

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Астахова Надежда Евгеньевна**

**Нитроизоксазолы в реакциях функционализации изоксазольного  
цикла и синтезе соединений с различной биологической активностью**

1.4.16. Медицинская химия

1.4.3. Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

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

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

**Официальные оппоненты:** **Ферштат Леонид Леонидович**  
*доктор химических наук, профессор РАН*

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, лаборатория азотсодержащих соединений, заведующий лабораторией

**Ковалев Владимир Васильевич**  
*доктор химических наук, профессор*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра химии нефти и органического катализа, главный научный сотрудник

**Друзина Анна Александровна**  
*кандидат химических наук,*

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Отдел металлоорганических соединений, лаборатория алюминий- и борорганических соединений, старший научный сотрудник

Защита состоится «27» марта 2026 г. в 11 часов 00 минут 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, МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, аудитория 446.

E-mail: 7422990@mail.ru (e-mail совета)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3784>

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.7,  
кандидат химических наук

Н.А. Синикова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Разработка новых путей функционализации изоксазольного цикла является актуальной научной проблемой современной органической и медицинской химии, поскольку данный *N,O*-гетероцикл широко используется в качестве ключевого фрагмента лекарственных препаратов и соединений с подтвержденной биологической активностью. Наличие малостадийных эффективных подходов к введению различных функциональных групп и фрагментов в изоксазольный цикл является залогом успешного дизайна, создания оптимальных путей синтеза новых соединений-хитов и оптимизации структуры известных лидеров ряда изоксазола. Перспективными объектами для направленной функционализации изоксазольного цикла являются 5-метил-4-нитроизоксазолы, что связано с возможностью их использования в реакциях конденсации с получением 5-стирилизоксазолов и (изоксазол-5-ил)енаминов, которые обладают практически значимыми свойствами и могут быть использованы для дальнейших химических превращений. Стирилизоксазолы представляют интерес в качестве флуорофоров нового структурного типа, а с учетом низкой токсичности производных изоксазола введение макроциклического сенсорного фрагмента в структуру данных флуорофоров может рассматриваться как ключевая стратегия для получения молекулярных сенсоров, используемых для визуализации процессов, протекающих в клеточной среде. Енамины, полученные на основе 4-нитроизоксазолов, относятся к аналогам активно изучаемых в настоящее время енаминонов, на основе которых разработано множество нестандартных синтетических протоколов современной органической химии. При этом реакционная способность енаминов, несмотря на высокий синтетический потенциал все еще остается малоизученной.

Таким образом, разработка новых оригинальных синтетических подходов к 5-стирилизоксазолам и (изоксазол-5-ил)енаминам, изучение их свойств и дальнейших превращений с целью получения биологически активных структур представляет собой актуальную задачу в области органической и медицинской химии.

**Степень разработанности темы исследования.** В литературе известно применение 4-нитроизоксазолов для получения соответствующих 5-стирилизоксазолов и (изоксазол-5-ил)енаминов, однако эти реакции описаны преимущественно для коммерчески доступного 3,5-диметил-4-нитроизоксазола. 5-Стирилизоксазолы используются в качестве исходных соединений в энантиоселективных и диастереоселективных реакциях, таких как присоединение нуклеофилов по Михаэлю к двойной связи, процессы домино с последующей циклизацией, [3+2]-циклоприсоединение и аза-реакции Дильса-Альдера. В нашей научной группе впервые были созданы флуорофоры на основе 3-(гет)арил-5-стирилизоксазолов, однако введение макроциклического фрагмента в молекулу изоксазолсодержащего флуорофора ранее не изучалось.

Известен также енамин на основе 3,5-диметил-4-нитроизоксазола, однако несмотря на высокий синтетический потенциал для него описаны только реакции хлорирования и ацилирования.

**Цель и задачи работы.** Целью работы являлся синтез флуорофоров на основе 5-стирилизоксазолов, содержащих макроциклических фрагмент в положении 3 или 5 гетероцикла, исследование их сенсорных свойств и потенциала применения для биовизуализации, а также разработка синтетического подхода к 4-нитро-5-цианоизоксазолам на основе (изоксазол-5-ил)енаминов, изучение их реакционной способности, направленный синтез производных изоксазола с противораковой активностью. В соответствии с поставленной целью решались следующие основные задачи: 1) провести дизайн флуоресцентных сенсоров на основе 5-стирил-4-нитроизоксазолов; 2) разработать методы синтеза 4-нитро-5-стирилизоксазолов, содержащих макроциклический фрагмент в стирильном фрагменте и в положении 3 гетероцикла; 3) изучить сенсорные свойства полученных стирилизоксазолов; 4) изучить возможность применения полученных флуорофоров для визуализаций в клеточной среде; 5) синтезировать ряд енаминов на основе 4-нитроизоксазолов и изучить их в реакции с *трет*-бутилнитритом в присутствии различных добавок; 6) разработать методы синтеза 4-нитро-5-цианоизоксазолов; 7) изучить 4-нитро-5-цианоизоксазолы в реакциях ароматического нуклеофильного замещения с различными *N*-, *O*-, *S*-нуклеофилами; 8) разработать препаративный метод синтеза 5-метил-4-сульфониламиноизоксазолов и 5-циано-4-ациламиноизоксазолов – потенциальных ингибиторов полимеризации тубулина и изучить влияние заместителей на проявление цитотоксичности; 9) осуществить дизайн и синтез новых потенциальных ингибиторов GLUT5 и провести скрининг их противораковой активности.

**Объекты и предмет исследования.** Объектами исследований явились производные 4-нитро- и 4-аминоизоксазолов. Предметом исследования явились реакции конденсации 5-метил-4-нитроизоксазолов, реакция нитрозирования (4-нитроизоксазол-5-ил)енаминов; реакция ароматического нуклеофильного замещения с участием 4-нитро-5-цианоизоксазолов; изучение флуоресцентных и сенсорных свойств 5-стирилизоксазолов; скрининг цитотоксической активности производных изоксазола – лигандов колхицинового сайта связывания тубулина и ингибиторов транспортного белка GLUT5.

**Научная новизна.** Впервые осуществлен дизайн и синтез флуорофоров на основе 5-стирилизоксазолов, содержащих макроциклические сенсорные фрагменты. Изучено влияние строения макроцикла и его расположения в молекуле на сенсорные свойства. Найдено, что макроциклические 5-стирилизоксазолы демонстрируют сольватохромизм и агрегативно-индуцированную эмиссию (АИЭ) в системе ДМСО-вода, а также связывание с белковыми макромолекулами с образованием флуоресцентных комплексов, что показано на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА). Процессы агрегации и деагрегации комплексов обнаружены также в клеточных средах.

Найдена новая реакция (4-нитроизоксазол-5-ил)енаминов с *трет*-бутилнитритом с образованием неизвестных ранее 4-нитро-5-цианоизоксазолов, на основе которой разработан общий метод их синтеза.

4-Нитро-5-цианоизоксазолы впервые изучены в реакции ароматического нуклеофильного замещения под действием *N*-, *O*-, *S*-нуклеофилов. Обнаружена дихотомия реакционной способности 4-нитро-5-цианоизоксазолов в реакциях с нуклеофилами, приводящая к образованию продуктов замещения нитрогруппы с *S*-нуклеофилами и цианогруппы с *N*-нуклеофилами. Изучены механистические аспекты найденных новых реакций.

Проведен дизайн новых структур для скрининга антипролиферативной активности путем замены метильной группы в положении 5 изоксазольного цикла на циано-группу и карбоксильной группы на сульфонильный фрагмент в ряду лигандов колхицинового сайта связывания тубулина – 4-ациламино-5-метилизоксазолов.

Разработаны новые ингибиторы транспортного белка GLUT5 на основе 4-нитроизоксазолов, осуществлен синтез и проведен первичный скрининг их активности.

**Теоретическая и практическая значимость.** Предложена новая стратегия синтеза флуорофоров ряда изоксазола с сенсорными свойствами, в основе которой лежит введение макроциклического фрагмента в структуру 5-стирилизоксазолов. Показано, что наличие сенсорных фрагментов в положении 5 изоксазольного цикла является перспективным направлением синтеза флуорофоров для использования в детекции катионов металлов и органических молекул. Показано, что макроциклические флуорофоры на основе стирилизоксазола в водной среде образуют устойчивые комплексы с бычьим сывороточным альбумином, что представляет интерес для визуализации распределения белков, их подвижности и взаимодействий в живых клетках. Также исследуемые красители ряда изоксазола показали АИЕ в среде ДМСО-вода, что также открывает новые возможности для их применения в биосенсорике и визуализации. Особенно это важно для обнаружения клеточной активности и мониторинга биологических маркеров, что может быть полезно для биологических и фармацевтических исследований.

