

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Новоторцев Владимир Константинович

Синтез спиropyроизводных селеногидантоинов

1.4.3– Органическая химия

1.4.8 – Химия элементоорганических соединений

АВТОРЕФЕРАТ

*Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук*

Москва – 2023

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

Научные руководители

Белоглазкина Елена Кимовна

доктор химических наук, доцент

Кукушкин Максим Евгеньевич

кандидат химических наук

Официальные оппоненты

Аверина Елена Борисовна

доктор химических наук, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова», Химический факультет,
кафедра медицинской химии и тонкого
органического синтеза, профессор

Газиева Галина Анатольевна

доктор химических наук, ФГБУН «Институт
органической химии им. Н. Д. Зелинского
Российской академии наук», лаборатория
азотсодержащих соединений, ведущий научный
сотрудник

Феста Алексей Алексеевич

кандидат химических наук, ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы», факультет физико-
математических и естественных наук, кафедра
органической химии, старший преподаватель

Защита состоится «22» ноября 2023 г. в 12.30 часов на заседании диссертационного совета
МГУ.014.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по
адресу: 119991, Москва, ГСП-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 и на сайте
ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/596478143/> и на портале:
<https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.1/2687>.

Автореферат разослан «__» октября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



О.А. Малошицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности населения в развитых странах, уступая по числу случаев лишь сердечно-сосудистым патологиям. Широко используемым способом терапии раковых заболеваний является химиотерапия или ее комбинация с другими методами лечения.

Производные гидантоина и тиогидантоина, содержащие спиро-сочлененные индолиноновые фрагменты, продемонстрировали значительный цитотоксический эффект в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. На основании имеющихся данных, эта активность может быть связана со способностью диспироимидазолон-оксиндолов влиять на взаимодействие белков p53 (опухолевого супрессора) и MDM2 (его эндогенного ингибитора). При этом наличие в молекуле индолинонового фрагмента принципиально для наличия противоопухолевой активности, связанной с ингибированием MDM2, поскольку индолинон моделирует аминокислоту Trp23 молекулы p53, важную для связывания рассматриваемых белков.

Селенсодержащие органические соединения в настоящее время рассматриваются как перспективные цитотоксические агенты, и некоторые из них проходят клиническое тестирование как противораковые препараты. Органические производные селена также могут повышать эффективность химиотерапии и лучевой терапии. Долгое время Se-содержащие молекулы рассматривались лишь как соединения, защищающие здоровые клетки от окислительного стресса, однако недавние исследования показали, что они являются потенциальными окислительно-восстановительными модуляторами с двойной ролью в окислительном стрессе, и способны действовать как прооксиданты или антиоксиданты, в зависимости от типа селенорганического соединения и вводимой в организм дозы.

На основании этих данных можно ожидать, что сочетание в составе молекулы спиро-сочлененных имидазолонового и индолинонового фрагментов с селеноорганической группировкой может благоприятно сказаться на противоопухолевой активности синтезированных соединений за счет комбинации цитотоксического и анти- или прооксидантного действия. Учитывая это, перспективными представляются синтез и исследование спиро-сочлененных производных 2-халькоген-имидазолонов, содержащих фрагмент C=Se.

Степень разработанности темы. К настоящему времени в литературе достаточно широко представлены данные по синтезу различных производных гидантоинов и тиогидантоинов, а также их спироциклических производных. Однако селенсодержащие

аналоги этих соединений – 2-селеноксо-имидазолы – описаны на единичных примерах, а первые представители спиро-производных селеногидантоинов впервые были получены нашей научной группой. К началу выполнения диссертационной работы в литературе были описаны отдельные представители 5-арилиден- и индолинидензамещенных селеногидантоинов, но не было примеров получения 5-метилен-2-селено-имидазолонов, содержащих экзоциклический $\text{CH}_2=\text{C}$ фрагмент.

Следует отметить, что известные и отработанные методы получения серосодержащих соединений, описанные в литературе, обычно не могут быть напрямую перенесены на синтез их селенсодержащих аналогов из-за проблем, возникающих при синтезе исходных реагентов, и меньшей стабильности селенсодержащих производных по сравнению с серосодержащими.

Целью работы является поиск и разработка синтетических подходов к спиро- и диспиро-производным 2-селеноксо-имидазол-4-онов с использованием реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов, нитрилиминов и азометиниминов к 5-метилензамещенным селеногидантоинам, а также первичное тестирование биологической активности полученных селенсодержащих производных.

Задачами работы являются: (1) разработка методов синтеза 5-метилензамещенных 2-селеногидантоинов; (2) синтез серии диполярфилов ряда 5-арилиден-2-селеногидантоинов и 5-индолиден-2-селеногидантоинов с различными заместителями при атоме N(3); (3) разработка и оптимизация методики получения спиро-производных 2-селеноксо-имидазол-4-онов на основе реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов к 5-метилен-, 5-арилиден- и 5-индолиден-2-селеногидантоинам; (4) исследование возможности проведения и диастереоселективности реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения к 5-метилен-селеногидантоинам азометиниминов и нитрилиминов; (4) изучение цитотоксичности полученных соединений и их анти- и прооксидантных свойств.

Предметом исследования являлись методы диастереоселективного синтеза спиропроизводных 2-селеногидантоинов реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения.

Научная новизна работы состоит в: 1) впервые предложенном методе получения 5-метилензамещенных селеногидантоинов; 2) разработке и оптимизации диастереоселективного синтеза диспироиндолинонов на основе 2-селеногидантоинов, содержащих индолиноновый фрагмент, реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов к 5-метилензамещенным 2-селеноимидазолонам; 3) получении ранее неизвестного структурного типа органических производных - диспиро-индолинон-

пирролидин-селеногидантоинов, с различным положением азота в центральном гетероцикле; 4) установлении диастереоселективности 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиниминов и нитрилиминов к 5-метиленселеногидантоинам; 5) изучении цитотоксичности и анти-/прооксидантных свойств полученных селенсодержащих производных.

Теоретическая и практическая значимость. 1) Впервые разработан метод синтеза 5-метилензамещенных тио- и селеногидантоинов исходя из изотио- и изоселеноцианатов и L-серина; 2) разработан и оптимизирован метод диастереоселективного синтеза диспироиндолинонов на основе 2-селеногидантоинов реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов к 5-метилензамещенным 2-селеноимидазолонам; 3) получены соединения ранее неизвестного структурного типа - диспиро-индолинон-пирролидин-селеногидантоины, с различным положением азота в центральном пирролидиновом гетероцикле; 4) показана возможность регио- и стереоселективного 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиниминов и нитрилиминов к 5-метиленселеногидантоинам, а также изменение диастереоселективности реакции при присоединении азометиниминов к 1-бензилзамещенным 5-метиленселеногидантоинам. 5) установлена цитотоксичность и прооксидантные свойства полученных селенсодержащих производных.

Методология диссертационного исследования. Целевые соединения были получены с использованием реакций конденсации, алкилирования, ацилирования, 1,3-диполярного циклоприсоединения. Очистка полученных соединений проводилась методами колоночной хроматографии, перегонки, перекристаллизации, экстракции. Структура, состав и чистота полученных соединений определялись методами ТСХ, спектроскопии ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, ВЭЖХ-МС.

Положения, выносимые на защиту:

1. 3-Арил-5-метилендиотиогидантоины и 3-арил-5-метиленселеногидантоины можно получить реакциями арилизотиоцианатов или изоселеноцианатов с L-серином в смеси NaOH–H₂O–Py с последующей дегидратацией при комнатной температуре под действием раствора соляной кислоты.

2. Диспиропроизводные 2-селеноксоимидазолидин-4-онов с различным положением атома азота в центральном пирролидиновом кольце спироконденсированной системы (2-селеноксодиспиро[имидазолидин-4 ,3'-пирролидин-2',3"-индолин]-2'',5-дионы и 2-селеноксодиспиро[имидазолидин-4,3'-пирролидин-4',3"-индолин]-2'',5-дионы) могут быть получены диастереоселективным 1,3-диполярным циклоприсоединением

азометинилидов, образующихся из изатина и саркозина или формальдегида и саркозина, к 5-метилен-замещенным 2-селеногидантоинам.

3. Нитрилимины вступают в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с 1-бензил-5-метилен-2-селеногидантоинами по связям C=C и C=Se, образуя спироаддукты, содержащие фрагменты 2-селеногидантоина, пиразолина и селенадиазолина.

