

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ефремов Александр Михайлович

**Синтез и биологическая активность новых соединений на основе
2-оксиндольного скаффолда**

1.4.16. Медицинская химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Лозинская Наталья Александровна

Москва – 2026

Оглавление

| | |
|--|----|
| 1. Введение | 4 |
| 2. Литературный обзор | 9 |
| 2.1. Глаукома. Причины, последствия, способы лечения | 9 |
| 2.1.1. Фенотипы глаукомы | 10 |
| 2.1.2. Патофизиология глаукомы | 13 |
| 2.1.3. Лечение и терапия глаукомы | 15 |
| 2.2. Препараты для терапии глаукомы | 15 |
| 2.2.1. Аналоги простагландинов | 15 |
| 2.2.2. Агонисты α -адренорецепторов | 19 |
| 2.2.3. β -Блокаторы | 21 |
| 2.2.4. Ингибиторы карбоангидраз | 23 |
| 2.2.5. Холинергические препараты | 30 |
| 2.2.6. Ингибиторы Rho-киназы | 32 |
| 2.2.7. NO-доноры | 37 |
| 2.3. Новые мишени для антиглаукомных препаратов | 40 |
| 2.3.1. Аденозиновые рецепторы | 40 |
| 2.3.2. Сигнальный путь ангиопоэтин/Tie | 42 |
| 2.3.3. Рецепторы натрийуретического пептида типа C | 43 |
| 2.3.4. Сероводород | 44 |
| 2.3.5. Каннабиноидные рецепторы | 45 |
| 2.3.6. Серотониновые рецепторы | 48 |
| 2.3.7. Мелатониновые рецепторы | 49 |
| 2.4. Методы синтеза функционально замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 53 |
| 2.4.1. Основные подходы | 53 |
| 2.4.2. Методы синтеза с замыканием оксиндольного цикла | 54 |
| 2.4.3. Окисление 3-замещенных оксиндолов | 56 |
| 2.4.4. Синтезы на основе изатина | 58 |
| 3. Обсуждение результатов | 67 |
| 3.1. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов в условиях микроволновой активации | 68 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2. | Синтез 3-замещенных 2-оксиндолов без гидрокси-группы | 74 |
| 3.3. | Исследование биологической активности 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов | 76 |
| 3.4. | Синтез 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 78 |
| 3.5. | Исследование биологической активности 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 80 |
| 3.6. | Синтез amino-замещенных 2-оксиндолов | 82 |
| 3.7. | Синтез 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов | 85 |
| 3.8. | Исследование биологической активности 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов | 89 |
| 3.9. | Синтез 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 91 |
| 3.10. | Исследование биологической активности 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 96 |
| 3.10.1. | Изучение влияния на внутриглазное давление <i>in vivo</i> | 96 |
| 3.10.2. | Изучение биологической активности <i>in vitro</i> | 100 |
| 4. | Экспериментальная часть | 103 |
| 4.1. | Синтез замещенных 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов | 104 |
| 4.2. | Синтез замещенных 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов без гидрокси-группы | 109 |
| 4.3. | Синтез замещенных 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов | 113 |
| 4.4. | Синтез замещенных амин-замещенных 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов | 117 |
| 4.5. | Синтез 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов | 120 |
| 4.6. | Синтез 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов | 127 |
| 4.7. | Методы тестирования биологической активности | 134 |
| 4.8. | Методы изучения соединений <i>in silico</i> | 138 |
| 5. | Заключение | 140 |
| 6. | Список литературы | 142 |

1. Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Глаукома – группа офтальмологических патологий, характеризующаяся поражением зрительного нерва, которая является одной из основных причин необратимой слепоты в мире. Основной причиной возникновения глаукомы является нарушение оттока глазной жидкости, которое приводит к повышению внутриглазного давления (ВГД) и деформации диска зрительного нерва.

На текущий момент препараты, используемые в клинической практике для терапии глаукомы, относятся к следующим семи классам: аналоги простагландинов, агонисты альфа-адренорецепторов, бета-адреноблокаторы, ингибиторы карбоангидраз, холинергические препараты, ингибиторы Rho-киназы и NO-доноры. Однако препараты всех вышеперечисленных классов имеют множество побочных эффектов, как местных, так и системных, что ограничивает их применение. В то же время многие препараты оказываются неэффективны ввиду индивидуальной непереносимости или возникновения тахифилаксии у определенных пациентов. В связи с этим создание нового антиглаукомного препарата является важной и актуальной задачей.

Известно, что мелатонин способен снижать ВГД, вероятно, через взаимодействие с мелатониновыми рецепторами 2 и 3 подтипов (MT2 и MT3), однако обладает седативным действием за счет взаимодействия с MT2 и быстро разлагается на свету. Селективный агонист MT3-рецептора 5-MCA-NAT, являясь биоизостером мелатонина, сохраняет гипотензивные свойства и не демонстрирует седативного эффекта. Следовательно, аналоги мелатонина могут быть использованы в качестве основы для создания нового антиглаукомного препарата. Структурной основой мелатонина и 5-MCA-NAT является индольный скаффолд, который, следуя стратегии скаффолд-хоппинга, можно заменить на более стабильный 2-оксиндольный скаффолд, сохранив биологический эффект.

Таким образом, настоящая работа направлена на синтез нескольких серий новых 2-оксиндолов с различными фармакофорными группами и проверку их биологической активности.

