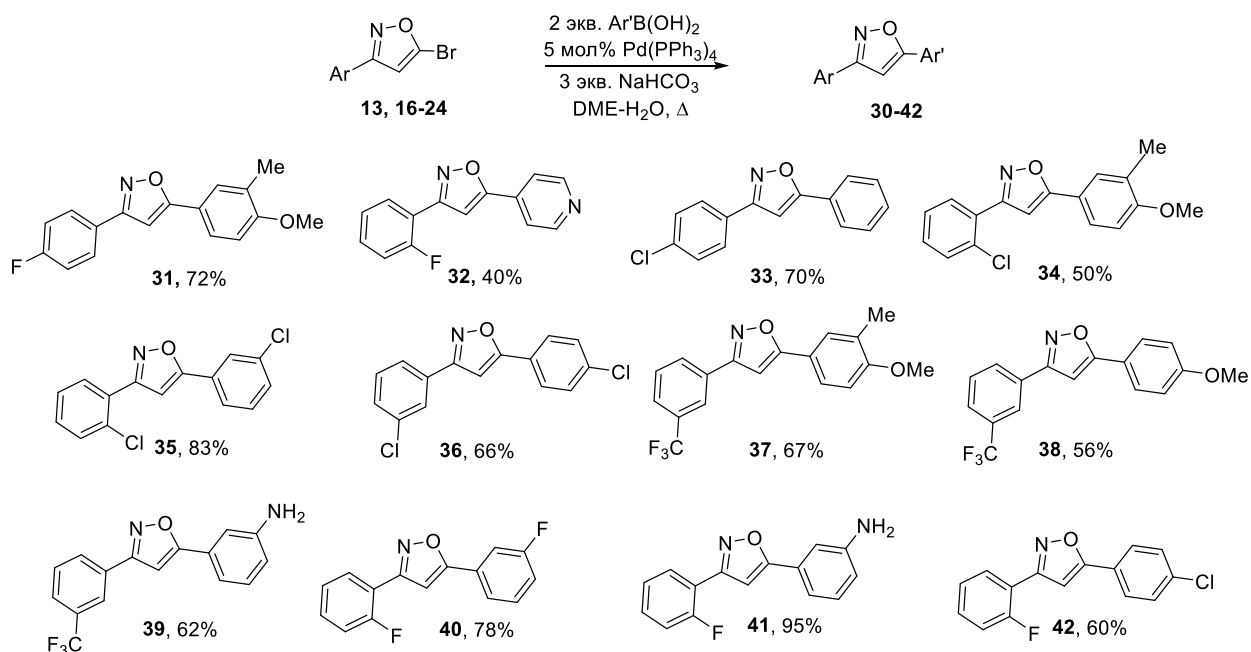
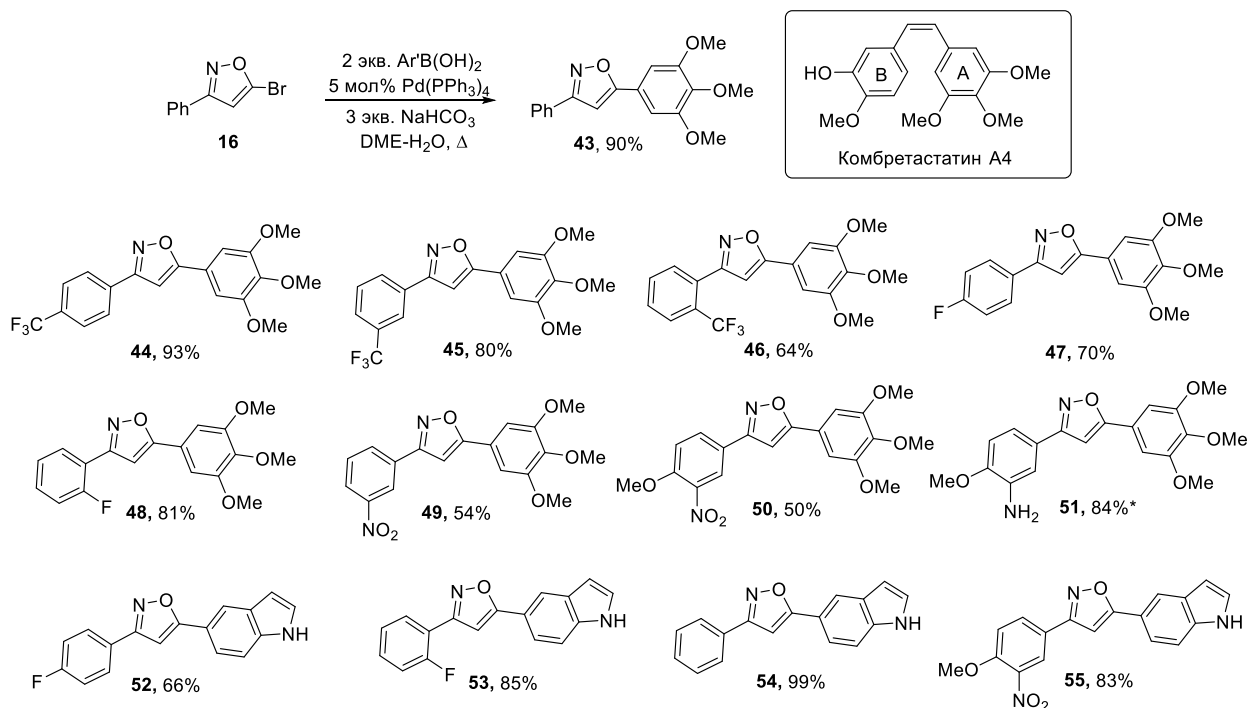


Схема 3.

Разработанная стратегия была использована для синтеза изоксазолов **43-51** (схема 4) — аналогов КА-4, для исследования их цитотоксических свойств. Ключевой фрагмент Комбретастина А-4, 3,4,5-триметоксифенильную группу, вводили в молекулу 3-арил-5-бромизоксазола в оптимизированных условиях реакции Сузуки, используя 3,4,5-триметоксифенилборную кислоту. Кроме того, были получены 5-индолил-замещенные изоксазолы **52-55**, поскольку данный фрагмент также является фармакофорным.



*Изоксазол **51** был получен восстановлением **50** ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in EtOH-H₂O)

Схема 4.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что 3-арил-5-бромизоксазолы являются удобными прекурсорами для получения 3,5-диарилизоксазолов, а предложенный двухстадийный подход позволяет с хорошими выходами и высокой региоселективностью получать 3,5-диарилизоксазолы несимметричного строения, в том числе аналоги КА-4.

2. Новая галогенирующая система $R_4NHal/NOHSO_4$

Одним из способов получения 4-галогенизоксазолов является электрофильное замещение. Показав, что в условиях реакции нитрозирования идет окисление бромид аниона до электрофильного брома и атака последнего по 4-му положению изоксазольного цикла, мы изучили возможность галогенирования изоксазолов в условиях нитрозирования. Оптимизацию реакции начали с бромирования модельного 3,5-дифенилизоксазола **56**. В ходе исследования варьировали источник галогена, нитрозирующие реагенты и растворители. В качестве источников брома были опробованы бромиды калия, аммония и тетраметиламмония.