4. Азометинимины вступают в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с 5-метилен-2-селеногидантоинами, образуя диастереомерные производные, содержащие спиросочлененные фрагменты 2-селеногидантоина и пиразолидина.

5. Селенсодержащие диспироиндолиноны проявляют цитотоксическую активность, близкую к активности соответствующих кислород- и серосодержащих производных, и являются прооксидантами. Для ряда полученных диспиро-селеногидантон-пирролидин-имидазолонов существенным механизмом их цитотоксического действия является образование активных форм кислорода.

Личный вклад автора. Автором осуществлен сбор и анализ литературных данных по теме исследования. Автор принимал участие в постановке экспериментальных задач, разработке синтетических стратегий, составлении плана исследований. Автором осуществлен синтез целевых соединений, анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка материалов исследования к публикации в научных изданиях и представлении на конференциях. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад соискателя был основополагающим.

Публикации. По материалам работы опубликованы 4 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ для публикации результатов научно-квалификационных работ.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде докладов на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 10-27 ноября 2020), «Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней» (Сочи, Россия, 8-11 октября 2021), «Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней» (Сочи, Россия, 16-21 сентября 2022), Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений «Кост-2021» (Сочи, Россия, 12-16 октября 2021), VI Северо-Кавказская конференция по органической химии (Ставрополь, Россия, 18-21 апреля 2022).

Структура и объем работы. Работа состоит из шести разделов: введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 172 страницах текста и включает 29 рисунков, 156 схем, 17 таблиц и список цитируемой литературы из 165 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1. Синтез исходных селеносодержащих диполярфилов

1.1.1. Синтез 5-арилиденселеногидантоинов

Исходным соединением для синтеза селеносодержащих диполярфилов стал этилизоселеноцианоацетат **4**, полученный по модифицированной литературной методике (Схема 1):

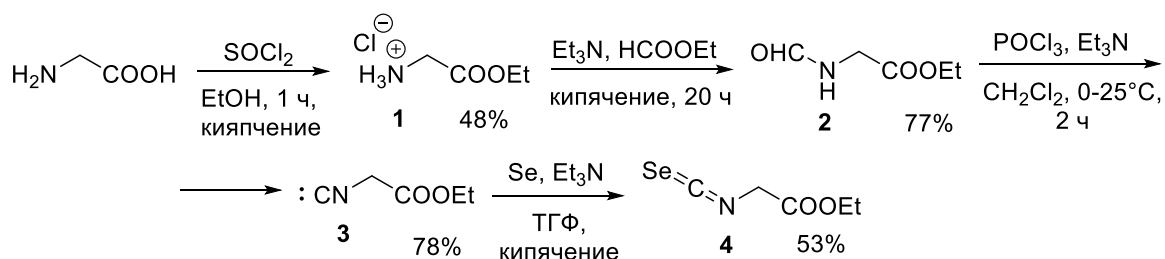


Схема 1

Соединение **4** было далее введено в реакцию с различными первичными алкиламинами и анилинами (Схема 2, Таблица 1) с получением с выходами 23-86% селеномочевин или селеногидантоинов **5-19**, в зависимости от используемого амина:

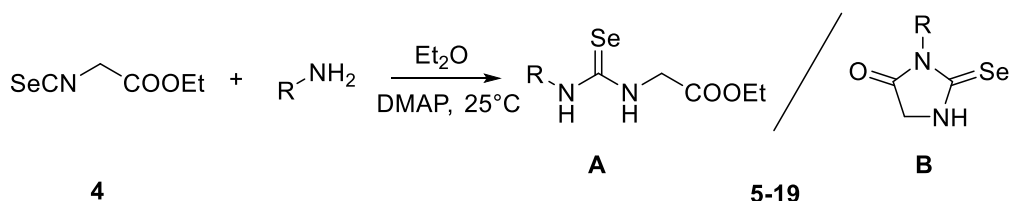


Схема 2

Таблица 1. Соединения, полученные по Схеме 2

Соединение	R	Выход, %	Соединение	R	Выход, %
5	4-EtO-C ₆ H ₄	85(A)	13	Циклопропил	55(A)
6	4-MeO-C ₆ H ₄	86(A)	14	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	23(A)
7	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	52(A)	15	4-Me-C ₆ H ₄	36(A)
8	4-Cl-C ₆ H ₄	65(A)	16	3-Cl-C ₆ H ₄	24(A)
9	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	54(A)	17	Bn	35(B)
10	4-OH-C ₆ H ₄	66(A)	18	3-(N-морфолино)пропил	40(B)
11	4-Br-C ₆ H ₄	42(A)	19	4-MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	56(B)
12	4-I-C ₆ H ₄	39(A)			

Синтез 5-арилиденселеногидантоинов осуществляли конденсацией Кнёвенагеля различных бензальдегидов как карбонильных компонент и селеномочевин или селеногидантоинов как метиленовых компонент. Таким образом были получены 5-арилиденселеногидантоины **20-26** с выходами 43-82% (Схема 3, Таблица 2):

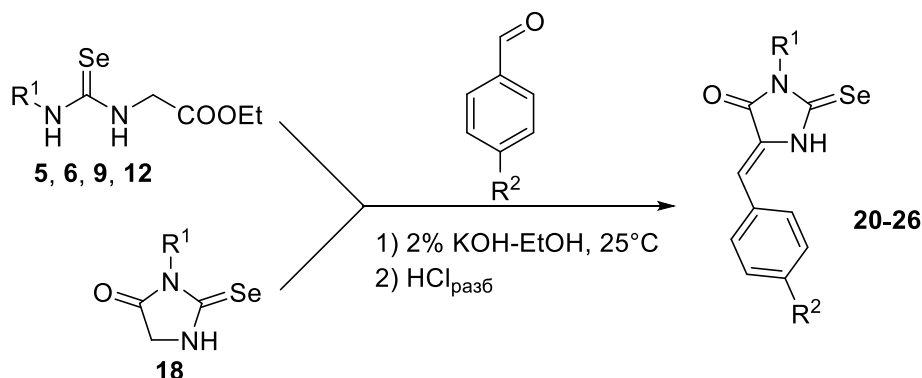


Таблица 2. Соединения, полученные по Схеме 3.

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	Соединение	R ¹	R ²	Выход, %
20	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	82	24	3-(N-морфолино)пропил	Cl	43
21	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	80	25	4-MeO-C ₆ H ₄	MeO	65
22	4-I-C ₆ H ₄	Cl	66	26	4-MeO-C ₆ H ₄	Et	68
23	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	Cl	55				

Все полученные 5-арилиденселеногидантоины были выделены в виде единственных стереоизомеров *Z*-конфигурации, что подтверждается наличием в их спектрах ЯМР ¹H единственного пика, соответствующего винильному протону (при 6.8-6.7 м.д.), а также данными РСА полученных далее из них спироиндолинонов.

1.1.2. Синтез 5-индолинилиденселеногидантоинов

5-Индолинилиденселеногидантоины **27-47** синтезировали конденсацией Кнёвенагеля селеномочевин и селеногидантоинов с различными изатинами, используемыми в качестве карбонильных компонент (Схема 4, Таблица 3). Таким образом были получены соединения **27-47** с выходами 51-91%:

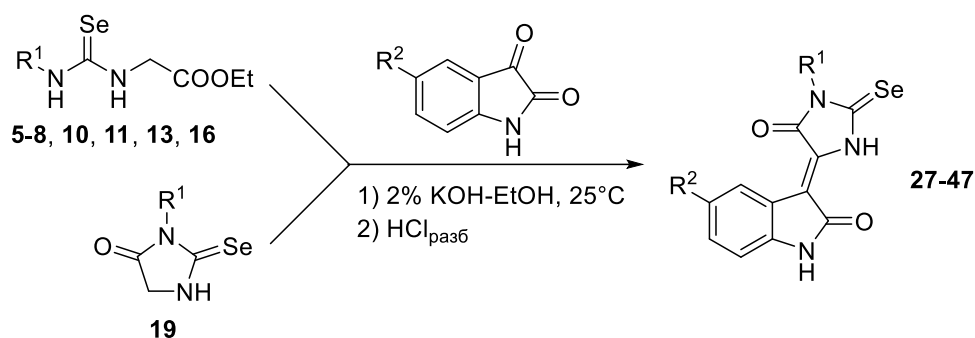


Схема 4.

Таблица 3. Соединения, полученные по Схеме 4.