Цель работы

Целью данной работы является разработка новых производных 2-оксиндолов с гипотензивной активностью обладающих потенциальным нейропротекторным действием для создания перспективных антиглаукомных препаратов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Оптимизировать методы получения 3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов как содержащих гидроксигруппу в 3-ем положении оксиндольного цикла, так и без нее, с целью изучения влияния данной гидроксигруппы на биологическую активность оксиндолов.
- Разработать экспресс-метод синтеза 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов с использованием микроволнового облучения, оценить эффективность и универсальность данного экспресс-метода.
- Изучить возможные механизмы взаимодействия производных 2-оксиндолов с ферментом NQO2 с помощью молекулярного моделирования для выявления соединений-лидеров.
- Разработать метод синтеза новых 5-арилметиламино-2-оксиндолов с использованием реакции восстановительного аминирования
- Разработать метод синтеза новых сульфаниламидных производных оксиндола с потенциальными антиглаукомными свойствами
- Исследовать антиглаукомную активность всех новых синтезированных соединений *in vivo* и выявить зависимости структура-активность.
- Оценить антиоксидантные свойства полученных соединений, а также их профиль безопасности.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования выступают производные 2-оксиндола с разнообразными заместителями, в основном, в 3 и 5 положениях оксиндольного скаффолда. Предмет исследования включает разработку методов синтеза этих соединений, изучение их гипотензивной активности, а также механизмов действия, в частности взаимодействия с ферментом NQO2 и влияния на окислительный стресс.

Методология и методы исследования

В работе применялись современные стратегии медицинской химии, включая направленный молекулярный дизайн, скаффолд-хоппинг и фрагмент-ориентированный синтез. Получение целевых соединений осуществляли с использованием как традиционных методов органического синтеза, так и инновационного подхода с микроволновой активацией. Контроль процесса синтеза, выделение и очистку продуктов проводили методами тонкослойной и колоночной хроматографии. Для подтверждения структуры и степени чистоты синтезированных соединений применяли комплекс современных аналитических методов: ЯМР-спектроскопию, ИК-спектрометрию, масс-спектрометрию высокого разрешения и элементный анализ.

Научная новизна

В данной работе предложена инновационная стратегия синтеза функционализированных 2-оксиндолов, основанная на микроволновой активации конденсации изатинов с СН-кислотными соединениями, что позволило в 18 раз сократить продолжительность реакции (с 3 ч до 10 мин) без снижения выходов целевых продуктов. Разработанный подход открывает новые возможности для быстрого создания библиотек потенциальных биологически активных соединений. С помощью разработанного экспресс-метода впервые получена серия новых 5-арил-3-гидрокси-2-оксиндолов.

Впервые осуществлен направленный синтез новых 5-арилметиламино-2-оксиндолов с использованием реакции восстановительного аминирования и синтез серии новых 6-метокси-5-сульфонамид-2-оксиндолов.

Впервые исследовано взаимодействие новых замещенных 2-оксиндолов с потенциальными антиглаукомными мишенями: с хинон оксидоредуктазой II (NQO2), а в случае сульфонамидов на основе 2-оксиндолов - с карбоангидразой II (CA II).

Впервые установлен уникальный фармакологический профиль синтезированных соединений, сочетающий выраженную гипотензивную активность (снижение ВГД до 27%) с антиоксидантным действием при отсутствии цитотоксичности в диапазоне терапевтических концентраций. Также проведена предварительная оценка резорбтивного эффекта и зависимости доза-эффект полученных соединений.

Теоретическая и практическая ценность работы

Теоретическая значимость исследования заключается в разработке новых подходов к синтезу функционализированных 2-оксиндолов, расширяющих методологический арсенал медицинской химии. Полученные данные о зависимости между определенными структурными фрагментами (3-гидрокси, 3-цианометил, 3-карбоксиметил, 5-арил, 5-арилметиламин или 5-сульфонамид) и гипотензивной активностью соединений вносят вклад в понимание молекулярных основ биологической активности данного класса соединений. Также было показано отсутствие корреляции между аффинностью соединений к NQO2 и их гипотензивным эффектом.

Практическая значимость работы определяется созданием эффективных и воспроизводимых методик синтеза, позволяющих получать целевые соединения с высокими выходами за значительно сокращенное время, что имеет важное значение для фармацевтической промышленности. Выявленные высокоактивные соединения, способные снижать внутриглазное давление на 15-27% без проявления митохондриальной токсичности и цитотоксичности, представляют существенный практический интерес как перспективные кандидаты для разработки новых антиглаукомных препаратов с улучшенным профилем

безопасности. Разработанные методы модификации 2-оксиндольного скаффолда и установленные корреляции между структурой и активностью могут быть использованы при создании новых лекарственных средств для терапии не только глаукомы, но и ассоциированных с ней заболеваний, таких как увеит, диабетическая ретинопатия или ретинопатия недоношенных.