В качестве окислителя бромид аниона были изучены также тетрафторборат нитрозония ($NOBF_4$) и нитрозилсерная кислота ($NOHSO_4$). Во всех экспериментах были получены хорошие результаты, однако, для дальнейших исследований в качестве предпочтительного окислителя была выбрана нитрозилсерная кислота благодаря ее доступности, дешевизне и относительной стабильности. Результаты приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Оптимизация условий галогенирования 3,5-дифенилизоксазола **56** в присутствии $R_4NHal/NOHSO_4$.

Номер опыта	Источник галогена, экв.	экв.	$NOHSO_4$, экв.	T (°C)	τ (ч)	продукт	галоген	конверсия ^a	Выход (%)
1	Me_4NBr	1.1	1.1	20	1	56a	Br	30	- ^b
8-	Me_4NBr	1.2	3	20	1	56a	Br	100	89
3	NH_4Br	1.2	3	20	3	56a	Br	100	70
4	Me_4NI	1.2	3	20	1	56b	I	100	87
5	NH_4I	1.2	3	20	3	56b	I	100	89
6	I_2	0.6	3	20	2	56b	I	100	82
7	Me_4NCl	1.2	3	20	24	56b	Cl	45	- ^b
8	NH_4Cl	1.5	4	20	24	56b	Cl	20	- ^b
9	Me_4NCl	3.0	3	20	24	56b	Cl	100	87

a) конверсию определяли по данным ЯМР 1H ; б) продукт не выделяли

На серии диарилізоксиазолов с разными заместителями в арильных кольцах в оптимизированных условиях была изучена область применения реакций бромирования, иодирования и хлорирования (схема 5).

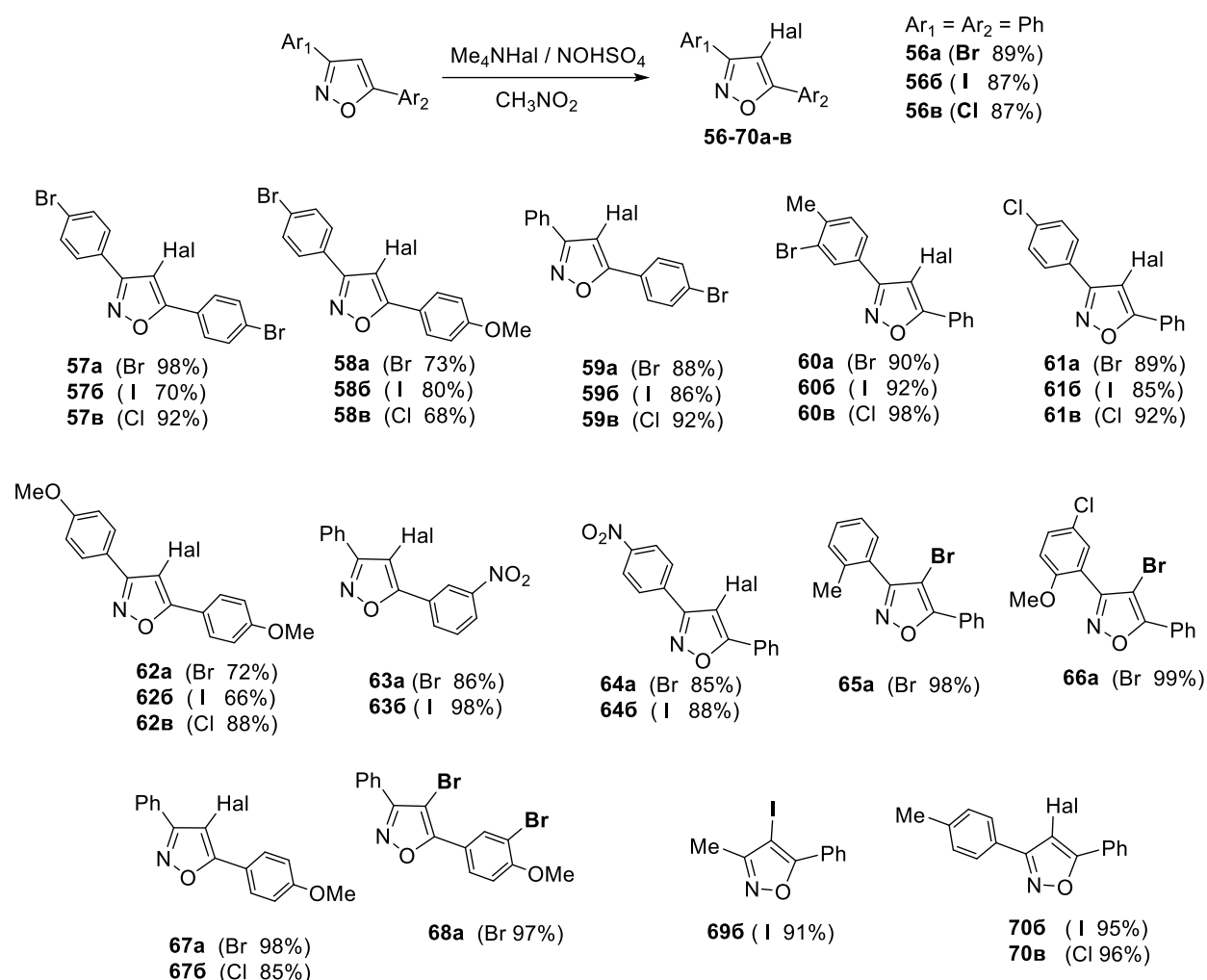


Схема 5.

Результаты по галогенированию изоксиазолов побудили нас к дальнейшему изучению субстратной базы реакции. Ряд пиразолов **72-74** галогенировали в стандартных условиях, получая с одинаково хорошими выходами соответствующие 4-галогенпиразолы **72a**, **73a-б**, **74a-в** (схема б).

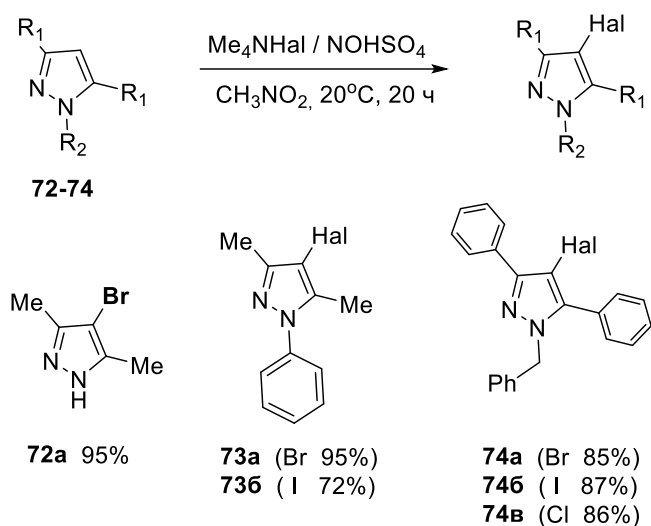


Схема 6.

Кроме того, были исследованы некоторые другие ароматические системы на их способность к галогенированию в найденных условиях реакции. Галогениды **75-82**, изображенные на схеме 7, были получены с хорошими выходами. Однако галогенирование бензолов с электроноакцепторными группами, а именно: нитробензола, бромбензола и 4-нитротолуола, провести не удалось.