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	Соединение	R ¹	R ²	Выход, %
27	4-EtO-C ₆ H ₄	Br	79	38	4-Cl-C ₆ H ₄	Br	57
28	4-MeO-C ₆ H ₄	Br	80	39	3-Cl-C ₆ H ₄	H	91
29	4-Br-C ₆ H ₄	Br	73	40	4-EtO-C ₆ H ₄	NO ₂	87
30	Циклопропил	Br	90	41	4-MeO-C ₆ H ₄	NO ₂	85
31	4-Cl-C ₆ H ₄	NO ₂	51	42	4-MeO-C ₆ H ₄	H	90
32	4-EtO-C ₆ H ₄	H	81	43	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	89
33	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	84	44	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	Br	73
34	4-MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	Br	73	45	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	H	70
35	4-MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	H	73	46	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	NO ₂	79
36	4-OH-C ₆ H ₄	Br	82	47	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	Cl	61
37	4-OH-C ₆ H ₄	H	71				

Полученные 5-индолиденселеногидантоины **27-47** содержат один набор сигналов в спектрах ЯМР, что свидетельствует об их образовании в виде единственных геометрических изомеров. Полученным 5-индолинилиденселеногидантоинам была приписана Z-конфигурация на основании имеющихся литературных данных для серных аналогов, а также результатов рентгеноструктурного анализа продуктов последующего циклоприсоединения азометинилидов к соединению **33**.

1.1.3. Синтез 5-метиленселеногидантоинов

Для синтеза 5-метиленселеногидантоинов потребовалось искать альтернативные пути синтеза, отличные от реакций конденсации. Следует отметить, что 5-метиленселеногидантоины, содержащие экзоциклическую $\text{CH}_2=\text{C}$ связь, не были описаны в литературе до начала наших исследований.

В нашей лаборатории был разработан способ получения 5-метилендиогидантоинов, заключающийся в элиминировании морфолина от 5-морфолинометилтиогидантоинов.

Данный метод представляет собой двухстадийный *one-pot* синтез, в котором в качестве исходных реагентов используются β-морфолиноаланин и различные арилизоотиоцианаты. Мы опробовали данный метод для синтеза 5-метиленселеногидантоинов на примере реакции с *n*-толилизоселеноцианатом, однако он не привел к удовлетворительным результатам.

Несмотря на отрицательные результаты при переносе методики синтеза 5-метилендентиогидантоинов на их селеновые аналоги, стратегия с использованием реакций элиминирования для создания экзоциклической двойной связи C=C в уже образованном 2-халькоген-имидазолидиновом фрагменте представлялась перспективной.

Мы предположили, что синтез метилиденселеногидантоинов может оказаться возможным при замене β-морфолиноаланина на другую α-аминокислоту, также содержащую в боковой цепи функциональную группу, способную к элиминированию с образованием двойной связи. В качестве такой аминокислоты был выбран *L*-серин, из которого целевое соединение возможно получить реакцией дегидратации.

Вначале были проведены модельные реакции с производным тиогидантоина для подтверждения принципиальной возможности дегидратации с образованием экзоциклической метилиденной связи в гидантоиновом фрагменте. В качестве модельного соединения был выбран 3-фенил-5-гидроксиметилтиогидантоин. На первой стадии синтеза был получен гидрохлорид этилового эфира серина **48**, которые далее вводился в реакцию с фенилизотиоцианатом при перемешивании в течение трех дней в хлороформе при комнатной температуре (Схема 5). Таким образом удалось получить 3-фенил-5-гидроксиметилтиогидантоин **49** с выходом 53%:

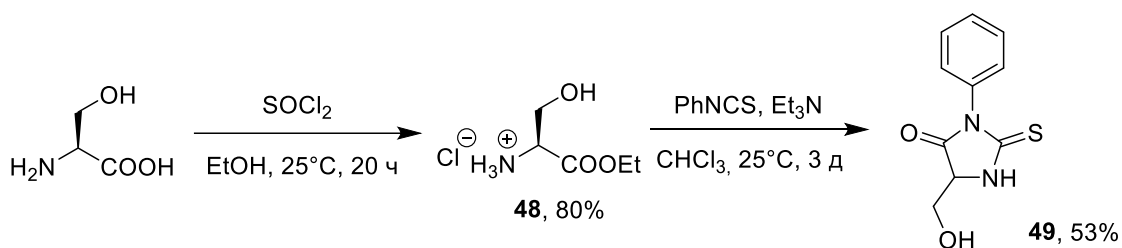


Схема 5

Далее продукт **49** вводили в реакции с различными агентами, которые, согласно литературным данным, могли привести к отщеплению воды из молекулы и образованию экзоциклического CH₂= фрагмента; положительный результат был получен при дегидратации под действием водного раствора HCl при комнатной температуре (Схема 6). Таким образом был получен 3-фенил-5-метилендентиогидантоин с выходом 68%:

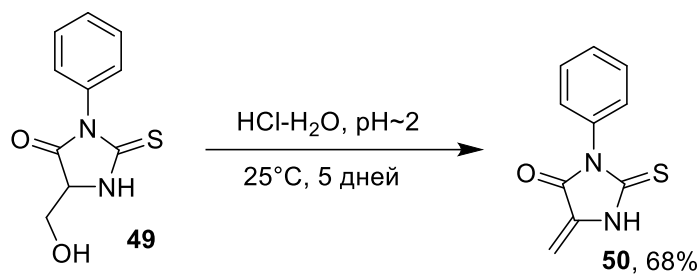


Схема 6

Для доказательства общности предложенного метода синтеза 5-метиленимидазол-4-онов далее из *L*-серина и коммерчески доступных арилизотиоцианатов была получена небольшая серия 3-арил-5-метилендентиогидантоинов **50-54** (Схема 7):

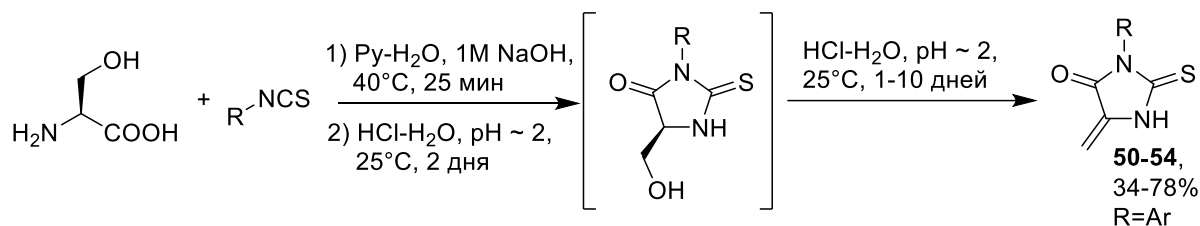


Схема 7

После оптимизации методики с использованием серина для получения 5-метилендентиогидантоинов, она была перенесена на их селеновые аналоги. Адаптацию методики к селеновым производным проводили на примере получения 3-(*n*-толил)-5-метиленселеногидантоина (Схема 8).

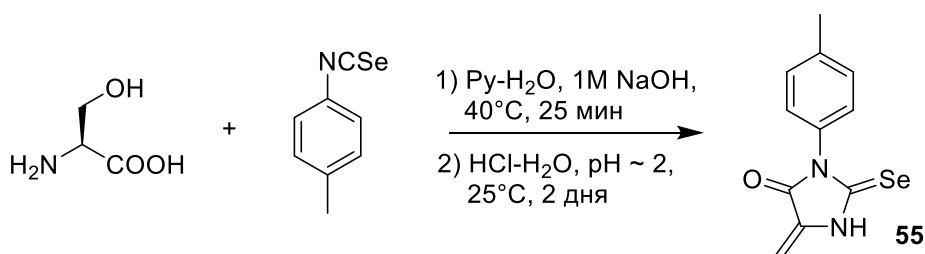


Схема 8

При проведении реакции в условиях реакций с фенилизотиоцианатом выделенный 5-метиленселеногидантоин **55** оказался загрязнен неидентифицированными побочными продуктами; при этом целевое соединение (в отличие от серных аналогов) разлагалось при хроматографировании на силикагеле, и его перекристаллизация из этанола, ацетона и ацетонитрила также протекала с разложением. В ходе оптимизации методики удалось уменьшить содержание побочных продуктов при замене растворителя на систему диоксан-вода (1:1) и используемого основания на триэтиламин, а также при увеличении температуры на второй стадии реакции до 45°C.