В рамках данного исследования разработан новый препаративный метод синтеза неизвестных ранее 4-нитро-5-цианоизоксазолов, позволяющий получать продукты различного строения в граммовых количествах. Полученные новые структуры характеризуются уникальными химическими свойствами. В частности, обнаружена дихотомия свойств в реакциях с *N*- и *S*-нуклеофилами, на основе которой может быть осуществлена направленная хемоселективная функционализация изоксазольного цикла в разные положения для получения больших библиотек соединений для целей медицинской химии.

Разработанные методы нашли применение для синтеза производных изоксазола двух структурных типов, проявляющих цитотоксическую активность. Новые данные о зависимости “структура-активность” найдены для аналогов 5-метил-4-ациламиноизоксазолов, ранее

показавших высокую антипролиферативную активность. Впервые получены изоксазольные аналоги известного ингибитора GLUT5 – диариламина MSNBA (N-(4-(метилсульфонил)-2-нитрофенил)бензо[d][1,3]диоксол-5-амин), представляющие интерес для дальнейшего специфического биотестирования с целью определения их гипогликемического и противоопухолевого потенциала.

**Методология и методы исследования.** В исследовании использовались основные подходы медицинской и органической химии, в том числе, классические методы органического синтеза, включающие оптимизацию и масштабирование синтетических методик, а также дизайн и направленный синтез биологически активных молекул. Структуру и чистоту полученных соединений устанавливали с помощью комплекса физико-химических методов: ЯМР-спектроскопии с привлечением двумерных экспериментов, масс-спектрометрии (HRMS-ESI, MALDI), элементного анализа и рентгеноструктурного анализа. Фотофизические и сенсорные свойства изучались методами спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии. Исследование антипролиферативной активности проводили с использованием МТТ-теста.

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

- Введение макроциклического фрагмента в структуру 4-нитро-5-стирилизоксазолов является эффективной стратегией для дизайна сенсоров различных типов. Введение макроцикла в положении 3 изоксазольного цикла не влияет на сенсорные свойства, в то время как наличие макроцикла в стирильном фрагменте приводит к флуорофорам с сенсорными свойствами на катионы металлов.

- Содержащие макроцикл 5-стирилизоксазолы в водной среде не проявляют сенсорные свойства по отношению к катионам металлов, при этом находятся в агрегированной форме. Макроциклические стирильные красители на основе 4-нитроизоксазолов образуют стабильные комплексы с белками на примере БСА. 5-Стирилизоксазолы детектируются в клетках в длинноволновой области («АЕ» сигнал агрегированной формы красителя) и в «зеленой» области спектра благодаря флуоресценции комплексов белок-стирилизоксазол.

- Енамины на основе 4-нитроизоксазолов взаимодействуют по радикальному механизму с *трет*-бутилнитритом с образованием соответствующих нитрозопроизводных, которые при добавлении  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  или трифторуксусного ангидрида дают 4-нитро-5-цианоизоксазолы. Новая реакция позволяет синтезировать 4-нитро-5-цианоизоксазолы различного строения с высокими выходами в граммовых количествах.

- 4-Нитро-5-цианоизоксазолы демонстрируют дихотомию реакционной способности по отношению к *N*- и *S*-нуклеофилам. В реакции с аминами 4-нитро-5-цианоизоксазолы дают продукт замещения 5-цианогруппы, в то время как при взаимодействии с тиофенолами образуются

исключительно продукты замещения 4-нитрогруппы. Нитрогруппа в молекуле 4-нитро-5-цианоизоксазолов восстанавливается в аминогруппу в мягких условиях.

- Разработанные методы эффективны для синтеза аналогов ранее полученных лигандов колхицинового сайта связывания тубулина – 4-(ациламино)-5-метил-3-(триметоксифенил)изоксазолов. Замена ациламидного фрагмента на сульфонамидный в положении 4 изоксазольного цикла, а также замена метильной группы на цианогруппу в положении 5 гетероцикла приводит к существенному снижению цитотоксической активности.

- 4-Нитроизоксазолы являются перспективными скаффолдами в дизайне и синтезе новых аналогов известного ингибитора GLUT5 (диариламина MSNBA) с противоопухолевой активностью.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных результатов обеспечивалась использованием совокупности спектральных методов: ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , методик 2D ЯМР (HSQC, HMBC, NOESY), масс-спектрометрии высокого разрешения, данных рентгеноструктурного и элементного анализа, а также воспроизведением методик и взаимной согласованностью полученных результатов.

**Личный вклад автора** состоит в подборе и анализе литературы, ее систематизации. Автор принимал участие в постановке целей и промежуточных задач, синтезе целевых и промежуточных соединений, подготовке образцов для изучения физико-химических и биологических свойств. Автор участвовал в обработке и интерпретации экспериментальных данных, результатов биологических исследований, в формулировании выводов, в подготовке материалов к публикации в научных журналах, в представлении ключевых результатов на конференциях. Во всех опубликованных в соавторстве работах по теме диссертации вклад автора (Астаховой Н.Е.) является основополагающим, в том числе в работе [1], где автором был проведен синтез выборки флуорофоров и изучение их фотофизических свойств. В статье [2] автор провел синтез стирилизоксазольных красителей; в работе [3] автором был осуществлен синтез новых краун-содержащих лигандов двух типов и анализ их фотофизических и сенсорных свойств; в статьях [4] и [6] автор разработал методики синтеза исходных соединений для новых аналогов комбретастина А4 и ингибиторов GLUT5, соответственно. А также в статье [5] автором был проведен синтез большой серии новых изоксазолсодержащих енаминов, разработана новая реакция получения 4-нитро-5-цианоизоксазолов, получена большая серия новых карбонитрилов и изучены их химические свойства в реакциях нуклеофильного замещения нитро- и циано-групп и восстановления нитро-группы.

**Публикации.** По результатам диссертации опубликовано 6 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

**Апробация работы.** Основные материалы работы были представлены в виде 5 устных докладов на конференциях: XXX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (10-21 апреля 2023 г., Москва, Россия), Всероссийская конференция с международным участием «Химия нитросоединений и аминокислот» (25-29 марта 2024 г., Санкт-Петербург), XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2024» (02-06 сентября 2024 г., Санкт-Петербург, Россия), IX Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (06-10 сентября 2025 г., Пермь, Россия), Всероссийский Конгресс «KOST-2025» по химии гетероциклических соединений (15-19 сентября 2025 г., Владикавказ, Северная Осетия).

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 22-73-00058, грант 25-23-00127)

**Структура и объем работы.** Работа состоит из 8 разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа изложена на 199 листах машинописного текста, содержит 168 рисунков, 9 таблиц. Список литературы включает 207 наименований.

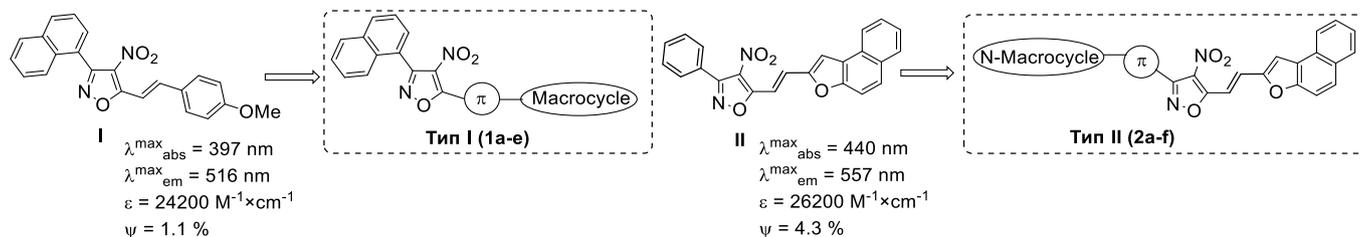
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты диссертационного исследования изложены в 3 основных частях:

1) Синтез краун-содержащих 5-стирил-4-нитроизоксазолов, изучение их сенсорных свойств по отношению к катионам металлов и биомолекулам. 2) Разработка метода синтеза 4-нитро-5-цианоизоксазолов и изучение их реакционной способности по отношению к нуклеофилам и восстановителям. 3) Дизайн, синтез и скрининг цитотоксичности новых аналогов известных ингибиторов полимеризации тубулина и ингибиторов транспортного белка GLUT5.