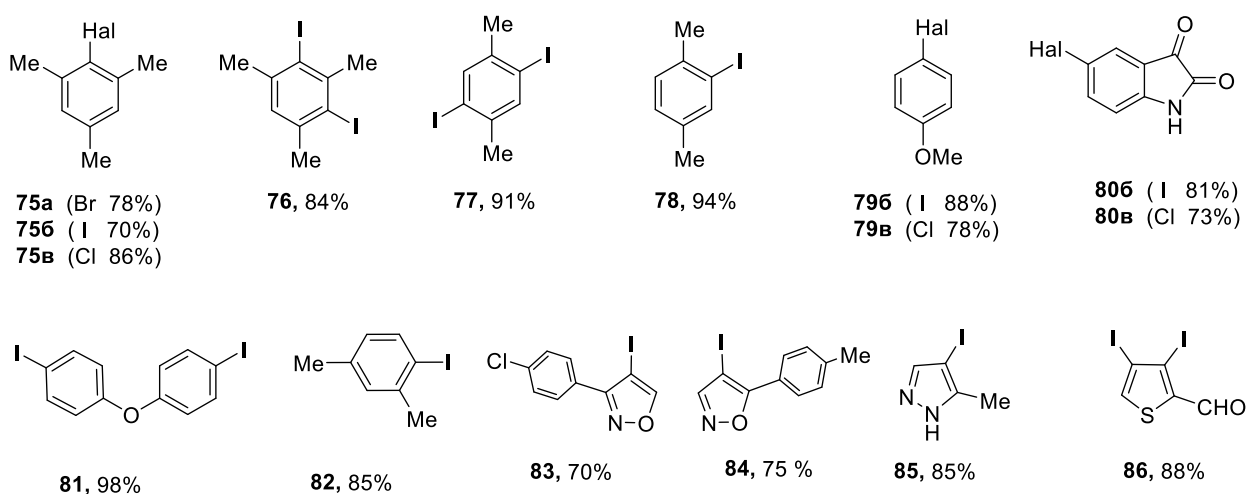
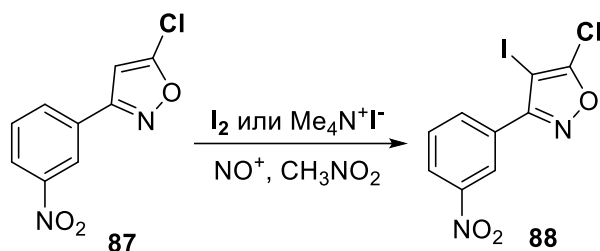


Схема 7.

Кроме того, была исследована возможность галогенирования 3-арил-5-хлоризоксазолов, которые проявляют более акцепторный характер, по сравнению с 3-арил-5-бромизоксазолами. В качестве модельного субстрата для иодирования был выбран 3-(3-нитрофенил)-5-хлоризоксазол **87** (табл. 2).

Таблица 2. Оптимизация условий иодирования 3-арил-5-хлоризоксазола **87**.



№ опыта	Окислительный реагент (3 экв.)	Источник галогена	экв.	Т, °С	Конверсия, %
1	NOHSO ₄	Me ₄ N ⁺ I ⁻	3	25	0
2	NOHSO ₄	I ₂	1.5	25	0
3	NOHSO ₄	I ₂	1.5	50-60	0
4	NOSO ₃ Cl	Me ₄ N ⁺ I ⁻	3	25	0
5	NOSO ₃ Cl	Me ₄ N ⁺ I ⁻	3	50-60	40%
6	NOSO₃Cl	I₂	1.5	50-60	100%*

*Полная конверсия через 5 часов, выход **73%**

Таким образом, реакцию удалось провести с использованием хлорсульфата нитрозония, в качестве окислителя, и иода, в качестве источника галогена при температуре 50-60°С.

На основе полученных данных, можно выделить следующие характеристики разработанной галогенирующей системы:

- 1) Универсальность - возможность бромирования, хлорирования, а также иодирования ароматических субстратов.
- 2) Высокие выходы целевых соединений.
- 3) Доступные реагенты.
- 4) Мягкие условия реакции. Слабокислая среда реакции позволяет расширить область применения разработанной галогенирующей системы, по сравнению с галогенированием *N*-галогенсукцинимидами, где в качестве растворителя используется уксусная или трифторуксусная кислоты. Варьирование условий позволяет получать как моногалоген-так и полигалоген-производные.

В заключение следует отметить, что галогенирующая частица представляет собой комплексный катион, что согласуется с высокой селективностью и мягким характером системы R₄NHal/NOHSO₄. Ключевая роль NO⁺ заключается в содействии образованию галоген-катионов. Это согласуется с тем, что хлорирование протекает труднее

бромирования, а последнее труднее иодирования, что можно объяснить более высоким окислительным потенциалом хлора и брома по сравнению с потенциалом иода.

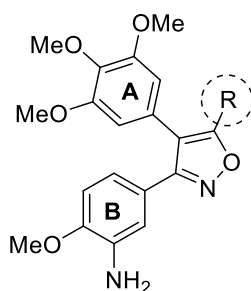
3. Синтез аналогов КА-4 ряда 3,4-диарилизоксазола

3.1. Компьютерное моделирование

Третьим этапом диссертационной работы стала разработка подходов к 3,4-диарилизоксазолам с целью получения более близких к КА-4 аналогов с орто-расположением арильных колец **A** и **B**.

Для предсказания перспективных структур, с точки зрения эффективности связывания с колхициновым сайтом тубулина, было использовано компьютерное моделирование методом молекулярного докинга. Как известно, основные критерии эффективности взаимодействия КА-4 с колхициновом сайтом связывания – это наличие 3,4,5-триметоксифенильного фрагмента и *цис*-конфигурация арильных колец **A** и **B**. Кроме того, к этому моменту нами были уже получены первичные данные о цитотоксичности изоксазолов **43-55** - аналогов КА-4 ряда 3,5-диарилизоксазола, поэтому для проведения молекулярного докинга в качестве заместителей в кольце **B**, были выбраны 4-метокси и 3-амино группы, по аналогии с наиболее активным соединением **51** (раздел 5.1, рис. 1).

Таблица 3. Результаты молекулярного докинга 3,4-диарилизоксазолов с учетом варьирования заместителя в 5-ом положении изоксазольного цикла.



№	R	Аффинность, Ккал/моль	№	R	Аффинность, Ккал/моль
S1	Морфолин	-4.9	S8	CF ₃	-8.0
S2	Ph	-6.1	КА-4	-	-8.1
S3	NMe ₂	-7.1	S9	OCF₂H	-8.1
S4	Br	-7.6	S10	Cl	-8.4
S5	CONH ₂	-7.7	S11	Me	-8.5
S6	COOH	-7.8	S12	H	-8.6
S7	OEt	-8.0	S13	F	-9.1

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что заместитель в 5-м положении изоксазольного цикла, в ряде случаев (табл. 3, номера S10, S11, S13),

увеличивает аффинность к колхициновому сайту связывания, по сравнению с самим КА-4. На основании этих данных, для разработки подходов к синтезу 3,4-диарилизоксазолов, аналогов КА-4, были выбраны структуры, соответствующие номерам S9-S13 (табл. 3).