Положения, выносимые на защиту

- Использование микроволновой активации при конденсации изатинов с малоновой и циануксусной кислотами позволяет значительно сократить время реакции и получать 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолы с высоким выходом.
- 3-Гидрокси-3-цианометил-замещенные производные 2-оксиндола проявляют более выраженную антиглаукомную активность *in vivo* по сравнению с аналогами, не содержащими гидроксильной группы или с карбоксиметильным заместителем в 3 положении оксиндольного цикла.
- Разработанная методика восстановительного аминирования разнообразно замещенных бензальдегидов 5-амино-2-оксиндолами обеспечивает получение 5-арилметиламино-2-оксиндолов с выходами до 92% и высокой степенью чистоты.
- 5-Арилметиламино-3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндолы сочетают способность снижать внутриглазное давление экспериментальных животных на 15-27% (в концентрации 0,1%) с антиоксидантной активностью при отсутствии митохондриальной токсичности.
- Оптимизация метода введения сульфонамидного фрагмента в 2-оксиндольный скаффолд, заключающаяся в сульфохлорировании изатинов с помощью хлорсульфоновой кислоты с последующей реакцией с аминами и *one-pot* гидролизом, позволяет получать новые 3-гидрокси-5-сульфонамид-2-оксиндолы с антиглаукомной активностью.

Личный вклад автора

Автором (Ефремовым А.М.) выполнен анализ литературных данных по тематике диссертационного исследования. В работе [1] автор лично осуществлял синтез исходных, промежуточных и целевых соединений, в работе [2] автор осуществлял синтез целевых соединений, а также подготовку образцов для исследования их физико-химических и биологических характеристик. В работах [3] и [5] автор осуществлял разработку синтетического алгоритма и проводил апробацию методик синтеза. В работе [4] автор участвовал в модификации существующих методик синтеза под цели и задачи эксперимента. Во всех работах [1-5] списка статей, опубликованных по теме диссертации, автор принимал

непосредственное участие в определении целей и задач работы, обработке экспериментальных данных, интерпретации результатов биологических тестов, формулировании выводов, подготовке публикаций и представлении основных результатов на научных мероприятиях. В опубликованных совместных работах по теме диссертации вклад автора (Ефремова А.М.) является основополагающим.

Степень достоверности, апробация работы и публикации

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается систематической воспроизводимостью полученных экспериментальных данных, их верификацией, согласованностью полученных выводов с литературными источниками, использованием современных физико-химических методов анализа.

Основные материалы работы были представлены на следующих конференциях: XXVth Young Research Fellow Meeting (Париж, Франция, 20-22 февраля 2019 г.); XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, Россия, 9-12 апреля 2019 г.); 4-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2019» (Екатеринбург, Россия, 9-14 июня 2019 г.); XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, Россия, 8-13 сентября 2019 г.); 27th SCT Young Research Fellows Meeting (Кан, Франция, 29-31 января 2020 г.); EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session (Базель, Швейцария, 9-10 сентября 2020 г.); XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020» (Москва, Россия, 10-27 ноября 2020 г.); Международная конференция по химии «Байкальские чтения-2023» (Иркутск, Россия, 4-8 сентября 2023 г.); 6-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2024» (Нижний Новгород, Россия, 1-4 июля 2024 г.).

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Структура и объем работы

Работа состоит из шести разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 170 листах машинописного текста, содержит 74 рисунка, 22 таблицы. Список литературы включает 315 наименований.

2. Литературный обзор

2.1. Глаукома. Причины, последствия, способы лечения

Глаукома относится к числу многофакторных заболеваний глаз, патогенез которых связан с постепенной гибелью нейронов сетчатки, что в конечном итоге приводит к необратимому нарушению зрительных функций. Несмотря на то, что показатель внутриглазного давления (ВГД) может оставаться в пределах нормальных значений у части пациентов, именно его коррекция представляет собой единственный доказанный метод воздействия на течение болезни. Данная патология занимает ведущее место среди причин полной утраты зрения, однако при своевременно начатой терапии, направленной на стабилизацию офтальмотонуса, удается значительно замедлить темпы прогрессирования патологического процесса [6,7].

В современной офтальмологической практике для нормализации ВГД применяются три основных направления лечения: использование лекарственных средств (обычно в форме глазных капель), лазерная терапия и хирургия [8]. Следует отметить, что хотя современные хирургические технологии развиваются в сторону уменьшения травматичности, большинство таких методик внедряется в широкую клиническую практику без проведения достаточного количества контролируемых исследований, что ограничивает возможность объективной оценки их эффективности.

Значительной проблемой в борьбе с глаукомой остается ее позднее выявление, что связано как с недостаточной эффективностью существующих программ профилактического обследования, так и с проблемами доступности специализированной офтальмологической помощи для определенных групп населения [9]. В настоящее время научное сообщество сосредоточено на изучении новых перспективных направлений терапии, включая разработку нейропротекторных методов лечения, не зависящих от уровня ВГД [10], внедрение персонализированного подхода к лечению на основе генетических маркеров заболевания, а также исследование возможностей применения передовых биотехнологий, таких как клеточная и генная терапия [11,12].

Глаукома характеризуется постепенным ухудшением зрительных функций, при этом развитие патологического процесса часто происходит асимметрично. Особенностью заболевания является способность центральной нервной системы компенсировать возникающие дефекты зрительного восприятия за счет адаптационных механизмов. Вследствие этого пациенты могут длительное время не замечать развивающихся нарушений, что приводит к позднему обращению за медицинской помощью, когда болезнь достигает запущенных стадий. Кроме того, возраст является значимым фактором риска глаукомы - заболевание поражает около 3,5% людей в возрастной группе от 40 до 80 лет. Поэтому эпидемиологические исследования прогнозируют значительный рост распространенности

глаукомы в предстоящие годы, что напрямую связано с процессами демографического старения населения [13,14]. Современные методы терапии не позволяют восстановить уже утраченные зрительные функции, что подчеркивает критическую важность ранней диагностики и своевременного начала адекватного лечения.