### **1. Краун-содержащие 5-стирил-4-нитроизоксазолы: синтез, сенсорные свойства и применение в биоимиджинге**

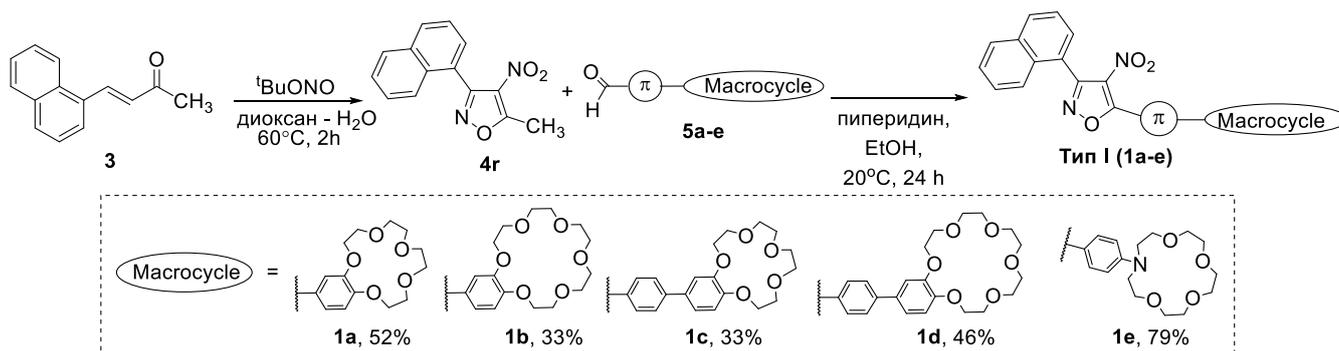
На основании предыдущих исследований фотофизических свойств 4-нитро-5-стирилизоксазолов были выбраны красители **I** и **II** для дизайна новых стирилизоксазолов **1a-e** (тип **I**) и **2a-f**, (тип **II**) содержащих макроциклический сенсорный фрагмент в положениях 5 и 3 изоксазольного цикла (Рисунок 1). Введение макроциклического фрагмента представляет интерес для обеспечения сенсорных свойств на катионы металлов, а также необычных фотофизических свойств за счет образования супрамолекулярных ансамблей.



**Рисунок 1.** Дизайн флуоресцентных сенсоров типа **I** и **II** на основе стирилизоксазолов **I** и **II**.

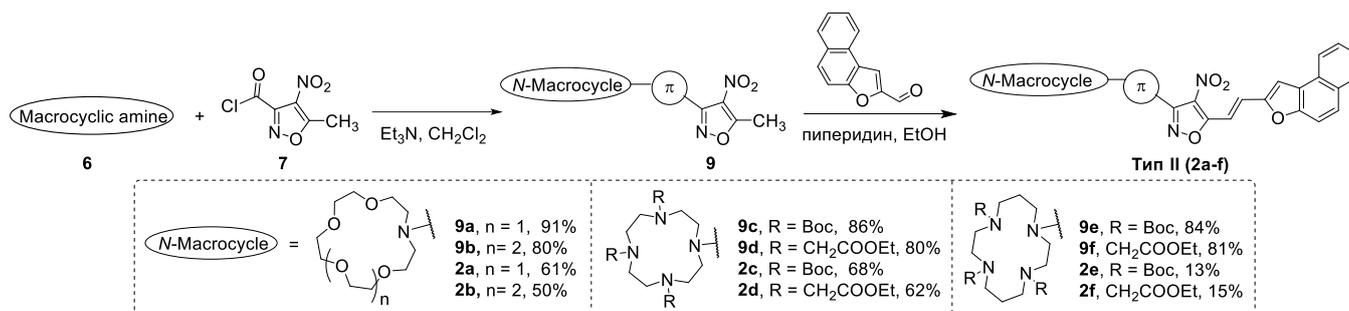
### Синтез краун-содержащих 5-стирил-4-нитроизоксазолов

Синтез 5-стирилизоксазолов **1a-e** (тип **I**) был осуществлен конденсацией 5-метил-4-нитроизоксазола **1a** с макроциклическими ароматическими альдегидами **5a-e** (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Синтез 5-стирилизоксазолов структурного типа **I**.

Введение макроциклического фрагмента в положение 3 гетероцикла (тип **II**) было осуществлено последовательностью реакций ацилирования азакраунов **6** хлорангидридом **7** и конденсации 5-метилизоксазола **9** с нафтофуранкарбальдегидом (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Синтез 5-стирилизоксазолов структурного типа **II**.

### Изучение фотофизических и сенсорных свойств краун-содержащих 5-стирил-4-нитроизоксазолов

Для всех синтезированных 5-стирилизоксазолов **1a-e** и **2a-f** были зарегистрированы спектры абсорбции и эмиссии в  $\text{CH}_3\text{CN}$ , а также вычислены значения квантовых выходов (Таблица 1).

Для 5-стирилизоксазолов типа **I** (**1a-d**) длинноволновые максимумы поглощения находятся в диапазоне 400–406 нм, а максимумы флуоресценции – в пределах 554–563 нм. Введение азакрауна в стирильный фрагмент (соединение **1e**) приводит к батохромному сдвигу в спектрах поглощения и эмиссии. Замена фенильного линкера на бифенильный приводит к снижению квантового выхода примерно в 5 раз ( $\psi$  0.25 % для **1a** против  $\psi$  0.05 % для **1c**, и  $\psi$  0.5 % для **1b** против  $\psi$  0.1 % для **1d**).

**Таблица 1.** Фотофизические свойства стирилизоксазолов **1a-e** и **2a-f**.

№	$\lambda^{\max}_{\text{abs}}$ , нм	$\lambda^{\max}_{\text{em}}$ , нм	$\Delta\nu$ , см <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , М <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>	$\psi$ , %
<b>1a</b>	404	558	6831	6800	0.25
<b>1b</b>	406	557	6580	6600	0.50
<b>1c</b>	400	456, 551	7111	7100	0.05
<b>1d</b>	402	459, 491, 540	7114	7100	0.1
<b>1e</b>	485	562, 626	4644	39900	0.1
<b>2a</b>	436	567	5299	27700	9.4
<b>2b</b>	437	568	5278	28700	11.4
<b>2c</b>	441	569	5101	31500	15.2
<b>2d</b>	438	569	5256	41400	2.78
<b>2e</b>	438	567	5194	27000	12.4
<b>2f</b>	438	568	5225	35000	4.7

Изоксазолы **2a-f** характеризуются близкими значениями максимумов поглощения в области 436–438 нм, а максимумы полос флуоресценции лежат в диапазоне 567–569 нм, независимо от природы заместителя в положении 3 изоксазола. Однако соединения **2a-f** обладают относительно высокими квантовыми выходами флуоресценции (до 15%) по сравнению с соединениями **1a-f**.

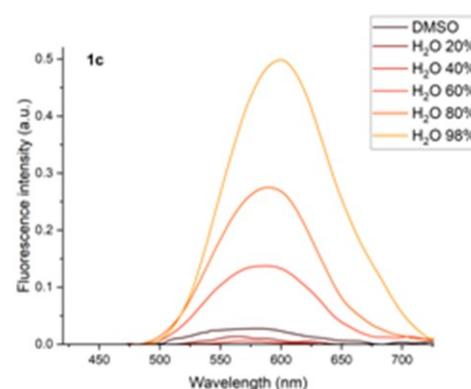
С целью получения данных по сенсорным свойствам 5-стирилизоксазолов по отношению к катионам металлов было оценено влияние катионов металлов (5 экв.) на спектры флуоресценции и абсорбции стирилизоксазолов **1a-e** и **2a-f** в CH<sub>3</sub>CN. Для изучения сенсорных свойств был использован набор из 18 солей перхлоратов металлов (Li(I), Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Ba(II), Al(III), Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II) и Ag(I)) и 3 нитратов металлов (Ga(III), In(III) и Y(III)). Также было изучено влияние комплексообразования с катионами редкоземельных металлов (La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Dy(III), Ho(III), Er(III), Tm(III), Yb(III), Lu(III)) на их флуоресцентные. Было установлено, что соединения структурного типа **II** (**2a-f**) демонстрируют слабый отклик на присутствие катионов металлов, тогда как для изоксазолов **1a-e** наблюдался более выраженный отклик. Для лигандов **1a**, **1c** и **1f** были получены данные о составе образующихся комплексов и рассчитаны значения соответствующих констант связывания (Таблица 2).