3.2. Синтез 3,4-диарилизоксазолов

В предыдущих исследованиях нашей научной группы был разработан подход к 5-хлор- и 5-фторизоксазолам. Основываясь на базе синтетических приемов, описанных в разделах 1 и 2, была разработана серия подходов к синтезу 3,4-диарилизоксазолов с учетом варьирования заместителя в 5-м положении. Галогенизоксазолы **15**, **98-105**, **125** получали нитрозированием гем-дигалогенциклопропанов, 5-метилизоксазол **147** синтезировали кросс-сочетанием 5-бромизоксазола **15** с метилборной кислотой, 5-незамещенные изоксазолы **128**, **129**, **132-134** получали в результате [3+2]-циклоприсоединения нитрилоксидов к ТМС-ацетилену с последующим снятием триметилсилильной группы. Дифторметоксиизоксазол **152** получали в результате реакции изоксазолонна с дифторкарбеном, генерируемым из дифторхлорметана в щелочной среде. Все полученные изоксазолы иодировали с использованием разработанной галогенирующей системы (схема 8).

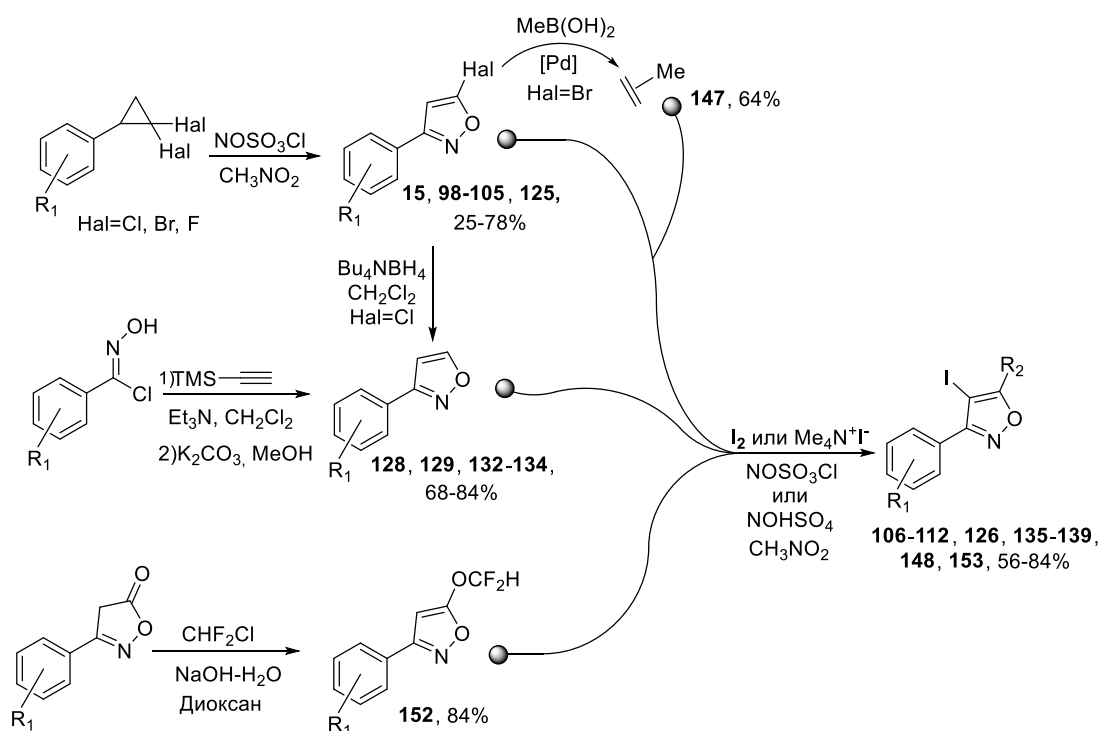


Схема 8.

Дальнейшее введение 4-иодизоксазолов **106-112**, **126**, **135-139**, **148**, **153** в реакцию кросс-сочетания Сузуки с 3,4,5-триметоксифенилборной кислотой позволило получить панель 3,4-диарилизоксазолов – аналогов Комбретастина А4. Изоксазолы с амино группой **121-**

123, 143-145, 150, 155 получали восстановлением соответствующих нитропроизводных под действием $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (схема 9).

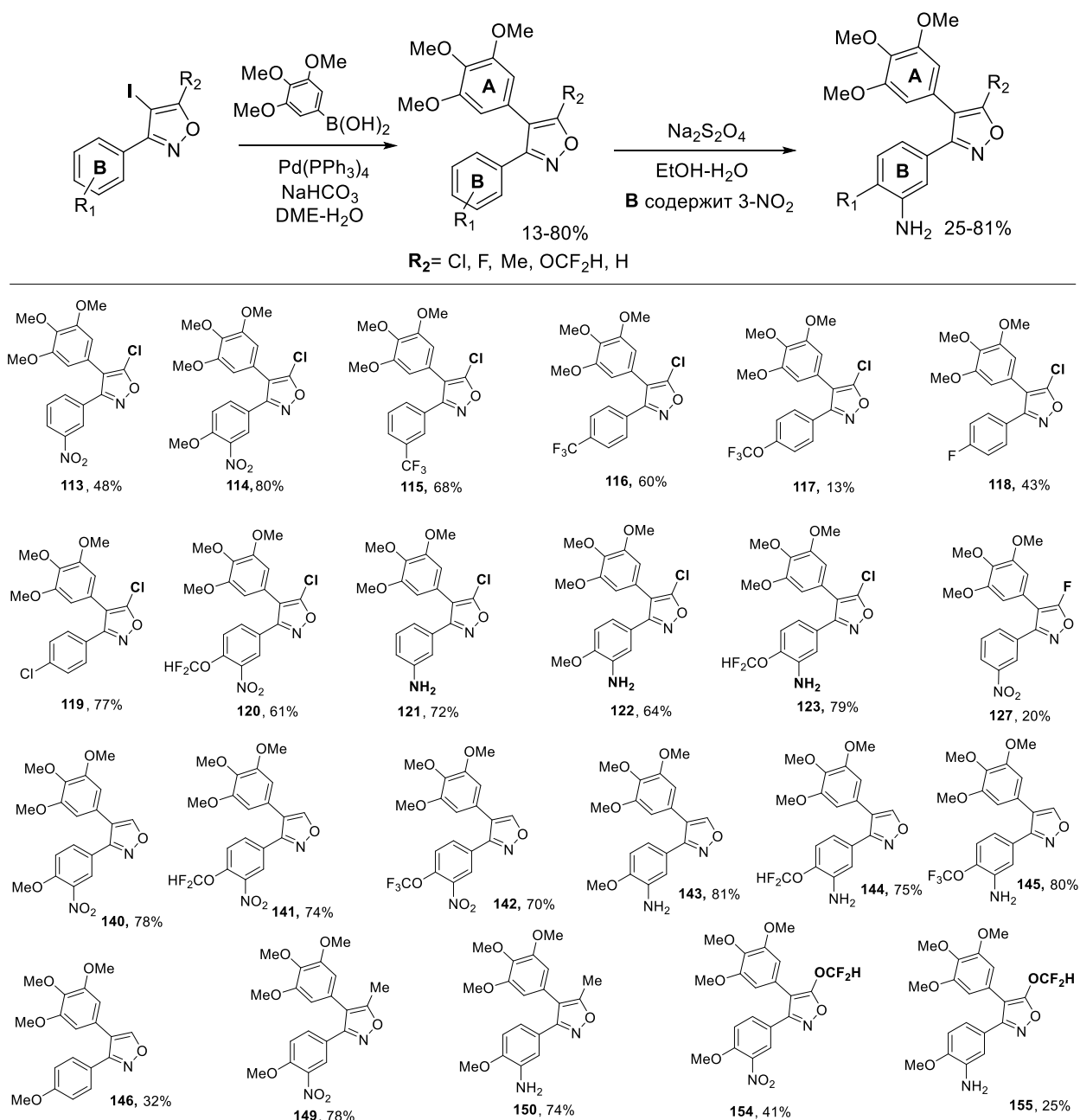


Схема 9.