По модифицированной методике была получена серия 5-метиленселеногидантоинов, представленных на Схеме 9:

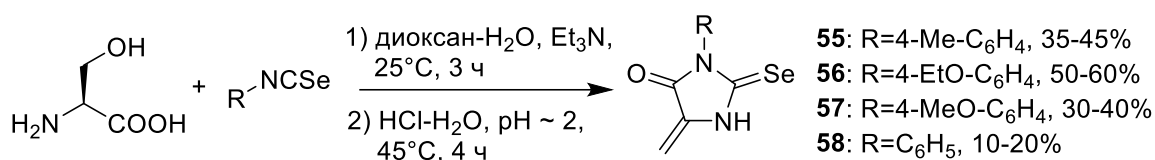


Схема 9

В ходе дальнейших исследований было установлено, что при получении соединений **55-58** целесообразно не проводить их полную очистку, сильно снижающую выход продуктов, а после отделения от основных побочных продуктов вводить полученные метилиденселеногидантоины в реакции циклоприсоединения и проводить финальную очистку получаемых на последующих стадиях синтеза (разделы 1.2 – 1.4) спиропроизводных, которые более устойчивы.

Кром того, мы обнаружили, что выход и стабильность целевых 5-метиленселеногидантоинов можно увеличить при введении заместителя к атому азота в 1-ом положении селеногидантоинового цикла. Так, *L*-*N*-бензилсерин реагировал с фенилизотиоцианатом с образованием стабильного 1-бензил-5-метилен-3-фенилтиогидантоина **60**. Выход целевого продукта составил 95%. По аналогичной методике были получены соединения **60-64** с выходами 39-67% (Схема 10):

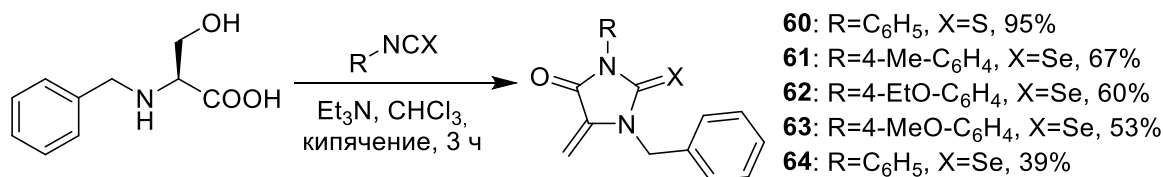


Схема 10

В отличие от незамещенных по первому положению метилиденселеногидантоинов, соединения **61-64** устойчивы на силикагеле, поэтому их можно очищать с помощью колоночной хроматографии.

1.2. Реакции селеногидантоинов с азометинидами

1.2.1. Реакции 5-арилиденселеногидантоинов

Получив серию селенсодержащих диполярфилов с экзоциклическими метилиденовыми, арилиденовыми и индолинилиденовыми группировками, мы перешли к их исследованию в реакциях 1,3-диполярного циклоприсоединения. Вначале в качестве 1,3-диполей были выбраны азометинидамы, которые в ранних работах нашей лаборатории показали хорошие результаты в реакциях с метилиденовыми производными гидантоинов и тиогидантоинов.

В ходе оптимизации условий реакции для селенсодержащих диполярфилов нами была разработана методика проведения реакция 5-арилиденселеногидантоинов,

полученных в разделе 1.1.1, саркозина и различных изатинов, приводящая к получению диспироиндолинонов **65-72** структурного типа **I** с выходами 14-66% (Схема 11, Таблица 4):

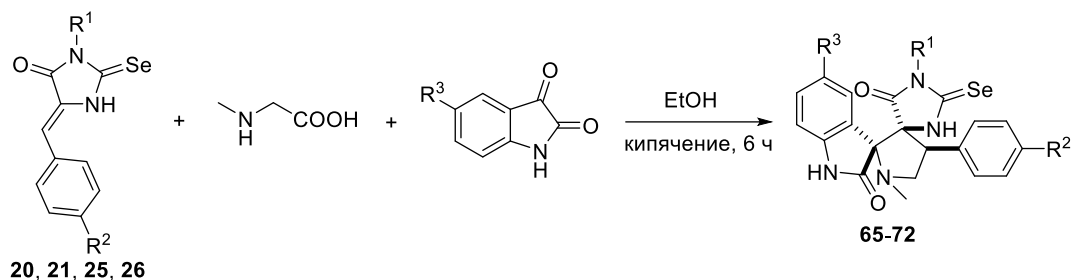


Таблица 4. Соединения, полученные по Схеме 11.

Соединение	R ¹	R ²	R ³	Выход, %	Соединение	R ¹	R ²	R ³	Выход, %
65	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	Br	66	69	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	H	43
66	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	H	55	70	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	Cl	14
67	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	Cl	61	71	4-MeO-C ₆ H ₄	Et	Br	38
68	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	Br	50	72	4-MeO-C ₆ H ₄	MeO	H	15

В структуре конечных продуктов **65-72** присутствуют три стереоцентра, следовательно, потенциально возможно образование восьми стереоизомеров, однако из реакционной смеси выделяется в каждом случае лишь одна пара энантиомеров, относительная стереохимия которых (2`R*,5S*,4`S*) была подтверждена данными рентгеноструктурного анализа, проведенного для соединения **67** (Рис. 1). Такая диастереоселективность, вероятно, является результатом стерических затруднений, препятствующих близкому расположению объемного атома селена и бензольного кольца индолинонового фрагмента в процессе сближения диполя и диполярфила, а также Z-конфигурации исходного диполярфила (Схема 12):

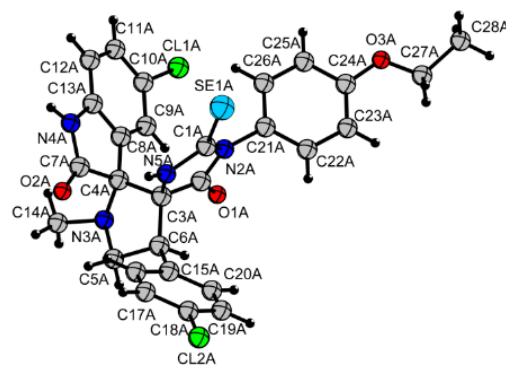


Рисунок 1. Молекулярная структура соединения **67**.

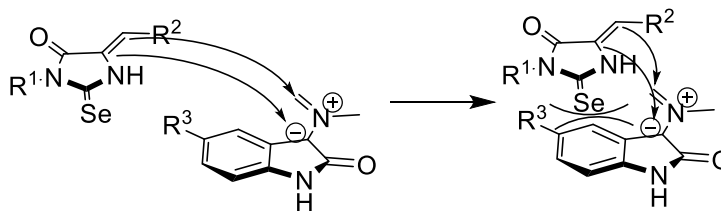


Схема 12

Спиросоединения типа **I** имеют характеристические сигналы в спектрах ЯМР ^1H : три псевдо-триплета с $J \sim 9$ Гц, расположенные в области 4.60-3.40 м.д. и соответствующие трем атомам водорода в центральном пирролидиновом цикле.

1.2.2. Реакции 5-индолинилиденселеногидантоинов

Для получения спироселеногидантоинов, содержащих атом азота в симметричном относительно спиро-сочленений положении центрального пирролидинового цикла, 5-индолинилиденселеногидантоины, полученные в разделе 1.1.2., были введены в реакцию с саркозином и параформом согласно следующей схеме (Схема 13, Таблица 5):

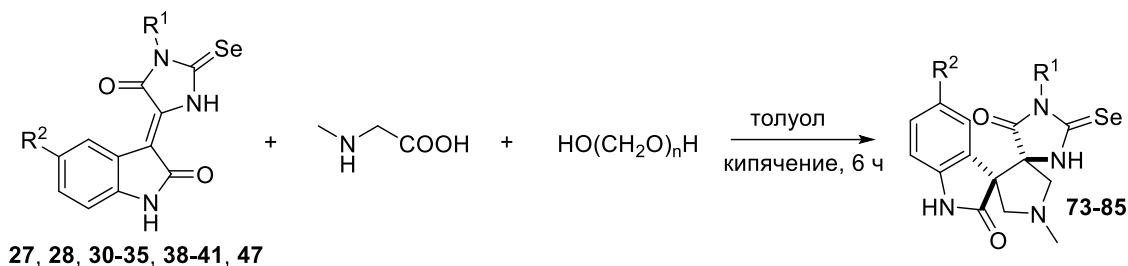


Схема 13.