**Таблица 2.** Состав и константы комплексов 5-стирилизоксазолов **1a**, **1c**, **1e** с катионами металлов.

Лиганд	Катион	Комплекс	Константа связывания	Метод определения константы
<b>1a</b>	Mg(II)	LM	$2.28 \times 10^6 \pm 0.55 \times 10^6$	Спектрофлуориметрическое титрование
			$1.98 \times 10^6 \pm 0.09 \times 10^6$	Спектрофотометрическое титрование
		LM <sub>2</sub>	$3.66 \times 10^{10} \pm 0.32 \times 10^{10}$	Спектрофлуориметрическое титрование
			$1.56 \times 10^{11} \pm 0.12 \times 10^{11}$	Спектрофотометрическое титрование
<b>1c</b>	Zn(II)	L <sub>2</sub> M	$1.95 \times 10^5 \pm 0.15 \times 10^5$	ЯМР титрование
	Ca(II)	L <sub>2</sub> M	$8.51 \times 10^5 \pm 0.23 \times 10^5$	
<b>1e</b>	Pb(II)	L <sub>3</sub> M	$5.50 \times 10^{16} \pm 0.39 \times 10^{16}$	Спектрофотометрическое титрование
		LM	$7.41 \times 10^5 \pm 0.17 \times 10^5$	
		LM <sub>2</sub>	$5.75 \times 10^{10} \pm 0.14 \times 10^{10}$	

### *Изучение взаимодействия краун-содержащих 5-стирил-4-нитроизоксазолов с биологическими объектами*

Широкий спектр биологической активности и низкой токсичности производных изоксазолов делает стирлизоксазолы привлекательными объектами для изучения в биологических средах. В этой связи для соединений **1a-e** были изучены фотофизические свойства в присутствии воды. Оказалось, что при добавлении деионизированной воды к раствору 5-стирилизоксазолов **1a-f** в DMSO наблюдается эффект агрегационной эмиссии (AIE), при этом для монофенилсодержащих красителей (**1a,b**) наблюдается гипсохромный сдвиг флуоресценции, для бифенильных аналогов (**1c,d**) – увеличение интенсивности флуоресценции в красной области (Рисунок 4), а для азакраунсодержащего изоксазола (**1e**) – увеличение интенсивности флуоресценции с батохромным сдвигом.



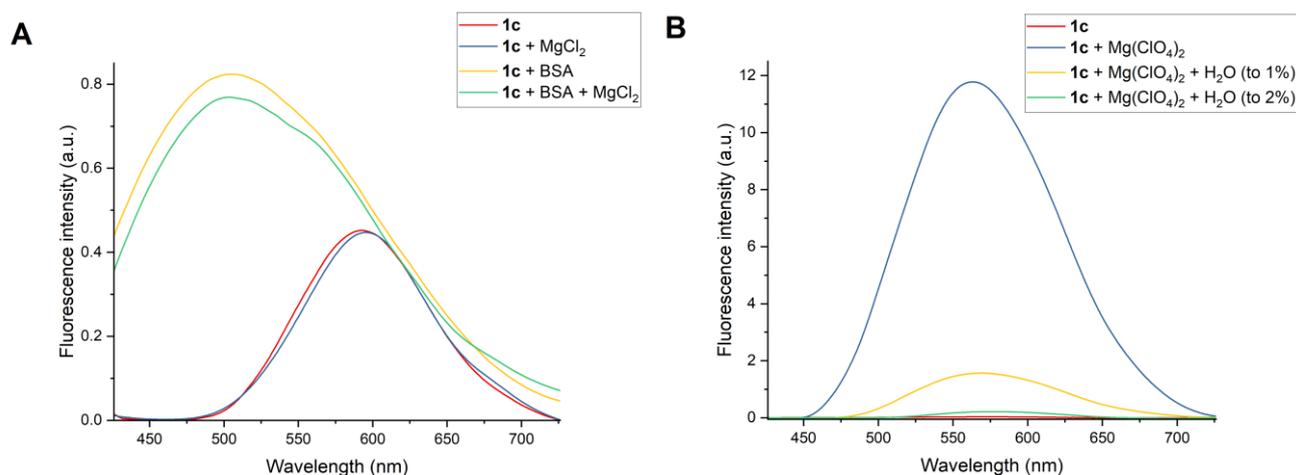
**Рисунок 4.** Эффект AIE на примере стирлизоксазола **1c**. Длина волн возбуждения 365 нм.

Взаимодействие изоксазолов **1a-e**, **2a** и **2b** с белками было показано на примере БСА. Добавление БСА к водным растворам стирлизоксазолов **1a-e** приводило к разрушению агрегатов красителей с образованием комплексов мономеров с альбумином с  $K_b = 1.0-7.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

#### *Взаимодействие с катионами металлов в средах, модулирующих клеточную среду*

Изучение влияния воды на связывание стирлизоксазолов с ионами металлов на примере Mg(II) было проведено для лиганда **1c**. Оказалось, что добавление избытка хлорида магния (0.5 М) к водному раствору **1c** не приводит к разрушению агрегатов и/или образованию комплексов. При добавлении одновременно с катионами Mg(II) белка БСА в качестве агента для разрушения

агрегатов не происходило заметных изменений в спектре флуоресценции соединения **1c**. (Рисунок 5).

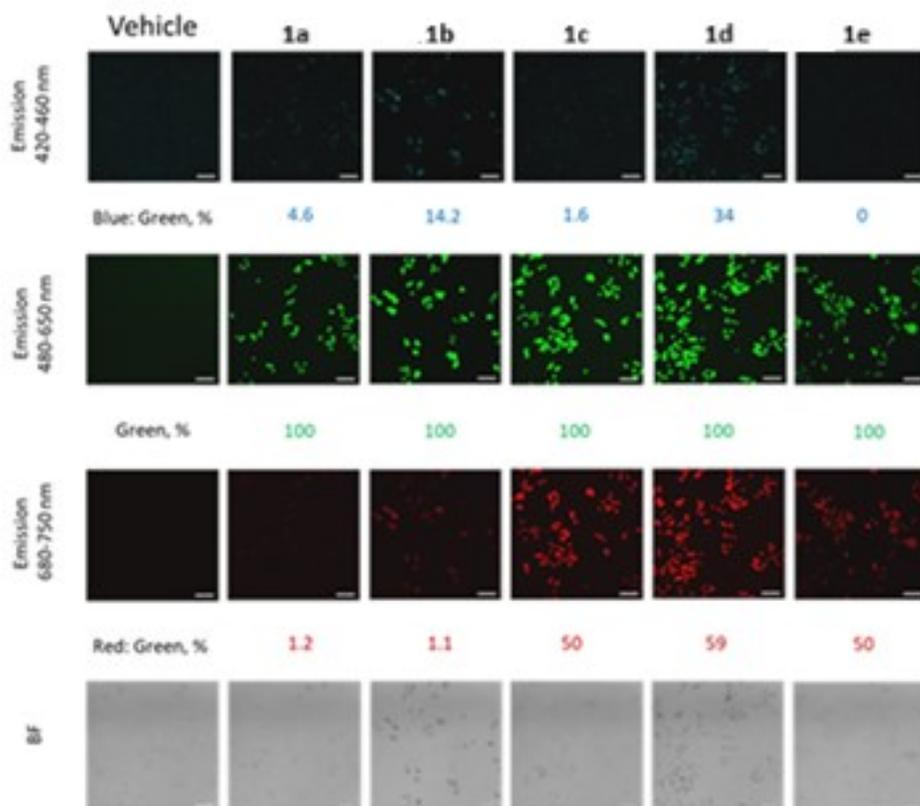


**Рисунок 5.** а) Изменение флуоресценции водного раствора **1c** ( $6.25 \times 10^{-5}$  М) в присутствии БСА ( $2 \times 10^{-4}$  М) и при его отсутствии, но при добавлении  $Mg^{2+}$  (0.5 М) в деионизованной воде; б) Изменения спектра флуоресценции комплекса **1c** ( $3.13 \times 10^{-6}$  М) с  $Mg(ClO_4)_2$  ( $7.5 \times 10^{-2}$  М) в  $CH_3CN$  при добавлении деионизованной воды. Возбуждение при 365 нм.