2.1.1. Фенотипы глаукомы

Первичная и вторичная

Глаукому принято разделять на первичную и вторичную формы. Первичная форма встречается наиболее часто и развивается как самостоятельное заболевание без сопутствующей глазной патологии. Её возникновение преимущественно связано с генетической предрасположенностью, поскольку глаукома обладает высокой степенью наследуемости. Наличие случаев глаукомы в семейном анамнезе повышает риск развития заболевания у близких родственников в восемь раз по сравнению с общей популяцией [15]. Особую категорию представляет врождённая глаукома, встречающаяся с частотой 1 случай на 10-30 тысяч новорождённых [16]. В отличие от других форм, где первой линией терапии являются медикаментозное или лазерное лечение, врождённая глаукома требует незамедлительного хирургического вмешательства.

Вторичная глаукома развивается на фоне других патологических состояний глаза. Её возникновение связано с повышением ВГД вследствие различных причин, что в конечном итоге приводит к повреждению зрительного нерва. Основными провоцирующими факторами выступают воспалительные заболевания (увеит), неоваскуляризация переднего отрезка глаза (часто как осложнение диабетической ретинопатии или окклюзии сосудов сетчатки), травматические повреждения, а также применение некоторых системных препаратов, включая топирамат (противосудорожный препарат) [17–19]. Особого внимания заслуживает взаимосвязь между высокой степенью миопии и риском развития глаукомы. У пациентов с миопией более -3 диоптрий вероятность возникновения глаукомы увеличивается в 3,3 раза, а при степени миопии свыше -6 диоптрий риск становится ещё более значительным [20]. Эта зависимость приобретает особую актуальность в свете глобального роста распространённости миопии. Кроме того, глаукома остаётся частым осложнением витреоретинальных хирургических вмешательств, несмотря на постоянное совершенствование операционных методик.

Открытоугольная и закрытоугольная

Глаукома также традиционно классифицируется на две основные формы - открытоугольную и закрытоугольную, причем принципиальное различие между ними обусловлено анатомическими особенностями строения угла передней камеры глаза (Рисунок

2.1). Клинические наблюдения показывают, что хотя открытоугольная форма встречается значительно чаще (по глобальным оценкам, ею страдают около 65 миллионов человек по сравнению с 30 миллионами случаев закрытоугольной глаукомы), именно закрытоугольная форма ответственна за приблизительно 50% всех случаев глаукомной слепоты во всем мире, что однозначно свидетельствует о ее более тяжелом и прогностически неблагоприятном течении [13,21].

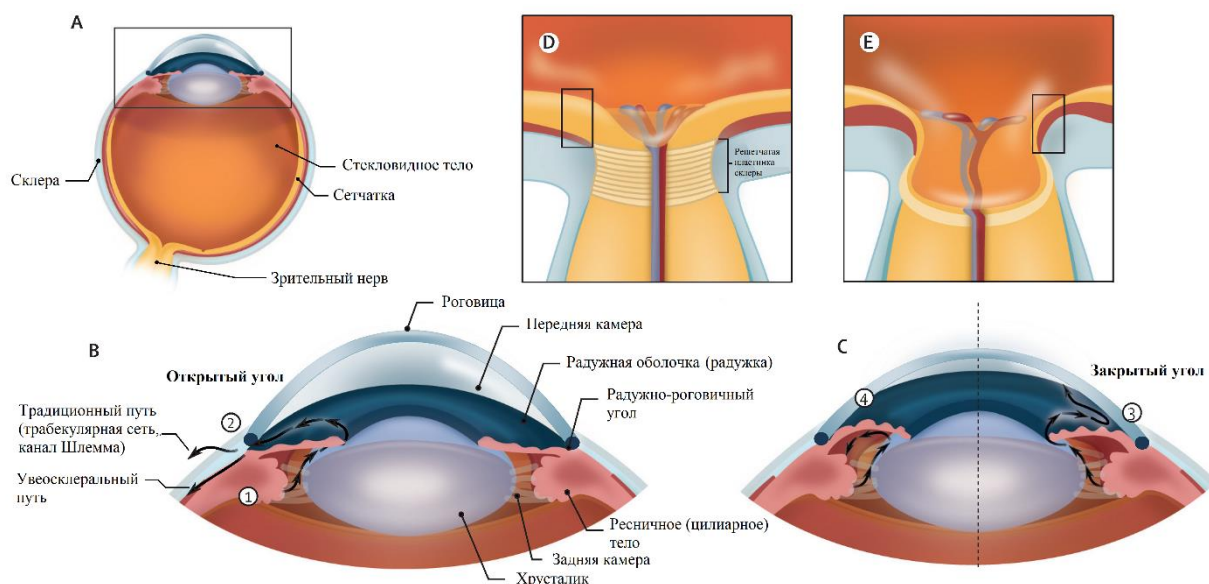


Рисунок 2.1. Анатомия глаза и путь водянистой влаги при открытом и закрытом радужно-роговичном угле [6]. (А) Общее строение человеческого глаза. (В) Расположение структур, связанных с секрецией и оттоком водянистой влаги. 1 – цилиарное тело, ответственное за продукцию водянистой влаги. 2 – дренажные пути, через которые происходит отток водянистой влаги. (С) Расположение структур глаза при закрытоугольной глаукоме. 3 – закрытие радужно-роговичного угла. 4 – контакт между радужкой и зрачком (зрачковый блок). Черными стрелочками указан путь водянистой влаги. (D) Нормальный зрительный нерв. (E) Глаукоматозный зрительный нерв.