Таблица 5. Соединения, полученные по Схеме 13.

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	Соединение	R ¹	R ²	Выход, %
73	4-EtO-C ₆ H ₄	Br	46	80	4-Cl-C ₆ H ₄	NO ₂	30
74	4-MeO-C ₆ H ₄	Br	45	81	4-Cl-C ₆ H ₄	Br	23
75	Циклопропил	Br	27	82	3-Cl-C ₆ H ₄	H	43
76	4-MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	H	62	83	4-EtO-C ₆ H ₄	NO ₂	20
77	4-EtO-C ₆ H ₄	H	56	84	4-MeO-C ₆ H ₄	NO ₂	21
78	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	66	85	3-Cl-4-F-C ₆ H ₃	Cl	51
79	4-MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	Br	61				

Таким образом были получены соединения **73-85** структурного типа **II** с выходами 20-66%. В целом, при наличии донорных заместителей в третьем положении гидантоинового фрагмента, а также отсутствии заместителей в индолиноновом фрагменте выходы целевых соединений были наиболее высокими.

Образование продуктов **73-85** так же, как и в случае образования диспироиндолинонов типа **I** (Раздел 1.2.1) протекает с образованием лишь одного возможного диастереомера. Диастереоселективность данных реакций можно

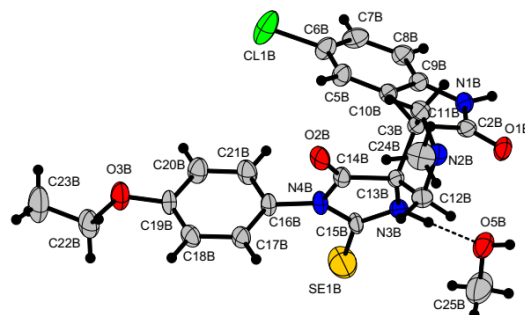


Рисунок 2. Молекулярная структура соединения **78**

объяснить тем, что малый по объему симметричный диполь может подойти либо «сверху», либо «снизу» плоской системы диполярофила, имеющего *Z*-конфигурацию, что в совокупности с синхронностью реакции приводит к образованию единственной пары энантиомеров. Относительная конфигурация стереоцентров (*5R**, *4'R**) была подтверждена данными рентгеноструктурного анализа, проведенного для соединения **78** (Рис. 2).

Для диспироиндолинонов типа **II** является характеристичным участок спектра ЯМР ¹H в области 3.50-2.90 м.д., в которой располагаются четыре дублета с *J*~ 10 Гц, соответствующие атомам водорода в пирролидиновом цикле. Сигналы других диастереомеров в спектрах реакционных смесей не наблюдались.

1.2.3. Реакции 5-метиленселеногидантоинов

Для проведения реакций [3+2]-циклоприсоединения азометинилидов к 5-метиленселеногидантоинам и получения соединений **86-98** структурного типа **III** была использована следующая синтетическая последовательность (Схема 14):

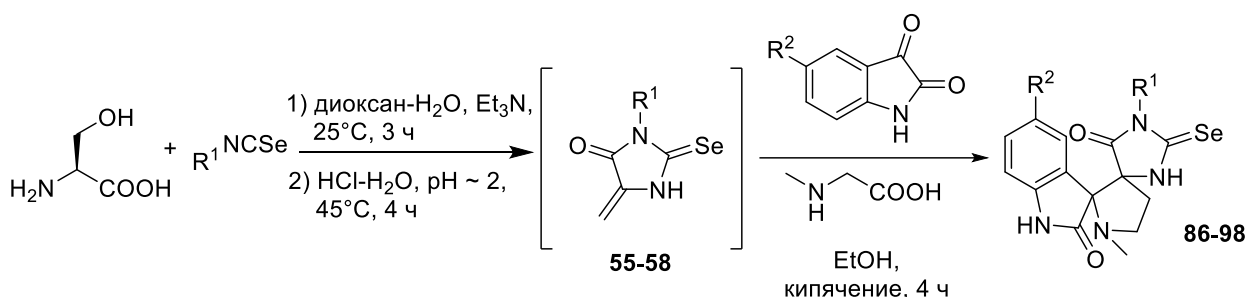


Схема 14

Таблица 6. Соединения, полученные по Схеме 14

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	Соединение	R ¹	R ²	Выход, %
86	4-EtO-C ₆ H ₄	H	30	93	4-Me-C ₆ H ₄	H	19
87	4-EtO-C ₆ H ₄	Br	11	94	4-Me-C ₆ H ₄	Br	10
88	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	13	95	4-Me-C ₆ H ₄	Cl	11
89	4-EtO-C ₆ H ₄	NO ₂	4	96	Ph	H	2
90	4-MeO-C ₆ H ₄	H	6	97	Ph	Br	8
91	4-MeO-C ₆ H ₄	Br	6	98	Ph	Cl	7
92	4-MeO-C ₆ H ₄	Cl	7				

По Схеме 14 были получены соединения **86-98** с выходами 2-30% (Таблица 6). Поскольку 5-метиленселеногидантоины вводились в реакцию в неочищенном виде (см. раздел 1.1.3), выходы конечных продуктов приведены в расчете на две стадии исходя из *L*-серина.

Помимо N(1)-незамещенных метилиденселеногидантоинов в реакции [3+2]-циклоприсоединения были также введены 1-бензил-5-метилиденселеногидантоины **61**, **62** и **64**. Предварительно условия реакций были отработаны на примерах серного и кислородного аналогов соединения **64** (соединения **60** и **99** соответственно). В результате были получены модельные спиросоединения **100** и **101**, а также селенсодержащие спиросоединения **102-106** структурного типа **IV** (Схема 15, Таблица 7):

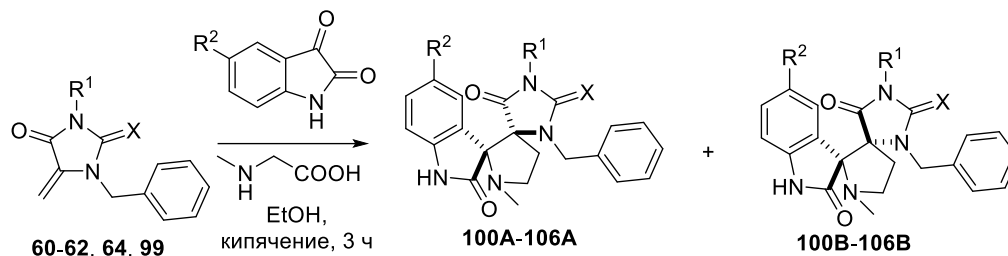


Схема 15.

Таблица 7. Соединения, полученные по Схеме 15.

Соединение	X	R ¹	R ²	Выход (A+B), %	A:B
100	O	Ph	Cl	67	25:1
101	S	Ph	Cl	39	10:1
102	Se	4-Me-C ₆ H ₄	H	40	1:1.2
103	Se	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	86	7:1
104	Se	Ph	H	56	1:1.5
105	Se	Ph	Cl	48	4.5:1
106	Se	Ph	Br	71	4.8:1

В отличие от описанных в предыдущих разделах реакций присоединения азометинилидов к селеногидантоинам, протекающих диастереоселективно, при хроматографическом выделении соединений **100-106** в каждом случае были получены два диастереомерных продукта в соотношениях от 25 : 1 до 1 : 1.5. В большинстве случаев пары диастереомеров были выделены в виде смесей; в случае соединений **103** удалось выделить эти продукты в индивидуальном виде. Оба полученных диастереомера имели сходные наборы сигналов в спектрах ЯМР ¹H, отличающиеся лишь величинами химических сдвигов. Соединения **103A** и **103B** были исследованы

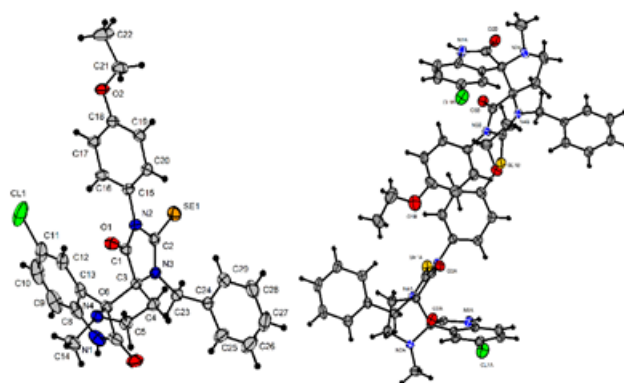


Рисунок 3. Молекулярная структура соединения **103-A** (слева) и **103-B** (справа).