#### *Цитотоксичность краун-содержащих стирилизоксазолов*

Антипролиферативные свойства соединений **1a**, **1c**, **2c**, **2d**, **2f** были протестированы в отношении опухолевых клеточных линий MCF-7 (карцинома молочной железы), HCT-116 (карцинома толстой кишки), A549 (рак лёгкого), а также нормальных фибробластов лёгочной ткани (WI38). Установлено, что нафталинсодержащие 5-стирилизоксазолы **1a** и **1c**, содержащие бензокраун-эфирные фрагменты в стирильном фрагменте, проявляют цитотоксичность в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} = 1.7-8.1$  мкМ), при этом селективность по отношению к нормальным клеткам не наблюдается. 5-Стирилизоксазолы **2c**, **2d** и **2f** продемонстрировали низкую цитотоксичность ( $IC_{50} = 50-100$  мкМ) или полное ее отсутствие ( $IC_{50} > 150$  мкМ).

Методом проточной цитофлуориметрии были определены оптимальные условия для исследования внутриклеточного распределения: концентрация 2.5 мкМ и время инкубации 24 часа. В этих условиях соединения **1c** и **2b** продемонстрировали наименьшую цитотоксичность по отношению к исследуемым клеточным линиям. Было показано, что соединения **1c** и **2b** распределяются в цитоплазме без проникновения в ядра клеток (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Внутриклеточная флуоресценция флуорофоров **1a-e** в клетках NCT116,  $IC_{50} = 2.5$  мкМ, накопление в течение 3 часов с последующей однократной заменой клеточной среды на натрий-фосфатный буфер (PBS) непосредственно перед визуализацией. Масштаб, 25 мкм.

Также с использованием конфокальной микроскопии была проведена визуализация популяции клеток NCT116, аккумулирующих 5-стирилизоксазолы типа I (**1a-e**). Показано, что соединения серии **1a-e** демонстрируют AIE в длинноволновом диапазоне детекции. В то же время, соотношение "зелёного" к "красному" флуоресцентного сигнала у монофенильных производных **1a** и **1b** оказалось выше, чем у бифенильных аналогов **1c** и **1d**, что свидетельствует о более эффективном связывании **1a** и **1b** с белками по сравнению с **1c** и **1d**.

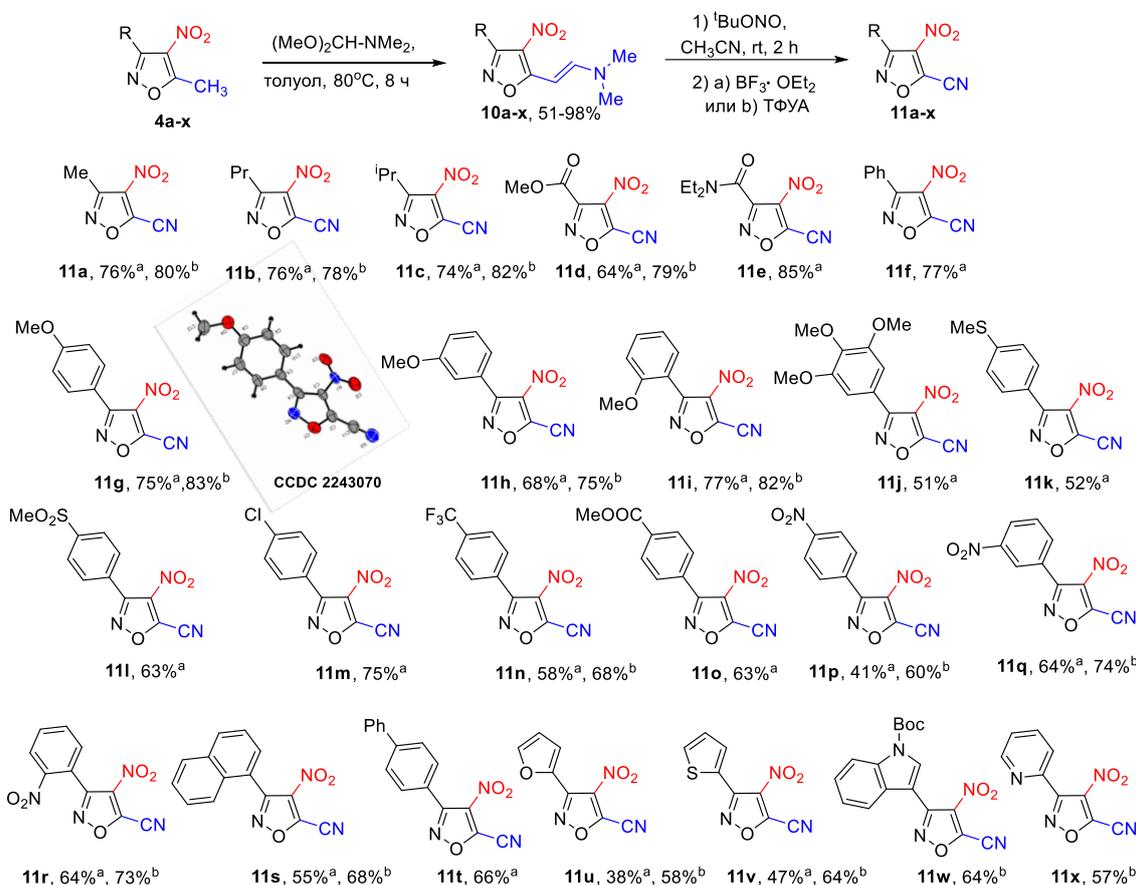
## 2. Новые подходы к функционализации изоксазольного цикла

Следующим этапом работы стала разработка новых подходов к функционализации изоксазольного цикла, основанная на получении из 4-нитро-5-метилизоксазолов соответствующих енаминов и использовании их в реакциях. Мы обнаружили, что при обработке (4-нитроизоксазол-5-ил)енаминов нитрозирующим агентом – *трет*-бутилнитритом (ТБН) в присутствии кислот Льюиса протекает новая реакция образования неизвестных ранее 5-циано-4-нитроизоксазолов.

### *Разработка метода синтеза 5-циано-4-нитроизоксазолов*

Синтез серии енаминов **10a-x** был осуществлен реакцией конденсации 4-нитро-5-метилизоксазолов **4a-x** с диметилацеталем диметилформаида. Для реакции енаминов **10** с ТБН

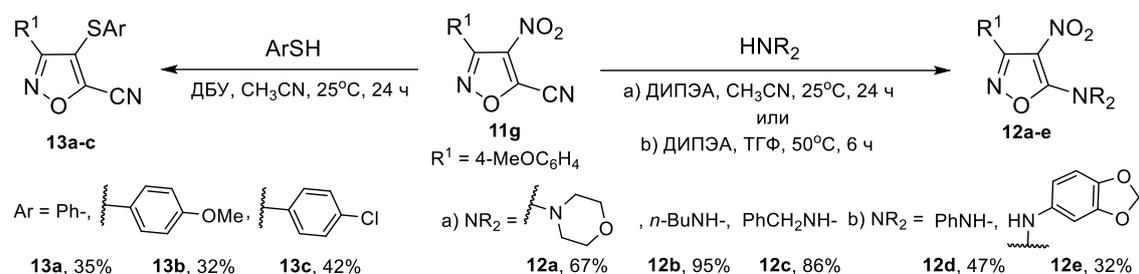
была проведена оптимизация условий с варьированием растворителя, температуры, соотношения реагентов, их концентрации, а также добавки – кислоты Льюиса. В найденных оптимальных условиях ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , 2 экв. ТБН с последующим добавлением 1 экв.  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  или ангидрида трифторуксусной кислоты (ТФУА)) была получена серия 5-циано-4-нитроизоксазолов **11** с разнообразными заместителями в положении 3 гетероцикла (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** Синтез енаминов **10a-x** и 5-циано-4-нитроизоксазолов **11a-x**.