Ключевое значение в патофизиологии глаукомы имеет радужно-роговичный угол - структура, расположенная в периферическом отделе передней камеры глаза между роговицей и радужной оболочкой глаза (Рисунок 2.1). С точки зрения гистологического строения, передняя стенка угла образована склеральной тканью, задняя - передней поверхностью радужки, а между ними располагаются цилиарное тело и трабекулярная сеть. Последняя представляет собой сложную фильтрующую систему, соединяющую переднюю камеру глаза с шлеммовым каналом - циркулярным сосудом, залегающим в склеральной борозде [22].

Физиология оттока водянистой влаги в норме осуществляется по двум основным путям. Традиционный путь (90% оттока) предполагает фильтрацию через трабекулярную сеть с

последующим поступлением в шлеммов канал, откуда жидкость по системе коллекторных каналов достигает эписклеральных вен. Увеосклеральный путь (10% оттока) характеризуется проникновением жидкости по поверхности цилиарного тела и корня радужки в супрахориоидальное пространство с последующей резорбцией в глазничные вены [23].

При обеих формах глаукомы наблюдается нарушение трабекулярного оттока водянистой влаги, однако механизмы этих нарушений принципиально различаются [24]. В случае закрытоугольной глаукомы происходит механический контакт между периферическим отделом радужки и трабекулярной сетью, что создает физическое препятствие для нормальной фильтрации водянистой влаги. Особое значение в патогенезе этой формы заболевания имеет феномен зрачкового блока, который может проявляться либо острыми приступами с резким повышением ВГД до критических значений, либо хроническим течением с периодическими подъемами давления, что в конечном итоге приводит к формированию синехий (спайка радужной оболочки и роговицы или хрусталика) и прогрессирующему повреждению структур зрительного нерва [25,26].

При открытоугольной глаукоме патологический процесс связан с возрастными дегенеративными изменениями в трабекулярной сети, включающими ремоделирование внеклеточного матрикса, уменьшение количества функционально активных клеток и повышение сопротивления оттоку [22]. Хотя эти изменения развиваются постепенно, они также приводят к необратимому повреждению зрительного нерва при отсутствии адекватного контроля уровня ВГД. Именно эти патофизиологические особенности объясняют, почему закрытоугольная форма глаукомы характеризуется более агрессивным течением и худшим прогнозом по сравнению с открытоугольной.

Гипертензивная и нормотензивная

Еще один способ классификации глауком – по уровню ВГД. Хотя повышенное ВГД традиционно рассматривается как ключевой модифицируемый фактор риска, клиническая практика демонстрирует, что у значительной части пациентов (по различным данным, от 40 до 50%) глаукоматозные изменения развиваются на фоне нормальных показателей ВГД, не превышающих общепринятый порог в 21 мм рт. ст. [27]. При этом парадоксальным образом большинство случаев офтальмогипертензии не сопровождается развитием характерных для глаукомы изменений зрительного нерва даже при длительном наблюдении без специфического лечения [28].

Нормотензивная глаукома представляет собой диагностически сложную форму заболевания, при которой традиционный маркер патологии - повышенное ВГД - отсутствует. Современные исследования указывают на комплексное взаимодействие системных и локальных патогенетических факторов, включая нарушения церебральной гемодинамики с

колебаниями внутричерепного давления, различные формы сосудистой дисфункции (в частности, первичную васкулярную дисрегуляцию), а также системные гипотензивные состояния [29]. Эпидемиологические исследования выявили характерные особенности пациентов с нормотензивной глаукомой – чаще всего это женщины с мигренозными головными болями и/или синдромом Рейно, что свидетельствует о роли вазоспастических нарушений в патогенезе [30]. Особый интерес представляют данные о взаимосвязи данной формы глаукомы с синдромом Фламмера [31], характеризующимся генерализованной сосудистой дисрегуляцией, а также с синдромом обструктивного апноэ/гипопноэ сна [32], что подчеркивает необходимость комплексного междисциплинарного подхода к диагностике и лечению этой формы заболевания.

Эти наблюдения существенно расширяют традиционные представления о глаукоме как исключительно "болезни повышенного давления" и требуют разработки новых диагностических алгоритмов, учитывающих сложное взаимодействие различных патогенетических факторов. Особую актуальность приобретает поиск дополнительных маркеров риска и предикторов прогрессирования, которые могли бы помочь в ранней идентификации пациентов с нормотензивной формой заболевания и разработке персонализированных подходов к терапии.

2.1.2. Патофизиология глаукомы

Глаукоматозный процесс представляет собой сложный патобиологический каскад, центральным звеном которого выступает прогрессирующая дегенерация зрительного нерва, сопровождающаяся апоптозом ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и/или патологическим повышением ВГД [33]. Характерным морфологическим проявлением данного заболевания служит структурная перестройка головки зрительного нерва, обусловленная постепенной утратой аксональных волокон ГКС, что визуализируется как нарастающая экскавация диска зрительного нерва. Ганглиозные клетки, расположенные во внутреннем слое сетчатки, выполняют критически важную функцию трансдукции зрительных сигналов, передавая информацию через свои аксоны, которые формируют зрительный нерв и последующие звенья зрительного пути [34].