посредством рентгеноструктурного анализа (Рис.3), результаты которого показали, что помимо изомеров **A** с относительной конфигурацией стереоцентров в пирролидиновом фрагменте $2^*R^*,5^*S^*$, аналогичных соединениям типа **III** (раздел 1.2.3.), в реакциях с N-бензилированными метилиденселеногидантоинами образуются также изомеры **B** с относительной конфигурацией $2^*R^*,5R^*$, причем в случае получения соединений **102** и **104** изомер **B** являлся основным. Снижение диастереоселективности в данном случае по сравнению с получением соединений типа **III** можно объяснить стерическими затруднениями, которые создает объемная бензильная группа, расположенная вблизи реакционного центра диполярофила, из-за чего реакция циклоприсоединения, вероятно, становится асинхронной.

Наименьшее количество минорного изомера **B** образовывалось в случае соединения **100**, являющегося производным гидантоина. Соотношение диастереомеров **A:B** в этом случае составляло 25:1. В случае его серного аналога **101** соотношение **A:B** составляло 10:1. В случае же спиропроизводного селеногидантоина **105** соотношение **A:B** составляло примерно 4.5:1, что свидетельствует о снижении диастереоселективности при увеличении размера атома халькогена в имидазолоновом фрагменте диполярофила. Также была выявлена зависимость между соотношением диастереомеров **A** и **B** и заместителем в пятом положении изатина, вводимого в реакцию. Так, при использовании незамещенного изатина в случае получения соединения **104** соотношение **A:B** составляло примерно 1:1.5, в то время как для 5-хлор- и 5-бромизатинов в случаях получения соединений **105** и **106** соотношение менялось на $\sim 4.5:1$.

Характеристичные сигналы бензильных атомов водорода в спектрах ЯМР 1H , представленных двумя дублетами, у изомеров **B** смещены в более слабое поле (~ 6.20 и 5.70 м.д.) по сравнению с аналогичными сигналами изомеров **A** (~ 5.80 и 5.25 м.д.). Сигналы пирролидиновых атомов водорода изомеров **A**, как правило, представлены двумя мультиплетами в районе 3.25 и 2.45 м.д. Сигналы же соответствующих атомов водорода изомеров **B** представлены одним мультиплетом в районе 3.25 м.д. и двумя мультиплетами, находящимися в районе 2.95 и 2.00 м.д.

Таким образом, 5-метилиденселеногидантоины вступают во взаимодействие с азометинидами аналогично 5-арилиден- и 5-индолинилиденселеногидантоинам с сохранением диастереоселективности, однако выходы конечных продуктов ниже из-за меньшей стабильности исходных диполярофилов в условиях реакции. С другой стороны, 1-бензил-5-метилиденселеногидантоины более стабильны в условиях реакции и эффективно вступают во взаимодействие с азометинидами с более высокими выходами конечных продуктов. Однако в этом случае, по-видимому, из-за стерических затруднений

при сближении диполя и диполярофила снижается диастереоселективность реакций, что приводит к образованию смесей диастереомерных продуктов с различной конфигурацией стереоцентра, принадлежащего селеногидантоиновому циклу.

1.3. Реакции 5-метиленселеногидантоинов с другими 1,3-диполями

В рамках работы были также изучены реакции присоединения к 5-метиленселеногидантоинам других типов 1,3-диполей - нитрилиминов и азометиниминов (Рис. 4).

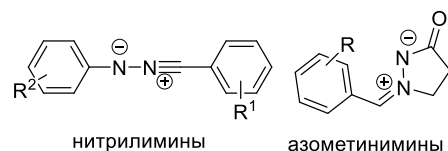


Рисунок 4. Используемые в работе нитрилимины и азометинимины.

1.3.1. Реакции 5-метиленселеногидантоинов с нитрилиминами

1-Бензил-5-метиленселеногидантоины **62** и **64** успешно были введены в реакции с нитрилиминами с образованием соединений типа **V**, являющимися продуктами присоединения диполя по экзоциклической связи C=C. Таким образом были получены соединения **111-114** (Схема 16, Таблица 8).

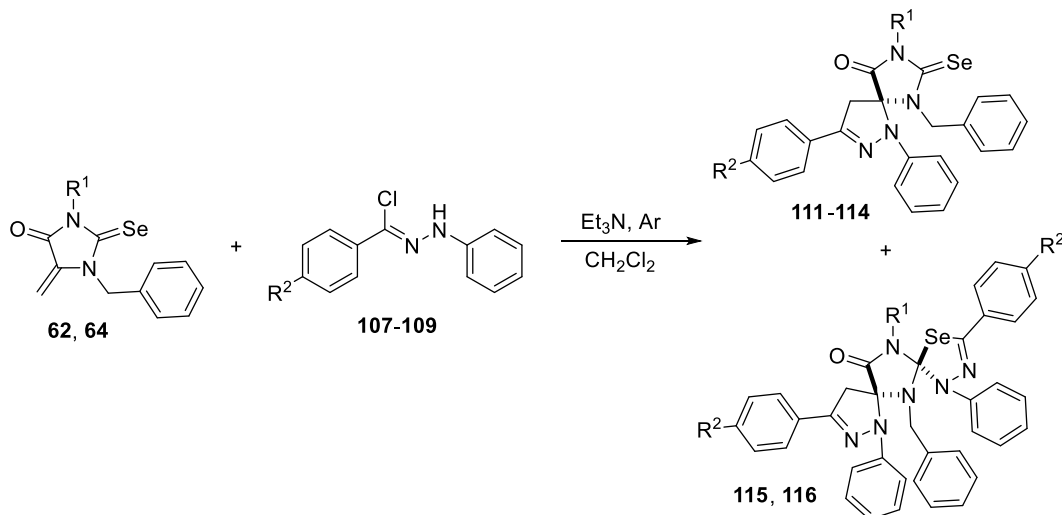


Схема 16.

Таблица 8. Соединения, полученные по Схеме 16.

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	
			присоединение по C=C	присоединение по C=C и C=Se
111	4-EtO-C ₆ H ₄	Cl	60	
112	Ph	Cl	35	
115				36
113	Ph	MeO	40	
116				20
114	Ph	NO ₂	16	

При анализе спектров ЯМР ^1H реакционных смесей и продуктов было установлено, что помимо основных продуктов присоединения нитрилиминов по связи $\text{C}=\text{C}$ **111-114** в реакционных смесях также присутствуют продукты присоединения двух молекул диполя по обоим экзоциклическим связям $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{Se}$ – соединения **115** и **116**, относящиеся к структурному типу **VI**.

Характеристичным участком спектра ЯМР ^1H для соединений типа **V** является область 6.0-3.0 м.д., в которой располагаются два дублета с КССВ ~ 14 Гц, соответствующие бензильным атомам водорода, а также два дублета с КССВ ~ 17 Гц, соответствующие атомам водорода пиразолинового цикла. Для соединений типа **VI** характеристичным участком спектра ЯМР ^1H является область более сильного поля 4.0-2.8 м.д., в которой располагаются четыре дублета с примерно теми же КССВ, что и в случае соединений типа **V**, и соответствующие тем же атомам водорода.

Региоселективность присоединения нитрилиминов к связи $\text{C}=\text{C}$ была однозначно подтверждена при рентгеноструктурном исследовании соединения **111** (Рис. 5). Терминальный атом азота фрагмента $\text{C}-\text{N}-\text{N}$ в нитрилиминах присоединяется к атому углерода в пятом положении селеногидантоинового цикла, а атом углерода фрагмента $\text{C}-\text{N}-\text{N}$ – к концевому атому углерода экзоциклической группы $=\text{CH}_2$.

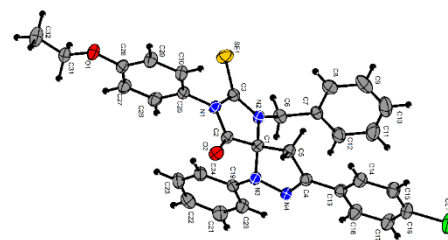


Рисунок 5. Молекулярная структура соединения **111**.

Для подтверждения возможности последовательного присоединения различных диполей по связям $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{Se}$ в условиях реакций с нитрилиминами выделенное соединение **111** было введено во взаимодействие с диполем **110**, в результате чего было получено соединение **117** структурного типа **VI** с выходом 83% (Схема 17).