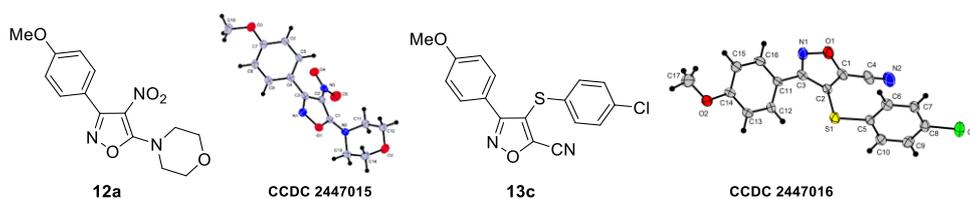
### *Изучение реакционной способности 4-нитро-5-цианоизоксазолов*

Изучение реакционной способности 5-цианоизоксазолов по отношению к различным нуклеофилам было проведено на модельном субстрате **11g**. Оказалось, что реакции **11g** с алифатическими аминами в  $\text{CH}_3\text{CN}$  при комнатной температуре в присутствии ДИПЭА протекают с образованием продуктов замещения цианогруппы – 5-аминоизоксазолов **12a-c** с высокими выходами. В случае менее нуклеофильных ароматических аминов реакция протекала при нагревании до 50°C в ТГФ, при этом продукты **12d** и **12e** были выделены с выходами 47% и 32%. Оказалось, что в ходе реакции изоксазола **11g** с тиофенолами в  $\text{CH}_3\text{CN}$  в присутствии ДБУ происходит замещение 4-нитрогруппы с образованием изоксазолов **13a-c** с выходами 32-42% (Рисунок 8).



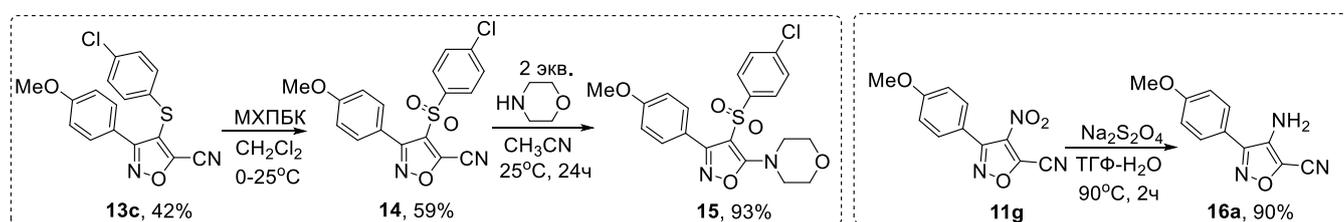
**Рисунок 8.** 4-Нитро-5-цианоизоксазолы в реакциях нуклеофильного замещения.

Строение продуктов нуклеофильного замещения **12a-e** и **13a-c** было подтверждено данными ЯМР спектроскопии и методом РСА на примере соединений **12a** и **13c** (Рисунок 9).



**Рисунок 9.** Данные РСА соединений **12a** и **13c**.

Синтетическое применение 5-цианоизоксазолов было показано на примере получения соединения **15** из производного **13c**, а также на примере восстановления 4-нитроизоксазола **11g** с образованием 4-аминоизоксазола **16a** (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Синтетическое применение 5-цианоизоксазолов.

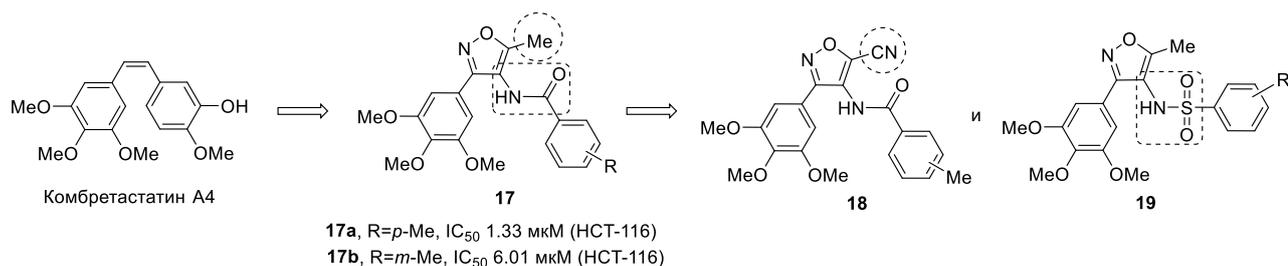
### 3. Дизайн, синтез и скрининг цитотоксичности новых производных изоксазола

Разработанные методы синтеза новых производных изоксазола представляют интерес для получения библиотек биологически активных соединений. Мы использовали методы синтеза и функционализации 5-метил- и 5-циано-4-нитроизоксазолов для получения соединений с противоопухолевой активностью.

#### *Синтез ингибиторов полимеризации тубулина*

В предыдущих исследованиях нашей научной группы было найдено, что изоксазолы **17a,b** являются перспективными аналогами комбретастатина А4 для разработки новых ингибиторов полимеризации тубулина. С целью улучшения фармакокинетических свойств соединений **17** было

изучено влияние на активность замены метильной группы на цианогруппу (структуры **18**) и амидной группы на сульфонамидную (структуры **19**) (Рисунок 11).

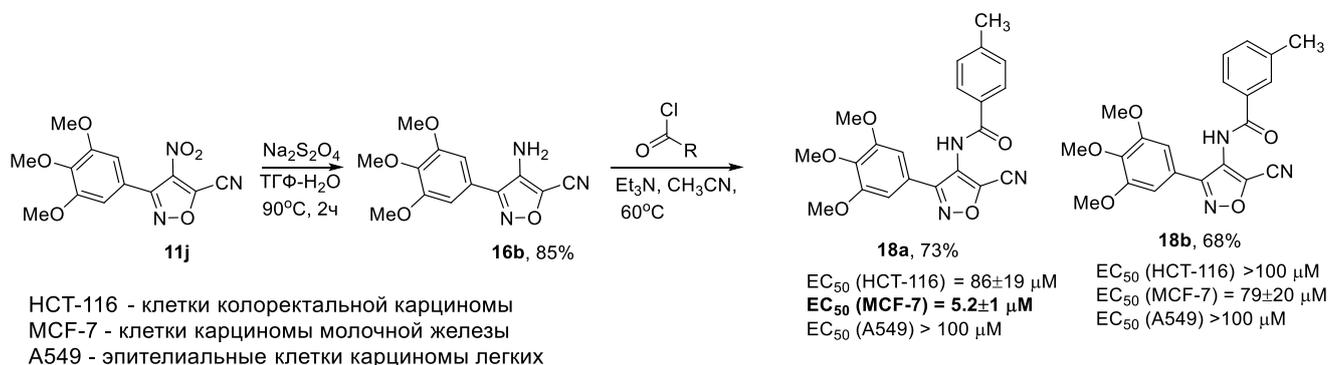


HCT-116 - клетки колоректальной карциномы

**Рисунок 11.** Стратегия синтеза аналогов соединений **17a,b**.

5-Циано-3-(ациламино)изоксазолы **18a,b** были получены реакциями восстановления 4-нитроизоксазола **11j** и последующего ацилирования 4-аминоизоксазола **16b**. (Рисунок 12).

Скрининг противораковой активности производных изоксазола **18a,b** был проведен с использованием МТТ теста<sup>1</sup> на клеточных линиях HCT-116, MCF-7 и. Оказалось, что замена метильной группы в положении 3 изоксазолов **17a,b** на цианогруппу, приводит к снижению цитотоксичности, однако для соединения **18a** была обнаружена цитотоксичность 5 мкМ на клеточной линии MCF-7 (Рисунок 12).

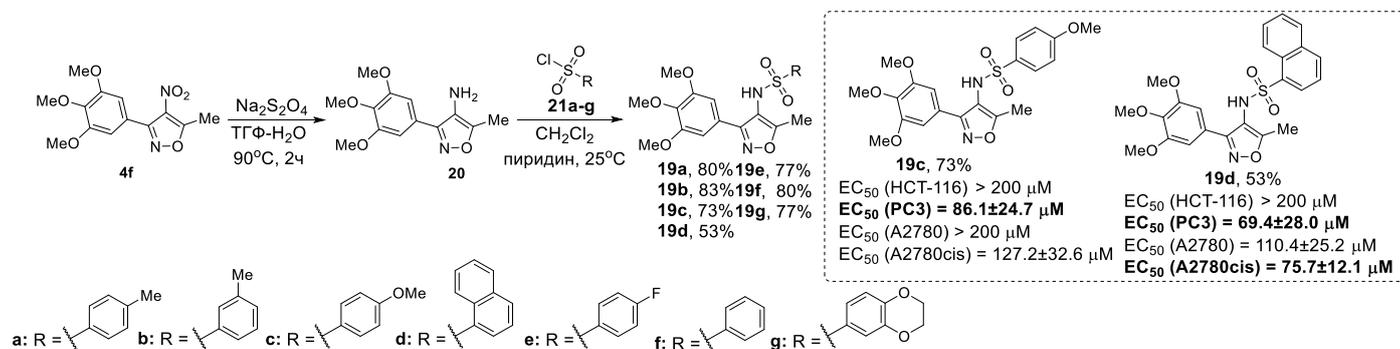


**Рисунок 12.** Синтез и скрининг цитотоксической активности 5-цианоизоксазолов **18a,b**.

Синтез соединений **19a-g** был осуществлен путем сульфонилирования амина **20** различными сульфонирилхлоридами **21a-g** (Рисунок 13).