Согласно современным представлениям, первичная мишень глаукоматозного повреждения - аксоны ГКС, причем наиболее уязвимым участком признана ламинарная область, где нервные волокна преодолевают решетчатую пластинку склеры. Механическое напряжение, создаваемое повышенным ВГД в этой зоне, инициирует каскад молекулярно-клеточных изменений, затрагивающих как нейрональные элементы, так и резидентные глиальные клетки [35]. Особое значение имеет нарушение глиально-нейрональных

взаимодействий, приводящее к дефициту трофической поддержки. Энергетический дефицит, развивающийся в этих условиях, существенно нарушает процессы аксонального транспорта - фундаментального механизма, обеспечивающего жизнеспособность нервного волокна [34].

При гипертензивной форме глаукомы патологический процесс инициируется механическим воздействием повышенного ВГД на аксоны в области решетчатой пластинки. Возникающая аксональная дисфункция запускает ретроградную дегенерацию, приводящую к атрофии ГКС и последующей активации апоптоза [36].

Современные исследования патогенеза глаукомы свидетельствуют о сложном многофакторном характере апоптоза ГКС, причем значительная часть этих механизмов не зависит от аксонального повреждения, вызванного повышением ВГД [37]. В частности, было установлено, что проапоптотические митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) играют ключевую роль в гибели ГКС, активируясь под воздействием различных стрессовых факторов [38]. Экспериментальные данные демонстрируют, что фармакологическое ингибирование этих протеинкиназ или генетический нокаут соответствующих генов обеспечивают значительный нейропротекторный эффект в моделях острой глазной гипертензии [39–41].

Помимо этого, в патогенезе гибели ГКС важную роль играют такие процессы как окислительный стресс [42], нарушение митохондриальной функции [43], активация опухолевого супрессора p53 (обладающего прооксидантным действием на сетчатку [44]), а также каскадное включение различных инициирующих апоптоз каспаз [45]. Несмотря на существенный прогресс в изучении молекулярных механизмов апоптоза ГКС, достигнутый за последнее десятилетие, трансляция этих знаний в клиническую практику сталкивается с рядом серьезных ограничений. Основные сложности связаны как с чрезвычайным разнообразием путей гибели ГКС, так и с несовершенством существующих животных моделей, которые не в полной мере воспроизводят особенности глаукомы у человека [46].

Следует особо подчеркнуть, что ГКС, подобно другим нейронам центральной нервной системы, не обладают способностью к регенерации, и их утрата носит необратимый характер. Это позволяет рассматривать глаукому в ряду типичных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, где ключевым патогенетическим звеном также является прогрессирующая утрата нейрональной функции. Данное обстоятельство существенно меняет подходы к терапии глаукомы, выдвигая на первый план необходимость разработки препаратов с нейропротекторными и антиоксидантными свойствами, которые должны применяться наравне с традиционными гипотензивными средствами. Современные терапевтические стратегии должны учитывать комплексный характер повреждения зрительного пути при глаукоме и направляться не только на контроль ВГД, но и на прерывание каскадов нейрональной дегенерации.

2.1.3. Лечение и терапия глаукомы

В современной офтальмологической практике основным направлением терапии глаукомы остается снижение ВГД, тогда как нейропротекторные подходы играют вспомогательную роль [10]. Терапевтические стратегии подразделяются на три ключевых направления: лазерная терапия, хирургическое вмешательство и фармакологическое лечение. Лазерные технологии нашли разнообразное применение в лечении глаукомы, включая воздействие на трабекулярную сеть для улучшения оттока водянистой влаги, выполнение периферической иридотомии с целью устранения зрачкового блока, абляцию цилиарных отростков для уменьшения продукции внутриглазной жидкости, а также подготовку к хирургическим процедурам типа трабекулэктомии [47].

Хирургическое вмешательство становится необходимым при неэффективности консервативных методов лечения, когда максимально допустимая медикаментозная терапия в сочетании с лазерной трабекулопластикой не позволяет достичь целевых значений ВГД, а также является первым выбором при лечении врожденной глаукомы. Среди оперативных методик трабекулэктомия является наиболее часто выполняемой из фильтрующих операций и направлена на создание нового пути оттока внутриглазной жидкости для снижения ВГД [48]. В последние годы отмечается растущий интерес к минимально инвазивным хирургическим технологиям, чья популярность обусловлена появлением новых специализированных устройств и инструментов [49].

Фармакотерапия, в частности применение местных офтальмологических растворов, рассматривается в качестве оптимального стартового лечения открытоугольной глаукомы согласно современным клиническим рекомендациям [50]. Все современные препараты для терапии глаукомы направлены на снижение ВГД, однако в качестве дополнения к терапии в клинической практике часто применяют лекарственные средства с нейропротекторными и антиоксидантными свойствами, направленные на защиту ГКС.

2.2. Препараты для терапии глаукомы

На основании терапевтической мишени и, соответственно, целевого механизма действия доступные в настоящее время препараты для терапии глаукомы подразделяются на семь классов: аналоги простагландинов, агонисты α -адренорецепторов, β -адреноблокаторы, ингибиторы карбоангидраз, холинергические препараты, ингибиторы Rho-киназы и NO-доноры.