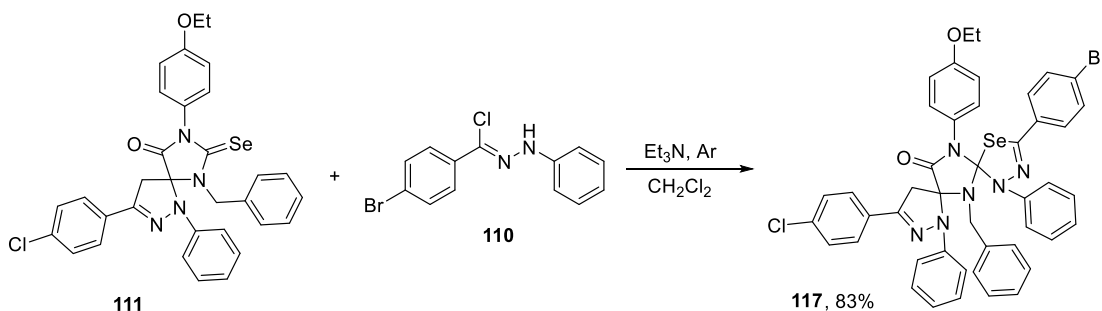


Схема 17

Таким образом, было определено, что нитрилимины способны эффективно присоединяться по обоим экзоциклическим связям $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{Se}$ метилиденселеногидантоинов, при этом присоединение по связи $\text{C}=\text{C}$, по-видимому, происходит

быстрее, чем по связи C=Se. Выходы реакций присоединения нитрилиминов к 1-бензил-5-метиленселеногидантоинам сравнимы с выходами реакций присоединения азометинилидов к аналогичным диполярфилам. Однако, выходы соединений типов **V** и **VI** в среднем ниже по сравнению с их ранее полученными серными аналогами.

1.3.2. Реакции 5-метиленселеногидантоинов с азометинимидами

В качестве диполярфилов в реакциях с азометинимидами исследовались 5-метилен- и 1-бензил-5-метиленселеногидантоины **55-56**, **61-62** и **64**. Реакции азометиниминов с 5-метиленселеногидантоинами **55** и **56** по методике, ранее оптимизированной в нашей научной группе для реакций с метилидентиигидантоинами, привели к образованию продуктов **121-124** структурного типа **VII** (Схема 18, Таблица 8):

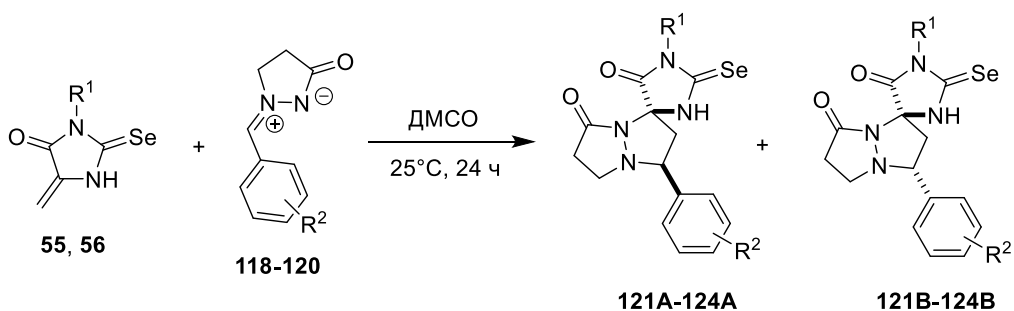


Схема 18.

Таблица 9. Соединения, полученные по Схеме 18

Соединение	R ¹	R ²	Выход (A+B), %	A:B
121	4-EtO-C ₆ H ₄	2,4-Cl	10	7:1
122	4-Me-C ₆ H ₄	2,4-Cl	13	только А
123	4-EtO-C ₆ H ₄	4-MeO	29	1.4:1
124	4-EtO-C ₆ H ₄	4-NO ₂	19	5:1

При анализе спектров ЯМР ¹H выделенных продуктов **120-123** было установлено, что они представляют собой смеси диастереомеров **A** и **B**. Основным изомером во всех случаях являлся изомер **A**. Пространственная структура соединений типа **VII** была подтверждена с помощью методов корреляционной ЯМР-спектроскопии и представлена на Рис. 6. На основании результатов корреляционной ЯМР-спектроскопии соединениям типа **VII** была присовена относительная конфигурация 3'S*,5S*.

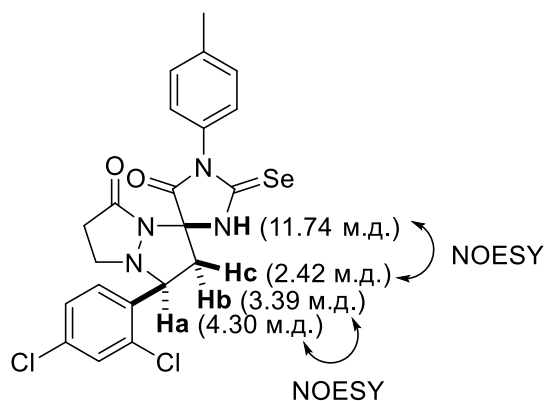


Рисунок 6. Корреляции, наблюдаемые в спектрах NOESY соединения 122.

Реакции 1-бензил-5-метиленселеногидантоинов с азометинимидами проводились при нагревании реакционной смеси в ДМСО до 60°C в течение 6 часов; таким образом были получены соединения 121-126 структурного типа VIII (Схема 19, Таблица 9):

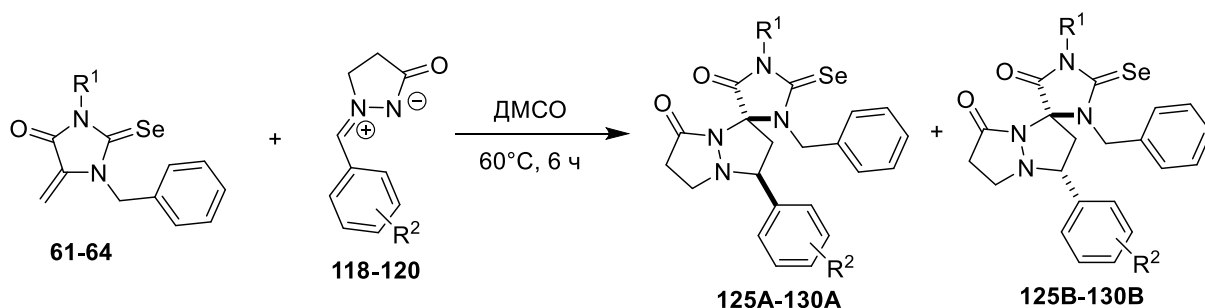


Схема 19.

Таблица 10. Соединения, полученные по Схеме 19

Соединение	R ¹	R ²	Выход (А+В), %	А:В
125	4-Me-C ₆ H ₄	2,4-Cl	55	10:1
126	4-EtO-C ₆ H ₄	2,4-Cl	31	10:1
127	4-MeO-C ₆ H ₄	2,4-Cl	36	10:1
128	Ph	2,4-Cl	49	10:1
129	4-EtO-C ₆ H ₄	4-MeO	47	3.3:1
130	4-EtO-C ₆ H ₄	4-NO ₂	61	6,6:1

По данным спектров ЯМР ¹H получающиеся спироаддукты представляли собой смеси диастереомеров А и В. При этом основным изомером всегда был продукт А, а отношение А:В практически не зависело от заместителя в третьем положении селеногидантоинового цикла и менялось лишь при смене заместителей в бензольном кольце азометинимида. На основании результатов

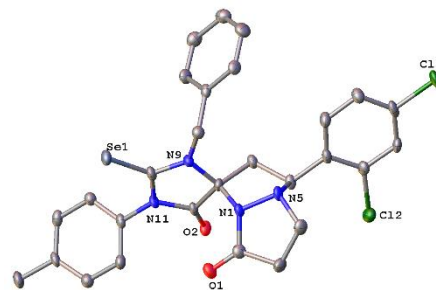


Рисунок 7. Молекулярная структура соединения 125.

рентгеноструктурного исследования соединениям типа VIII была присвоена относительная конфигурация 3`S*,5S*.