Таким образом, была получена панель 3,4-диарилизоксазолов – аналогов КА-4, для дальнейшего исследования их биологической активности. Изоксазолы **122, 143, 150** и **155** соответствуют структурам S9-S12, табл. 3, рассчитанным методом молекулярного докинга.

4. Синтез гибридных изоксазол-триазолов

Анализ литературных данных показал, что существует ряд исследований по синтезу гибридных структур, содержащих как изоксазольный, так и триазольный цикл. Более того,

некоторые из них проявляют заметную биологическую активность. Поскольку удлинение фиксированного мостикового фрагмента посредством введения дополнительного гетероцикла, могло повысить цитотоксические и тубулин-ингибирующие свойства аналогов КА-4, было решено разработать стратегию синтеза гибридных 4-триазилилизоксазолов (схема 10).

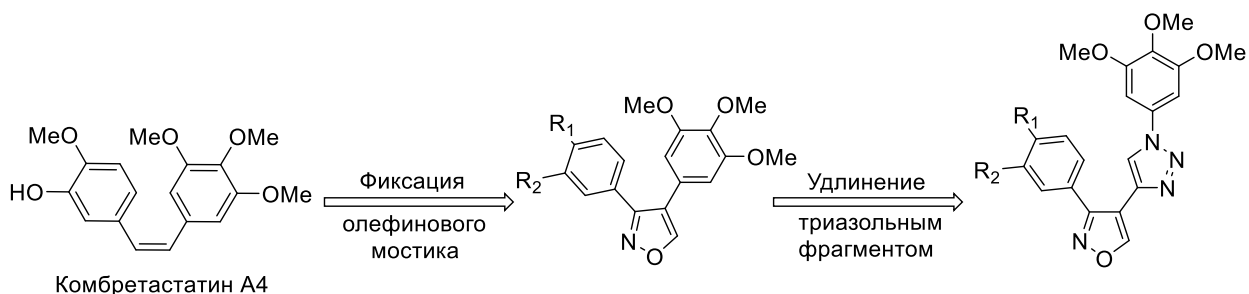


Схема 10.

Заметим, что 3-арил-4-иодизоксазолы, синтез которых был осуществлен в ходе получения 3,4-диариллизоксазолов, оказываются удобными базовым структурами для дальнейшей сборки триазольного фрагмента с использованием реакций кросс-сочетания Соногаширы и CuAAC (схема 11).

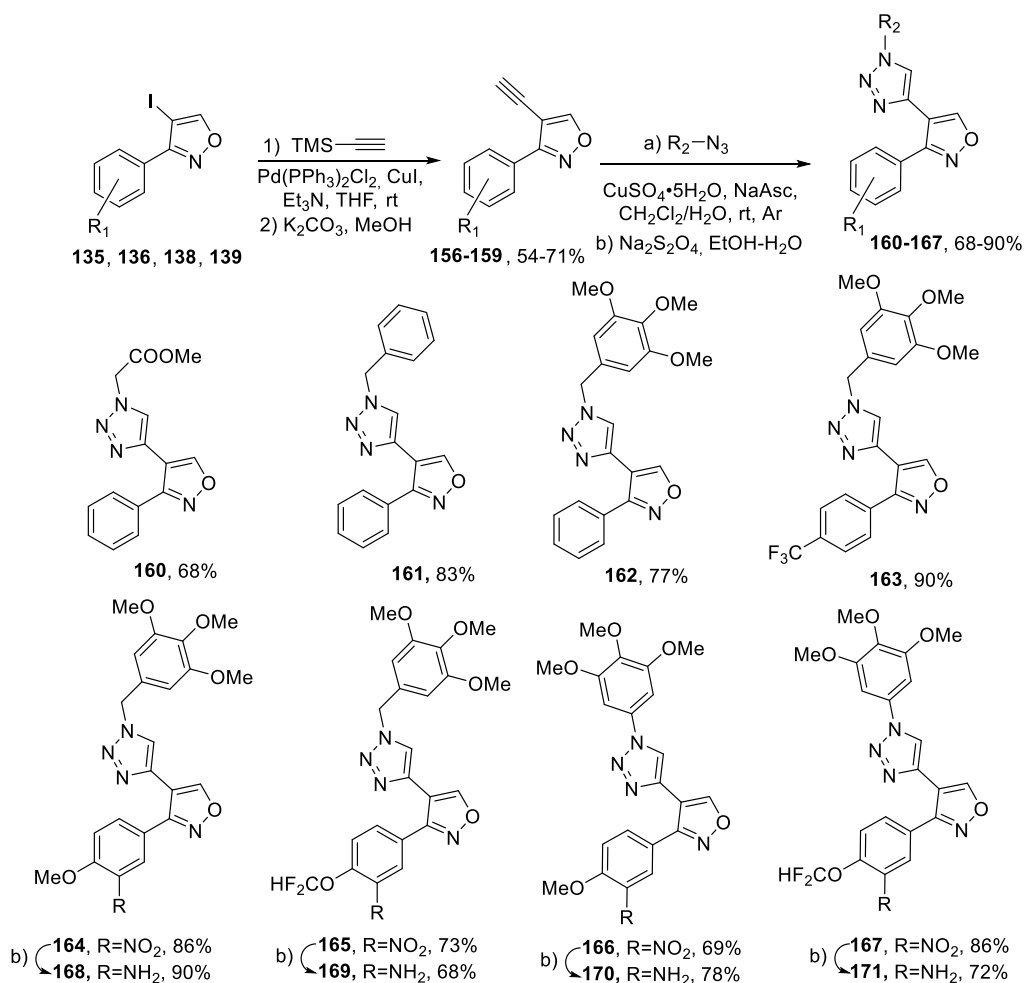


Схема 11.

5. Биологические исследования

5.1. Исследование цитотоксичности изоксазолов *in vitro* методом МТТ на избранных клеточных линиях¹

Оценка цитотоксичности полученных в работе 3,5-диарилизоксазолов **43-55**, 3,4-диарилизоксазолов **113-123**, **127**, **140-146**, **149-150**, **155** и гибридных изоксазол-триазолов **162-171** по отношению к клеточным линиям MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), A-549 (аденокарцинома легкого), HEK-293T (мутированные клетки почек эмбриона человека) и VA-13 (неопухолевые легочные фибробласты) была проведена по стандартному методу МТТ. В результате были получены значения CC_{50} , соответствующие цитотоксической концентрации соединения, снижающей вдвое количество жизнеспособных клеток. В качестве образцов сравнения были выбраны Цисплатин и, непосредственно, Комбретагастин А4.

Среди синтезированных 3,5-диарилизоксазолов **43-55** и триазилизоксазолов **162-171** наиболее активными оказались изоксазол **51** и триазилил-изоксазол **166** (рис. 2), однако, значения их цитотоксичности сильно уступали значениям 3,4-диарилизоксазолов, поэтому дальнейшие биологические исследования с ними не проводились.