С помощью МТТ-теста была произведена оценка противоопухолевой активности сульфонамидов **19a-g** на клеточных линиях HCT-116, PC3, A2780, A2780cis. Оказалось, что замена амидного фрагмента в соединениях-хитах **17a,b** на фрагмент сульфонамида приводила к значительному снижению цитотоксичности: лишь соединения **19c** и **19d** показали цитотоксичность в концентрациях ниже 100 мкМ (Рисунок 13).

<sup>1</sup> Тестирование биологической активности выполнялось на кафедре МХиТОС к.х.н. Грачёвой Ю. А.



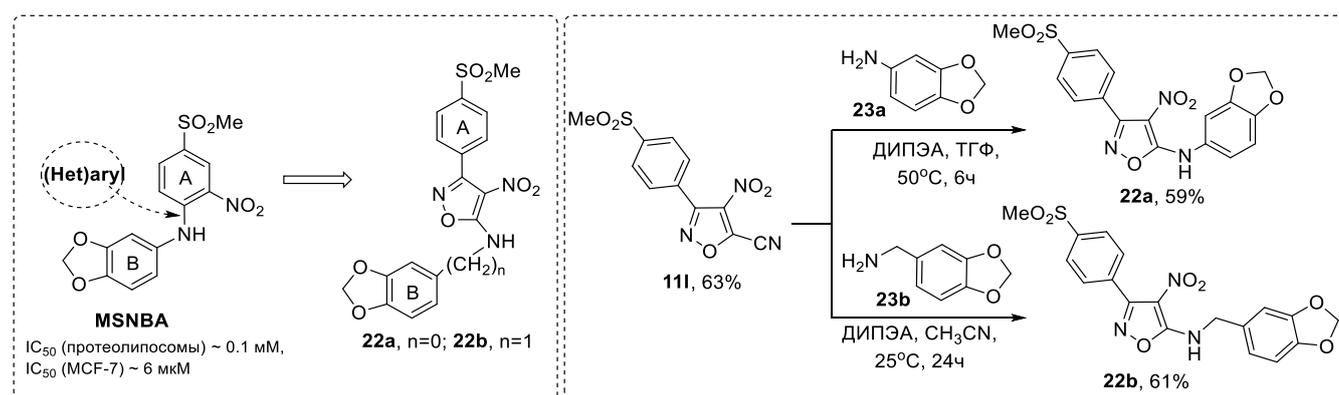
HCT-116 - клетки колоректальной карциномы  
 PC3 - клетки рака предстательной железы  
 A2780 - клетки рака яичника  
 A2780cis - клетки cisплатинрезистентного рака яичника

**Рисунок 13.** Синтез и скрининг цитотоксической активности 5-метилизоксазолов **19a-g**.

### Синтез потенциальных ингибиторов GLUT5

Белки GLUT1–14 играют важную роль в транспорте моносахаридов через клеточные мембраны, среди них GLUT5 отличается высокой специфичностью к фруктозе, избыточное поглощение которой наблюдается при нарушениях обмена веществ и при некоторых злокачественных опухолях. В связи с этим поиск новых селективных ингибиторов транспортного белка GLUT5 представляет интерес для создания новых противоопухолевых препаратов.

Известным селективным ингибитором GLUT5 является диариламин MSNBA, который демонстрирует эффективное действие на раковые клетки. В настоящей работе в процессе дизайна целевых структур<sup>2</sup> изоксазольный цикл был введен в качестве гетероциклического линкера между фрагментами А и В соединения-хита MSNBA. Кроме того, в производных изоксазола **22a** и **22b** нитрогруппа расположена не в бензольном кольце А, а в положении 4 изоксазольного цикла (Рисунок 14).

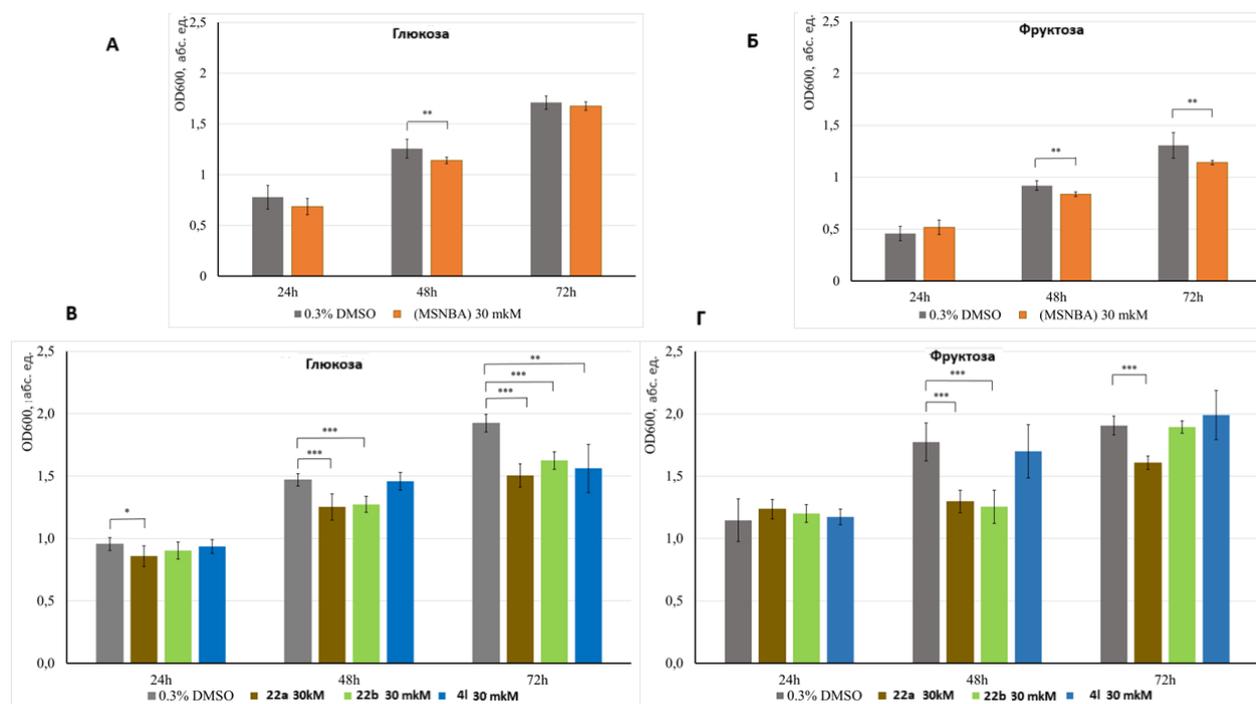


**Рисунок 14.** Дизайн и синтез производных изоксазола **22a** и **22b** – потенциальных ингибиторов рецептора GLUT5.

<sup>2</sup> Совместно с проф. Зефириной О.Н. – кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза.

Целевые изоксазолы **22a,b** были синтезированы с помощью реакций нуклеофильного замещения цианогруппы 5-цианоизоксазола **111** под действием анилина **23a** и бензиламина **23b** (Рисунок 14).

Согласно результатам МТТ теста<sup>3</sup>, соединения **22a** и **22b** в концентрации 30 мкМ практически не ингибируют пролиферацию клеток K562 (хронический миелолейкоз) в среде с глюкозой и фруктозой. Однако через 48 часов инкубации в присутствии изоксазолов **22a** и **22b** происходит подавление роста клеток K562, причем этот эффект более выражен в среде с фруктозой (Рисунок 15). Отметим, что активность соединения **22a** и его гомолога **22b** практически одинакова в обеих средах. Таким образом, низкоспецифичное действие цикловинилогов **22a,b** на пролиферацию клеток K562 отличается от действия соединения **MSNBA**, что может быть обусловлено ингибированием GLUT5 наряду с другими белками семейства GLUT, так и цитотоксическим эффектом, связанным с действием на другие специфические молекулярные мишени. Для точного понимания природы ингибирующего действия на пролиферацию клеток K562 необходимы дальнейшие исследования влияния новых соединений **22a,b** на внутриклеточный транспорт радиоактивно меченых моносахаридов.