2.2.1. Аналоги простагландинов

Простагландины представляют собой биологически активные липидные соединения, образующиеся в результате метаболизма арахидоновой кислоты под действием

циклооксигеназ ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [51]. Эти молекулы подразделяются на пять основных классов: PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, PGD₂ и TXA₂, каждый из которых взаимодействует со специфическими G-белок-сопряженными рецепторами. В настоящее время идентифицировано девять таких рецепторов: DP_{1,2} для PGD₂, EP₁₋₄ для PGE₂, FP для PGF_{2α} и TP для TXA₂ [52]. Среди аналогов простагландинов только производные PGF_{2α} и некоторые биоизостеры PGE₂ и PGE₃ продемонстрировали способность эффективно снижать ВГД [53,54]. Для аналогов других простагландинов (PGD₂, PGI₂ и TXA₂) подобное гипотензивное действие не описано.

В глазу человека рецептор FP экспрессируется в роговичном эпителии, цилиарном эпителии, цилиарной мышце, а также в стромальных и гладкомышечных клетках радужки [55]. Агонисты этого рецептора (например, аналоги PGF_{2α}) снижают внутриглазное давление преимущественно за счет усиления увеосклерального оттока [53]. Рецепторы EP₂ и EP₄, присутствующие в трабекулярной сети и цилиарном теле, при активации уменьшают жесткость клеток канала Шлемма и повышают сократимость трабекулярных клеток, улучшая отток водянистой влаги по традиционному пути [56,57].

Антиглаукомные лекарства на основе аналогов простагландинов включают в себя биматопрост, латанопрост, травопрост, тафлупрост и омиденепэг изопропил (Рисунок 2.2, 2.3).

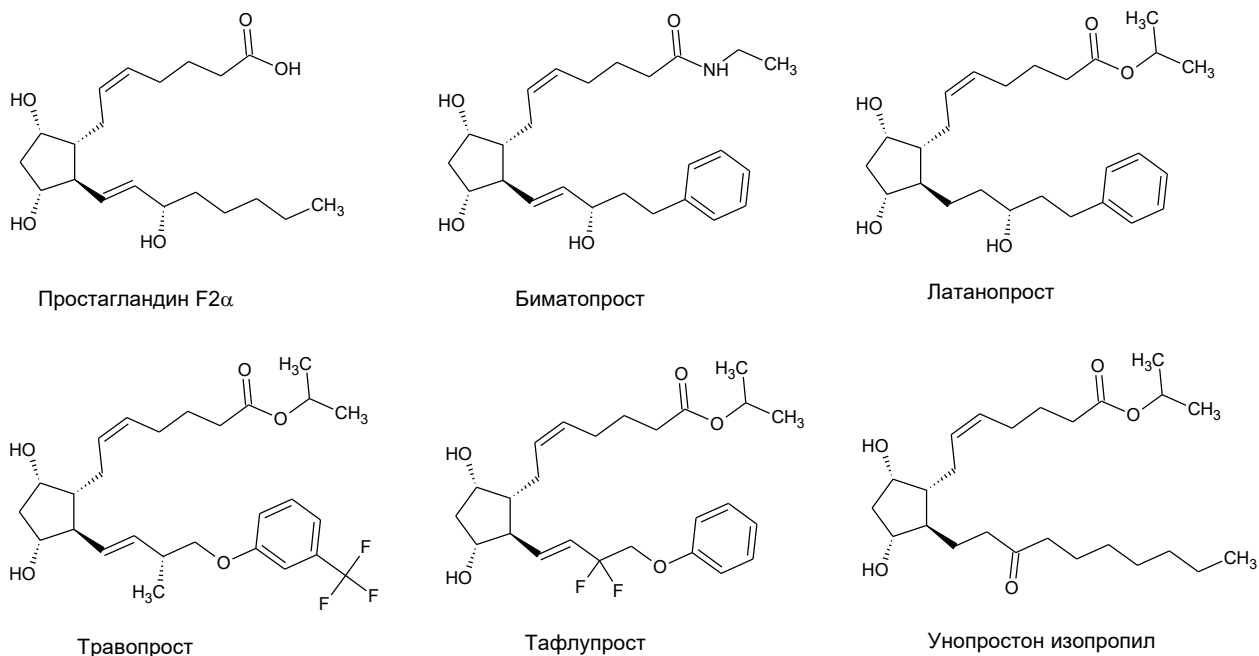


Рисунок 2.2. Антиглаукомные препараты на основе простагландина F_{2α}.

Латанопрост (одобрен FDA в 1996 году) представляет собой сложноэфирное производное простагландина F_{2α}, являющееся высокоселективным агонистом FP-рецепторов [58]. Этот препарат стал первым представителем класса аналогов простагландинов для лечения

глаукомы местного действия, заложив основу для последующих разработок в этой области. Соединение представляет собой пролекарство, которое гидролизуется в тканях под действием эстераз, в результате чего образуется биологически активная форма - латанопростовая кислота. Активный метаболит связывается с FP-рецепторами, запуская каскад внутриклеточных реакций через Gq-белки, что приводит к активации фосфолипазы C и увеличению уровня инозитолтрифосфата-3 и внутриклеточного кальция. Эти процессы стимулируют синтез металлопротеиназ, которые разрушают компоненты внеклеточного матрикса в цилиарной мышце, увеличивая проницаемость увеосклеральных путей и усиливая отток водянистой влаги, что в конечном итоге приводит к снижению внутриглазного давления на 25-35% от исходного уровня [58,59]. Аналоги латанопроста - травопрост и тафлупрост - действуют по сходному механизму, но отличаются химической структурой, профилем побочных эффектов и режимом дозирования.