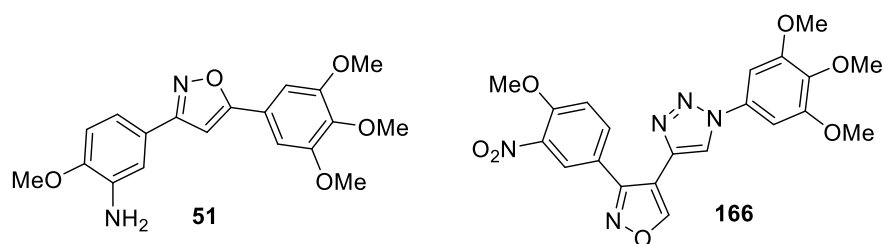


Рис. 1.

Среди исследованных 23 изоксазолов явно выделяются соединения, приведенные в таблице 4, цитотоксичность которых лежит в наномолярном диапазоне. Кроме того, большинство из них проявляют селективность к опухолевым клеткам (индекс селективности рассчитывался, как отношение цитотоксичностей, полученных для клеточных линий аденокарциномы легкого A549 и неопухолевых легочных фибробластов VA-13).

¹Данная часть работы выполнена совместно с сотрудниками кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., с.н.с. Скворцовым Д.А и Васильевой Л.А.

Таблица 4. Значения цитотоксичности и индексы селективности наиболее активных 3,4-диарилизоксазолов

№	R ₁	R ₂	CC ₅₀ (A549), нМ	CC ₅₀ (HEK293T), нМ	CC ₅₀ (MCF-7), нМ	CC ₅₀ (VA13), нМ	SI(VA13/A549)
122	4-OMe, 3-NH₂	Cl	130±1	120±10	40±4	410±70	3.2
123	4-OCF ₂ H, 3-NH ₂	Cl	100±10	90±10	40±10	330±60	3.3
146	4-OMe	H	690±110	330±70	200±30	920±190	1.3
143	4-OMe, 3-NH₂	H	5±1	8±1	9±1	8±1	1.6
144	4-OCF ₂ H, 3-NH ₂	H	550±130	150±30	150±30	650±170	1.2
150	4-OMe, 3-NH ₂	Me	10±2	1.2±1	10±1	20±3	2
155	4-OMe, 3-NH ₂	OCF ₂ H	610±130	250±30	580±80	240±80	0.4
КА-4			2.2±1	2.8±1	5±1	20±10	5.8

SAR-анализ приведен в диссертации. Исходя из полученных значений цитотоксичности, индексов селективности и их соотношения, для дальнейших биологических исследований выбраны 5-хлоризоксазол **122** (с наибольшей селективностью к опухолевым клеткам) и 5-незамещенный изоксазол **143** (с наибольшей цитотоксичностью) (рис. 2).

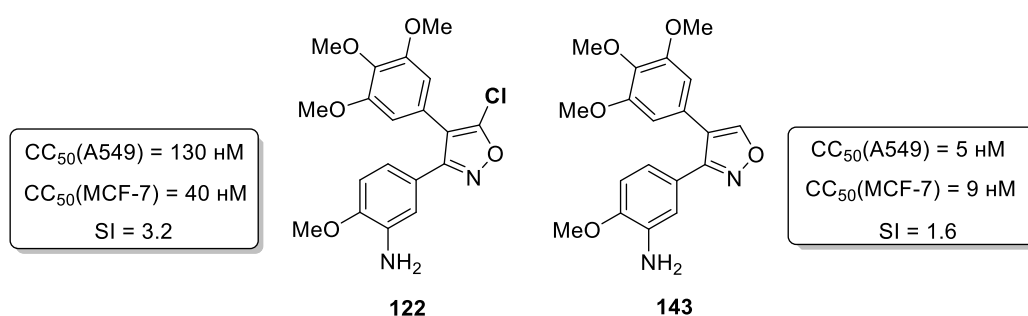


Рис. 2.

5.2. Ингибирование полимеризации тубулина *in vitro*²

Поскольку известно, что механизм действия Комбрегастатина А4 и его производных заключается в ингибировании полимеризации тубулина, мы исследовали динамику микротрубочек *in vitro* путем измерения полимеризации тубулина в клетках с помощью микроскопического исследования цитоскелета. Все четыре наиболее активных изоксазола **122**, **123**, **143** и **150** ингибировали полимеризацию тубулина *in vitro* на уровне, близком к уровню КА-4 (рис. 3).

²Данная часть работы выполнена совместно с сотрудниками кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., с.н.с. Скворцовым Д.А и Васильевой Л.А.

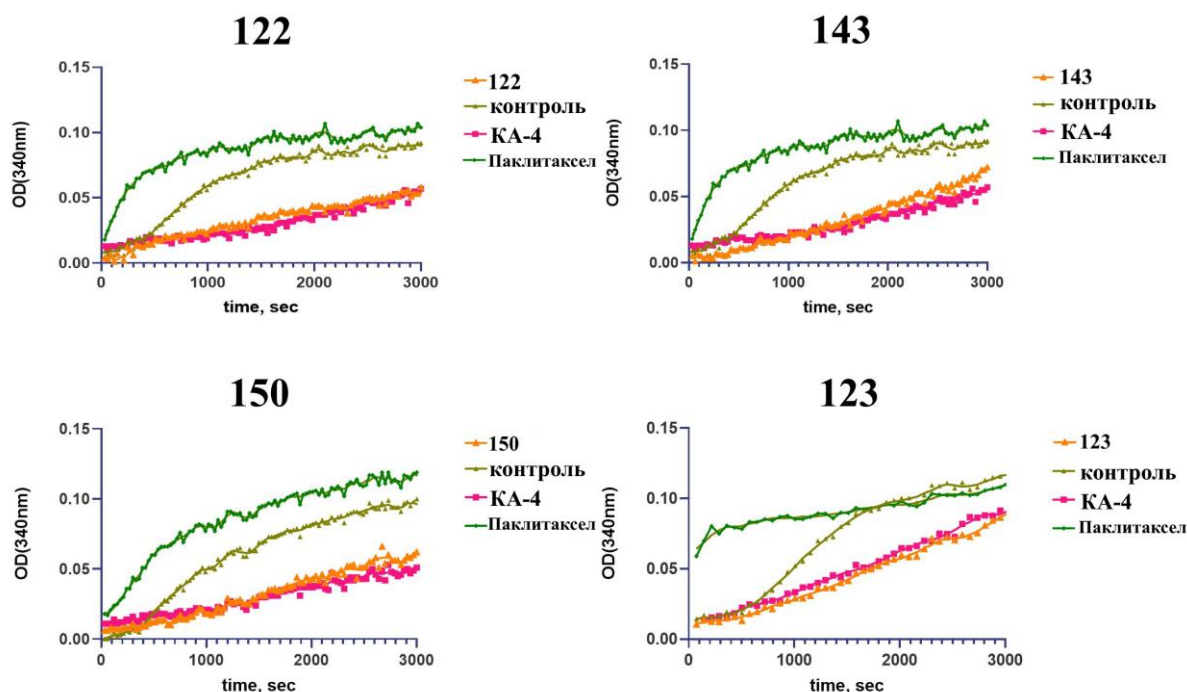


Рис. 3. Полимеризация тубулина *in vitro* в присутствии изоксазолов **122**, **123**, **143** и **150**, Комбретастина А4 и Паклитаксела взятых в концентрации 10 μM . Контроль - полимеризация тубулина в отсутствие тестируемых соединений.