**Рисунок 15.** Пролиферация клеток K562 в среде с глюкозой (а,в) или фруктозой (б,г) после 24, 48 и 72 ч обработки 30 мкМ **MSNBA** (а, б) или соединениями **22a**, **22b**, **4l** (б, г). Статистический тест ANOVA в сравнении с контролем: 0,3% ДМСО в среде ( $p < 0,05$ ). Различия в статистической значимости отмечены звездочками: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ .

<sup>3</sup> МТТ тест был выполнен в Институте цитологии РАН к.б.н. В.И. Чубинским-Надеждиным

Таким образом, с использованием разработанных методов функционализации изоксазольного цикла были получены новые потенциальные ингибиторы транспортеров семейства GLUT **22a,b**, представляющие интерес для дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в диссертационной работе продемонстрированы возможности использования 4-нитро-5-метилизоксазолов в синтезе флуорофоров с ценными свойствами, а также в разработке новых методов функционализации изоксазольного цикла и направленном синтезе соединений с противораковой активностью.

В рамках данной работы были сделаны следующие выводы:

1. Осуществлен дизайн и синтез флуоресцентных сенсоров на основе 4-нитро-5-стирилизоксазолов содержащих макроциклический фрагмент в положении 3 гетероцикла и в стирильной группе. Показано, что введение макроцикла в стирильный фрагмент приводит к получению соединений, проявляющих сенсорные свойства на катионы металлов ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) в среде ацетонитрила.
2. Показано, что содержащие макроцикл стирilizоксазолы в водной среде не проявляют сенсорные свойства по отношению к катионам металлов, при этом находятся в агрегированной форме. Добавление к водному раствору красителя БСА приводит к деагрегации и образованию стабильного комплекса стирilizоксазола и макромолекулы. Для большинства красителей при АИЕ наблюдается гипсохромный сдвиг, однако в случае бифенильных производных АИЕ сопровождается сильным батохромным сдвигом. Установлено, что стирilizоксазолы детектируются в клетках в длинноволновой области («АИЕ» сигнал агрегированной формы красителя) и в «зеленой» области спектра благодаря флуоресценции комплексов белок-стирилизоксазол.
3. В ходе изучения реакции нитрозирования енаминов на основе 4-нитроизоксазолов под действием *t*-BuONO было найдено, что при добавлении эфира трифтористого бора или трифторуксусного ангидрида протекает хемоселективное образование ранее неизвестных 4-нитро-5-цианоизоксазолов. Предложена механистическая схема реакции. На основе этой реакции был разработан эффективный метод синтеза 4-нитро-5-цианоизоксазолов различного строения, позволяющий получать продукты с высокими выходами в граммовых количествах.
4. Показано, что 4-нитро-5-цианоизоксазолы демонстрируют дихотомию реакционной способности по отношению к *N*- и *S*-нуклеофилам. Найдено, что 4-нитро-5-цианоизоксазолы в реакции с аминами дают продукт замещения 5-цианогруппы, в то время как при взаимодействии с тиофенолами образуются исключительно продукты замещения 4-нитрогруппы. Региохимия продуктов *S<sub>N</sub>Ar* однозначно доказана спектральными методами и

рентгеноструктурным анализом, а также обоснована квантово-химическими расчетами. Найдены условия восстановления нитрогруппы 4-нитро-5-цианоизоксазолов.

5. Продемонстрирована возможность применения разработанных методов для синтеза соединений с ожидаемой цитотоксической активностью. Проведен дизайн и получены 2 серии соединений производных изоксазола, которые являются аналогами ранее полученных лигандов колхицинового сайта связывания тубулина – 4-(ациламино)-5-метил-3-(триметоксифенил)изоксазолов. Показано, что замена ациламидного фрагмента на сульфониламидный в положении 4 изоксазольного цикла, а также замена метильной группы на цианогруппу в положении 5 гетероцикла приводит к существенному снижению цитотоксической активности.
6. Осуществлен дизайн и синтез новых производных изоксазола, аналогов диариламина MSNBA, который является известным ингибитором транспортного белка GLUT5. В ходе изучения влияния производных изоксазола на пролиферацию клеток K562 в разных средах было показано, что они не являются селективными к глюкозной или фруктозной среде. Предположительно, такое действие обусловлено как одновременным ингибированием разных белков семейства GLUT, так и цитотоксическим эффектом, опосредованным специфическими молекулярными мишенями.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index»:

1. Sadovnikov K.S., Vasilenko D.A., Gracheva Yu.A., Grishin Yu.K., Roznyatovsky V.A., Tafeenko V.A., **Astakhova N.E.**, Burtsev I.D., Milaeva E.R., Averina E.B. 5-Styrylisoxazoles:  $\pi$ -Conjugated System with Fluorescent Properties and Bioactivity // *ChemistrySelect*. – 2023. – Vol. 8, No. 20. – P. e20230083. – EDN VWMYHB. Импакт-фактор 2,0 (JIF), 1 п.л.
2. Бурцев И.Д., Василенко Д.А., **Астахова Н.Е.**, Аверина Е.Б., Трофимов А.В., Кузьмин В.А. Комплексообразование стирилизоксазольного красителя с альбумином // *Химия высоких энергий*. – 2024. – Т. 58, № 3. – С. 233-236. – EDN UUATPW. Импакт-фактор 0,270 (РИНЦ), 0,1 п.л.  
[перевод: Burtsev I.D., Vasilenko D.A., **Astakhova N.E.**, Averina E.B., Trofimov A.V., Kuzmin V.A. Complexation of Styrylisoxazole Dye with Albumin // *High Energy Chemistry*. – 2024. – Vol. 58, No. 3. – pp. 343-345. – EDN HSPQMR. Импакт-фактор 0,6 (JIF), 0,1 п.л.]
3. **Astakhova N.E.**, Sadovnikov K.S., Vasilenko D.A., Markova A.A., Nguyen M.T., Burtsev I.D., Yakushev A.A., Grishin Yu.K., Gracheva Yu.A., Volodina Yu.L., Lukmanova A.R., Spiridonov V.V., Yaroslavov A.A., Averin A.D., Kuzmin V.A., Milaeva E.R., Averina E.B. Isoxazole-based styryl dyes with macrocyclic receptors: synthesis, ion sensing properties and applications in

- bioimaging // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2025. – Vol. 468. – P. 116497. – EDN ETLSGM. Импа́кт-фа́ктор 4,7 (JIF), 1.1 п.л.
4. Кузьмина М.С., **Астахова Н.Е.**, Василенко Д.А., Седенкова К.Н., Гришин Ю.К., Грачева Ю.А., Милаева Е.Р., Аверина Е.Б. Синтез и изучение антипролиферативной активности новых аналогов комбретастина А4 ряда изоксазола // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2025. – Т. 74, № 7. – С. 2184-2189. – EDN LQSCCC. Импа́кт-фа́ктор 1,035 (РИИЦ), 0.4 п.л.  
[перевод: Kuzmina M.S., **Astakhova N.E.**, Vasilenko D.A., Sedenkova K.N., Grishin Yu.K., Gracheva Yu.A., Milaeva E.R., Averina E.B. Synthesis and investigation of antiproliferative activity of novel analogs of combretastatin A4 of isoxazole series // *Russian Chemical Bulletin*. – 2025. – Vol. 74, No. 7. – pp. 2184-2189. – EDN TIDMJS. Импа́кт-фа́ктор 0,305 (SJR), 0.4 п.л.]
5. **Astakhova N.E.**, Vasilenko D.A., Kuzmina M.S., Pupeza A.K., Grishin Yu.K., Tafenko V.A., Averina E.B. *tert*-BuONO-Promoted Nitrosation of 4-Nitroisoxazole-Based Enamines: Synthesis of 5-Cyanoisoxazoles and Their Application // *Journal of Organic Chemistry*. – 2025. – Vol. 90, No. 34. – pp. 12138-12152. – EDN VBHICA. Импа́кт-фа́ктор 3,6 (JIF), 0.9 п.л.
6. **Astakhova N.E.**, Kuzmina M.S., Vasilenko D.A., Shashurin D.A., Vasileva V.Yu., Sudarikova A.V., Zefirov N.A., Averina E.B., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Milaeva E.R., Medvedev O.S., Zefirova O.N. Substituted 3-aryl-4-nitroisoxazoles as potential blockers of the transport protein GLUT5: molecular design, synthesis and primary biotesting // *Mendeleev Communications*. – 2026. – Vol. 36, No. 1. – pp. 12-14. – EDN VSXSHU. Импа́кт-фа́ктор 1,7 (JIF), 0.2 п.л.