1.4. Исследование биологической активности полученных селенсодержащих производных

1.4.1. Цитотоксичность и активация p53

Некоторые из полученных соединений структурных типов I и II были протестированы на цитотоксичность с помощью стандартного теста МТТ с использованием клеточных линий рака молочной железы MCF7, карциномы легкого человека A549, нераковой клеточной линии эмбриональной почки человека НЕК293Т и клеточной линии неракового фибробласта легкого VA13; для сравнения тестировался также доксорубин (Dox) - известный цитостатический препарат. Полученные результаты представлены в Таблице 9.

Наиболее цитотоксичные из полученных в этой работе соединения 65, 67 и 70 проявляли цитотоксичность со значениями IC₅₀ в диапазоне 7,6–8,7 мкМ в отношении клеточных линий A549 и MCF7 (Таблица 9); это значительно ниже цитотоксичности доксорубина. Однако для наиболее активных соединений 65, 67 и 70 наблюдалось селективное действие по отношению к раковым клеткам. Так, соединение 65 оказалось в семь раз более цитотоксичным по отношению к линии раковых клеток A549 по сравнению с нераковой линией клеток VA13 (для доксорубина это соотношение равнялось восьми).

Таблица 11. Цитотоксичность соединений 65, 67 и 70 (МТТ тест, мкМ).

Соединение	Клеточная линия				Индекс селективности	
	VA13	НЕК293Т	A549	MCF7	VA13/A549	НЕК293Т/A549
67	45.2 ± 23.3	19.8 ± 6	8.7 ± 2.5	20.9 ± 3.6	5.2	2.3
65	57.6 ± 24.7	14.4 ± 5.4	8.4 ± 1.5	29.5 ± 9.1	6.9	1.7
70	31.3 ± 12.4	17.3 ± 7.4	10.1 ± 2.3	24.8 ± 5.1	3.1	1.7
dox	0.11 ± 0.04	0.020 ± 0.010	0.014 ± 0.005	0.037 ± 0.015	8.1	1.4

Также некоторые соединения типов I и II исследовали на активацию p53 в тесте активации транскрипционного репортера с целью выяснения возможного механизма цитотоксического действия диспироселеногидантоинов и сравнения их с ранее исследованными структурно близкими гидантоинами и тиогидантоинами. Результаты представлены в Таблице 10. Nutlin-3a, известный ингибитор белок-белкового

взаимодействия p53-MDM2, был использован в качестве положительного контроля. В ходе исследования полученных нами соединения были испытаны четыре разведения соединений типов I и II (от 100 до 1,56 мкМ), и только для соединения **76** в высокой концентрации (>100 мкМ) обработка клеток приводила к двукратной активации p53; эта активация была существенно меньше, чем у Nutlin-3a, и сравнима с действием цисплатина, что позволяет предположить, что механизм цитотоксической активности исследованных соединений не является p53-зависимым.

Таблица 12. Результаты теста на активацию p53.

Концентрация, мкМ	100	25	6.25	1.56	100	25	6.25	1.56
Соединение	ONPG/MTT				Выжившие клетки, %			
Nutlin-3a	8.62	6.83	3.82	1.97	77.34	103.42	103.41	106.33
76	2.08	0.92	0.94	1.15	50.91	79.87	94.15	93.47

1.4.2. Способность к генерации активных форм кислорода

Для соединений **65**, **67**, **73**, и **76-79**, которые тестировали на активацию p53, была также исследована способность генерировать активные формы кислорода (АФК). Для обнаружения АФК в опухолевых клетках A549 была использована амперометрическая наносенсорная система, которая позволяет измерять уровень АФК в одиночных клетках с использованием платиновых нанoeлектродов диаметром 60–100 нм для амперометрического обнаружения перекиси водорода.

Как видно из полученных данных (Рис. 8), все исследованные соединения в той или иной степени оказались прооксидантами, повышающими уровень АФК в тестируемых клетках. Соединение **78** показало более высокий уровень генерации АФК по сравнению с другими исследованными соединениями, увеличивая внутриклеточный уровень АФК примерно в два раза. Это позволяет предположить, что существенным механизмом цитотоксического действия полученных диспиро-селеногидантон-пирролидин-имидазолонов является образование активных форм кислорода.

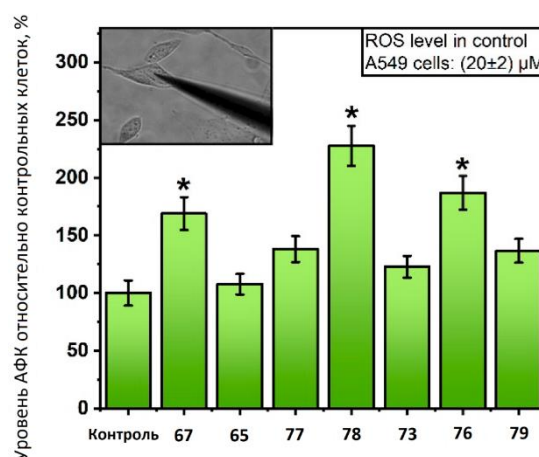


Рисунок 8 Способность исследованных соединений генерировать АФК в экспериментах на клеточной линии A549.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Предложена общая методика получения 3-арил-5-метилендигидантоинов и 3-арил-5-метиленселеногидантоинов реакциями арилизоцианатов или изоселеноцианатов с 1-серинем в смеси NaOH–H₂O–Py с последующей дегидратацией при комнатной температуре под действием HCl.

2. Разработана препаративная методика диастереоселективного получения селенсодержащих диспироиндолинонов с различным положением атома азота в центральном пирролидиновом кольце спироциклической системы (2-селеноксодиспиро[имидазолидин-4,3'-пирролидин-2',3"-индолин]-2'',5-дионы и 2-селеноксодиспиро[имидазолидин-4,3'-пирролидин-4',3"-индолин]-2'',5-дионы) реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения азометинилидов, образующихся из изатина и саркозина или формальдегида и саркозина, к 5-метилен-замещенным 2-селеногидантоинам.

3. Впервые показана возможность получения производных селеноимидазолонов, содержащих структурные фрагменты 2-селеногидантоина и пиразолина, реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилиминов к 1-бензил-5-метилен-2-селеногидантоинам как диполярофилам.

4. Впервые показана возможность получения производных селеноимидазолонов, содержащих структурные фрагменты 2-селеногидантоина и пирролидина, реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиниминов к 5-метилен-2-селеногидантоинам как диполярофилам.

5. Показано, что цитотоксичность полученных в работе селенсодержащих диспироиндолинонов близка к активности соответствующих кислород- и серосодержащих производных. Продемонстрирована прооксидантная активность диспиро-селеногидантоин-пирролидин-имидазолонов и существенный вклад в механизм их цитотоксического действия образования активных форм кислорода.

Основные результаты работы изложены в публикациях:

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

1) **Novotortsev V. K.**; Kukushkin, M. E.; Tafeenko, V. A.; Zyk, N. V.; Beloglazkina, E. K. New spiro-linked indolinone pyrrolidine selenoxoimidazolones //Mendeleev Communications. – 2020. – Т. 30. – №. 3. – С. 320-321. **IF = 1,837 (Web of Science).**

- 2) **Novotortsev V. K.**; Kukushkin, M.E.; Tafeenko, V.A.; Skvortsov, D.A.; Kalinina, M.A.; Timoshenko, R.V.; Chmelyuk, N.S.; Vasilyeva, L.A.; Tarasevich, B.N.; Gorelkin, P.V.; Erofeev A. S.; Majouga A. G.; Zyk N. V.; Beloglazkina E. K. Dispirooxindoles based on 2-selenoxoimidazolidin-4-ones: Synthesis, cytotoxicity and ROS generation ability // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 5. – C. 2613. **IF = 6,208 (Web of Science)**.
- 3) Kukushkin, M.; **Novotortsev, V.**; Filatov, V.; Ivanenkov, Y.; Skvortsov, D.; Veselov, M.; Shafikov, R.; Moiseeva, A.; Zyk, N.; Majouga, A.; Beloglazkina E. Synthesis and biological evaluation of S-, O- and Se-containing dispirooxindoles // *Molecules*. – 2021. – T. 26. – №. 24. – C. 7645. **IF = 4,927 (Web of Science)**.
- 4) **Novotortsev, V. K.**; Kuandykov, D. M.; Kukushkin, M. E.; Zyk, N. V.; Beloglazkina, E. K. Synthesis of 5-methylidene-2-thio- and 2-selenohydantoins from isothiocyanates or isoselenocyanates and l-serine // *Mendeleev Communications*. – 2022. – T. 32. – №. 6. – C. 769-770. **IF = 1,837 (Web of Science)**.