Для изучения механизма действия изоксазолов **122** и **143** клетки А549 обрабатывали их растворами различной концентрации с последующей фиксацией метанолом и иммунофлуоресцентным окрашиванием β -тубулина. Соединение **122** деполимеризует тубулин (рис. 4), при этом отчетливо заметно отсутствие отдельных структурированных волокон микротрубочек (при сравнении с образцов необработанного контроля). Изменения в структуре тубулина аналогичны тем, которые наблюдаются при обработке клеток КА-4 (рис. 4), что указывает на сходный механизм действия.

5.3. Исследования противоопухолевой активности *in vivo* на мышах³

Следующим этапом работы стало исследование противоопухолевой активности изоксазолов **122** и **143** *in vivo*. Полученные аналоги Комбретастина А4 имеют крайне низкую водорастворимость даже в форме гидрохлоридов, что делает невозможным проведения внутривенных инъекций без использования вспомогательных веществ (плюронигов). Перед проведением непосредственно биологических испытаний, была исследована растворимость изоксазолов в композитных растворах с использованием

³Данная часть работы выполнена совместно с сотрудниками ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, д.м.н., Покровским В.С и к.х.н. Бабаевой Г.

одного или нескольких наиболее распространённых плуроников с различными значениями гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). На основе литературных данных для Комбретастин А4-фосфата (КА-4-Ф), в качестве эффективной терапевтической концентрации была выбрана концентрация 2 мг/мл, что соответствует эффективной дозе тестируемых соединений 20 мг/кг. В итоге, в качестве рабочей, была подобрана формуляция, содержащая 10% этанола и 20% Kolliphor EL, которая не оказывала никакого влияния на мышей при многократном внутривенном введении в течении 5 дней и использовалась в качестве контроля.

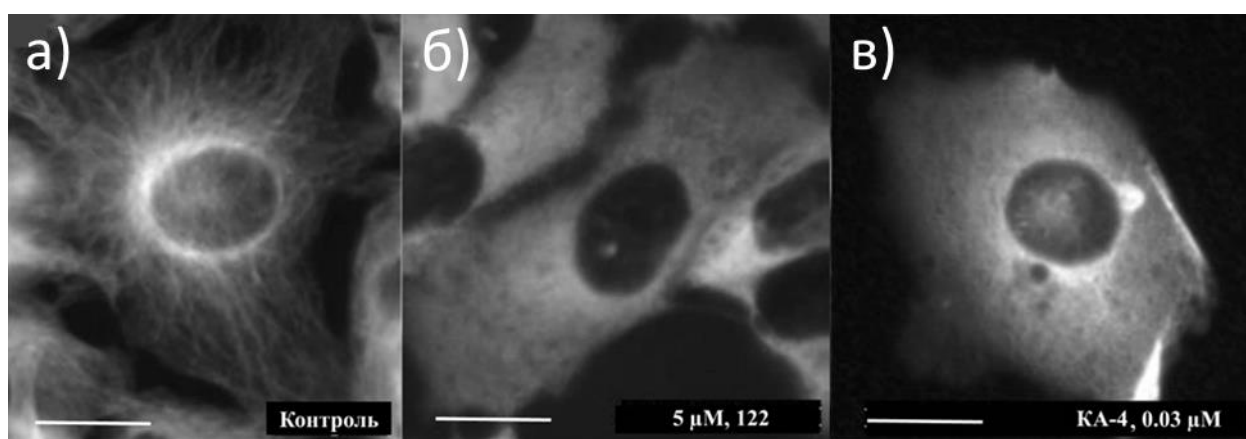


Рис. 4. Изображения иммунофлуоресцентной микроскопии окрашивания тубулина в клетках A549 после 24 часов обработки изоксазолом **122** (б) по сравнению с необработанными клетками (а) и обработкой КА-4 (в), масштабная линейка составляет 10 μM .

Оценка противоопухолевого эффекта на перевиваемых мышинных лейкозах

На первой фазе исследования *in vivo* оба изоксазола **122** и **143** и КА4-Ф были протестированы на перевиваемых мышинных лимфолейкозах (опухолевые модели L1210 и P388, табл. 5). В качестве подопытных использовались иммунокомпетентные мыши DBA/2 в группах по 4 для каждого вводимого соединения. Курс лечения для обеих перевиваемых опухолей составил 5 дней. Оценка противоопухолевого эффекта проводилась по увеличению продолжительности жизни (УПЖ), по сравнению с контрольной группой, которой вводился физ. раствор.

Изучение противоопухолевой активности дозы и режима применения на опухолевых моделях L1210 и P388 показало, что подобранная доза по переносимости соответствовала 20 мг/кг, а УПЖ при этом составило 64.5 и 78.2% для КА-4-Ф, соответственно (табл. 5). Изоксазол **143** проявлял умеренный противоопухолевый эффект,

что соответствует УПЖ 152.6 и 133.0%. Полную ремиссию наблюдали у животных с лейкозами, которые получали изоксазол **122** в течение 5-ти дней.

Таблица 5. Противоопухолевый эффект изоксазолов **122** и **143** и КА-4-Ф при многократном внутривенном введении на опухолевых моделях L1210 и P388.

Модель опухоли	Вводимое вещество	Доза (мг/кг)/ интервал (час) + число введений	СПЖ*, дни	УПЖ, %	Полная ремиссия
L1210	Контроль	-	9.3±0.3	-	-
	122	20/24+5	30.0±0.0	222.5	4/4
	143	20/24+5	23.8±3.2	152.6	1/4
	КА-4-Ф	20/24+5	15.3±0.8	64.5	0/4
P388	Контроль	-	11.5±0.5	-	-
	122	20/24+5	30.0±0.0	222.5	4/4
	143	20/24+5	26.8±2.0	133.0	2/4
	КА-4-Ф	20/24+5	20.5±2.4	78.2	0/4

*СПЖ – средняя продолжительность жизни.

Проявления токсического действия оценивали при сравнении сроков гибели животных и динамики изменения средних масс тела мышей в контрольной и опытных группах. Пятикратное внутривенное введение мышам исследуемых соединений не вызывало более ранней, чем в контрольной группе, гибели животных, а изменения средней массы тела в этих группах были практически сходными с таковыми в контрольной группе.

Оценка полученных данных позволяет сделать вывод о том, что оба изоксазола оказываются более эффективны для терапии мышинового лейкоза, чем КА-4-Ф. Более того, для всех мышей, прошедших терапию изоксазолом **122** наблюдалась полная ремиссия на обеих моделях мышинового лейкоза.

Оценка противоопухолевого эффекта на модели подкожных ксенографтов

Финальной фазой биологических исследований стало изучение противоопухолевой активности изоксазолов **122** и **143** при многократном внутривенном введении иммунодефицитным мышам BALB/c Nude на модели подкожных ксенографтов. Для выбора наиболее оптимальной опухолевой клеточной линии было проведено дополнительное исследование *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека, и выбрана опухоль SW620 (колоректальный рак из метастаз), которая оказалась наиболее чувствительна к действию исследуемых соединений.

Непосредственно исследование *in vivo* проводили в течении 17 дней (рис. 5). Всего было использовано 4 группы по 6 мышей: изоксазолы **122**, **143**, КА-4-Ф и контрольная группа. В контрольной группе в качестве плацебо использовали формуляцию в состав которой входило 20 % Kolliphor, 10 % EtOH (абс.) и 70 % раствора 0.9% натрия хлорида.

В течение всего срока наблюдения проводили оценку роста опухоли. Критерием эффективности исследуемых соединений служил показатель торможения роста опухоли (ТРО, %). Статистическое значение $p < 0.05$ считалось значимым.

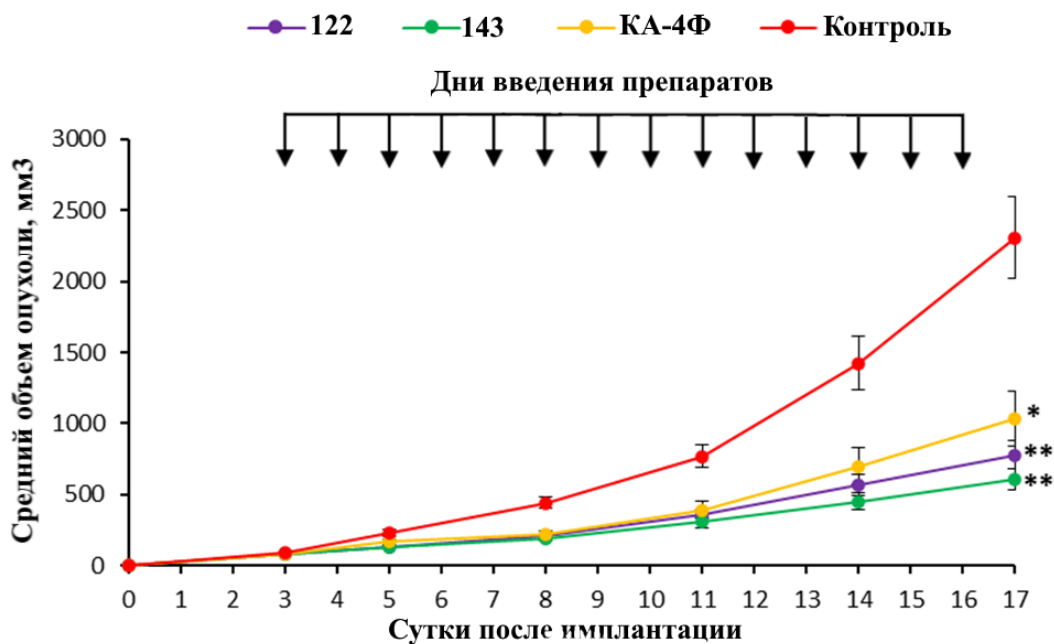


Рис. 5. Динамика размеров опухоли SW620 в течение исследования (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

Лечение **КА-4-фосфатом** не привело к значительному уменьшению объема опухоли ($1031.1 \pm 192.3 \text{ мм}^3$; ТРО 55%; $p = 0.002$ по сравнению с контролем). Терапия с использованием изоксазола **122** показала заметное уменьшение объема опухоли ($780.7 \pm 102.5 \text{ мм}^3$; ТРО 66%; $p < 0,001$) по сравнению с контролем ($2308.0 \pm 291.6 \text{ мм}^3$ (рис. 5)). Изоксазол **143** показал наибольшее снижение роста опухоли на 74% по сравнению с контролем (конечный объем опухоли $607.7 \pm 78.0 \text{ мм}^3$, $p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые соединения обладали противоопухолевым действием (ТРО 55-74%) в выбранных дозах и замедляли рост опухоли со статистически значимыми отличиями от контроля. Кроме того, стоит отметить, что оба изоксазола **122** и **143** оказались в **1.20** и в **1.34** раза эффективнее самого КА-4-Ф (рис. 5).

Заклучение. Основные результаты и выводы

- 1) Оптимизированы условия реакции нитрозирования 2-арил-1,1-дибромциклопропанов хлорсульфатом нитрозония. Осуществлен региоселективный синтез 3-арил-5-бромизоксазолов и 3-арил-4,5-дибромизоксазолов с хорошими выходами. Разработан двухстадийный высокорегиселективный подход к несимметричным 3,5-диарилизоксазолам из 2-арил-1,1-дибромциклопропанов, путем комбинации реакций нитрозирования/кросс-сочетания Сузуки. Получена панель соединений аналогов Комбретастина А4 ряда 3,5-диарилизоксазола.
- 2) Предложена новая универсальная система для галогенирования изоксазолов, пиразолов и других ароматических субстратов донорного характера на основе нитрозилсерной кислоты и тетраметиламмоний галогенидов.
- 3) Разработаны подходы к синтезу 5-замещенных 3,4-диарилизоксазолов, в том числе путем нитрозирования 2-арил-1,1-дигалогенциклопропанов на первой стадии, с последующим иодированием и арилированием (реакция Сузуки) изоксазольного цикла. Региоселективно и с высокими выходами получены 3,4-диарил-5-хлоризоксазолы, 3,4-диарил-5-метилизоксазолы и 3,4-диарил-5-дифторметоксиизоксазолы – аналоги Комбретастина А4.
- 4) Синтезирована серия 4-триазилилизоксазолов посредством азид-алкинового циклоприсоединения 3,4,5-триметоксифенил- и -бензилазидов к тройной связи 4-этинилизоксазолов.
- 5) Исследованы цитотоксические свойства полученных соединений *in vitro* методом МТТ на избранных клеточных линиях. Выявлены два наиболее активных соединения ряда 3,4-диарилизоксазолов, показавшие цитотоксичность к опухолевым клеткам в наномолярном диапазоне и высокую селективность к ним.
- 6) Исследованы противоопухолевые свойства изоксазолов **122** и **143** *in vivo* на двух моделях мышинного лейкоза - L1210 и P388. У мышей, прошедших курс терапии с использованием изоксазола **122**, наблюдалась полная ремиссия для обеих моделей. Исследованы противоопухолевые свойства соединений **122** и **143** *in vivo* на модели подкожных ксенографтов иммунодефицитных мышей BALB/c Nude с использованием подкожной опухоли SW620. Показатели торможения роста опухоли (ТРО) для изоксазолов **122** и **143** составили 66% и 74%, что в **1.20** и **1.34** раза выше, чем у Комбретастин А4-фосфата.

Основные результаты работы изложены в публикациях:

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

- 1) Bondarenko O.B., **Karetnikov G.L.**, Komarov A.I., Pavlov A.I., Nikolaeva S.N. R4NHal/NOHSO4: A Usable System for Halogenation of Isoxazoles, Pyrazoles, and beyond // Journal of Organic Chemistry. — 2021. — Vol. 86, № 1. — P. 322–332. **IF = 4.198 (Web of Science).**
- 2) **Karetnikov G.L.**, Skvortsov D.A., Lopatukhina E. V., Nikolaeva S.N., Bondarenko O.B. Two-stage Regioselective Access to Non-symmetric 3,5-Diarylisoaxazoles: Synthesis of Combretastatin A-4 analogues // Asian Journal of Organic Chemistry. — 2021. — Vol. 10, № 12. — P. 3343–3348. **IF = 3.116 (Web of Science).**
- 3) **Karetnikov G.L.**, Skvortsov D.A., Moseicheva A.A., Zyk N.V., Bondarenko O.B. Synthesis of Hybrid Isoxazole-triazole Compounds as Potential Antiproliferative Agents // Asian Journal of Organic Chemistry. — 2023. — Vol. 12, № 7, — e202300131. **IF = 3.116 (Web of Science).**