Травопрост (одобрен FDA в 2006 году), как и латанопрост, представляет собой пролекарство, которое подвергается аналогичным биохимическим превращениям в тканях глаза. Однако в отличие от латанопроста, он проявляет свойства полного агониста FP-рецепторов и демонстрирует примерно в 10 раз большее сродство к этим рецепторам [60].

Тафлупрост (одобрен FDA в 2012 году) является фторированным аналогом простагландина F2 α и обладает еще более выраженной селективностью в отношении FP-рецепторов человека - его сродство к этим рецепторам в 12 раз превышает аналогичный показатель латанопроста [60].

Биматопрост (одобрен FDA в 2001 году), отличие от других представителей этого класса, является простамином и не действует через FP-рецепторы. Его гипотензивный механизм остается не до конца изученным, но известно, что основной эффект достигается за счет снижения сопротивления оттоку водянистой влаги через трабекулярную сеть, что принципиально отличает его от других аналогов простагландинов, преимущественно влияющих на увеосклеральный путь оттока [60,61].

Унопростон изопропил (одобрен FDA в 2000 году) представляет собой производное докозагексаеновой кислоты, которое изначально ошибочно классифицировали как аналог простагландина из-за его гипотензивного эффекта [62]. Однако в 2013 году FDA пересмотрело эту классификацию, поскольку препарат не демонстрирует значимого сродства к известным простагландиновым рецепторам. Несмотря на неясный механизм действия, унопростон сохраняет свою клиническую эффективность как в монотерапии глаукомы, так и в комбинации с тимололом. Современные исследования предполагают, что гипотензивное действие унопростона может быть связано с активацией калиевых и хлоридных каналов, что приводит к расслаблению трабекулярной сети и улучшению оттока водянистой влаги по

традиционному пути [63]. Хотя точная молекулярная мишень унопростона остается неизвестной, его клиническая эффективность и хорошая переносимость поддерживают его использование в практике, особенно у пациентов с непереносимостью стандартных простагландиновых аналогов.

Стоит отдельно отметить, что латанопрост, тафлупрост и биматопрост демонстрируют нейропротекторные свойства, в то время как травопрост и унопростон таким действием не обладают [64]. Этот факт указывает на существование альтернативных механизмов нейропротекции, независимых от активации FP-рецепторов. Особый интерес представляет биматопрост, который, хотя и не действует через FP-рецепторы, тем не менее проявляет защитные свойства в отношении ганглиозных клеток сетчатки, что дополнительно подтверждает гипотезу о множественных путях нейропротекции [65].

Аналоги простагландинов, используемые для лечения глаукомы, вызывают характерные побочные эффекты, включая местные реакции - конъюнктивальную гиперемию, раздражение глаз, зуд и ощущение инородного тела. К специфическим офтальмологическим проявлениям относятся гиперпигментация радужки и кожи век, а также усиленный рост ресниц. В редких случаях могут развиваться более серьезные осложнения: кистозный макулярный отек, передний увеит и реактивация герпетического кератита [66]. Среди системных реакций отмечаются головные боли и провокация мигренозных приступов [67]. Любопытно, что побочный эффект в виде роста ресниц был использован в косметической области – аналоги простагландинов применяют для увеличения ресниц и в борьбе с выпадением волос у мужчин и женщин [68,69].

Новые аналоги простагландинов для терапии глаукомы

Омиденепаг изопропил (одобрен FDA в 2022 году) представляет собой инновационный антиглаукомный препарат с принципиально новым механизмом действия. В отличие от традиционных аналогов простагландинов, это соединение является селективным агонистом рецепторов EP2 - подтипа E-простаноидных рецепторов. Как и многие современные офтальмологические препараты, омиденепаг изопропил представляет собой пролекарство, которое в процессе проникновения через роговицу гидролизует до активного метаболита – омиденепага [70]. Благодаря действию на EP2-рецептор, он одновременно усиливает как традиционный трабекулярный, так и увеосклеральный пути оттока водянистой влаги, причем омиденепаг не демонстрирует характерных для агонистов FP-рецепторов побочных эффектов, таких как гиперпигментация радужки или избыточный рост ресниц. Однако клинические исследования выявили ряд других нежелательных явлений, включая конъюнктивальную гиперемию, утолщение роговицы, макулярный отек и воспалительные реакции глаз [71]. Омиденепаг также демонстрирует выраженную способность предотвращать гибель ГКС, что

было подтверждено как *in vitro*, так и *in vivo* [72]. Его механизм нейропротекции отличается от такового у FP-агонистов и может быть связан с модуляцией внутриклеточных сигнальных путей через активацию EP2-рецепторов.

Сепетапрост – агонист простагландиновых рецепторов EP3 и F2 α , который в 2024 году прошел третью фазу клинических испытаний в Японии и был пре-зарегистрирован в качестве препарата для терапии открытоугольной глаукомы и глазной гипертензии. На данный момент проходит третью стадию клинических испытаний в США, причем по результатам второй стадии, опубликованным в 2025 году, сепетапрост в концентрации 0,002% показал не меньший гипотензивный эффект, чем тимолол в концентрации 0,5% и схожий профиль безопасности, а также превосходит латанопрост по способности снижать ВГД [73–75]. Благодаря комплексному механизму действия сепетапрост является крайне перспективным новым антиглаукомным препаратом.

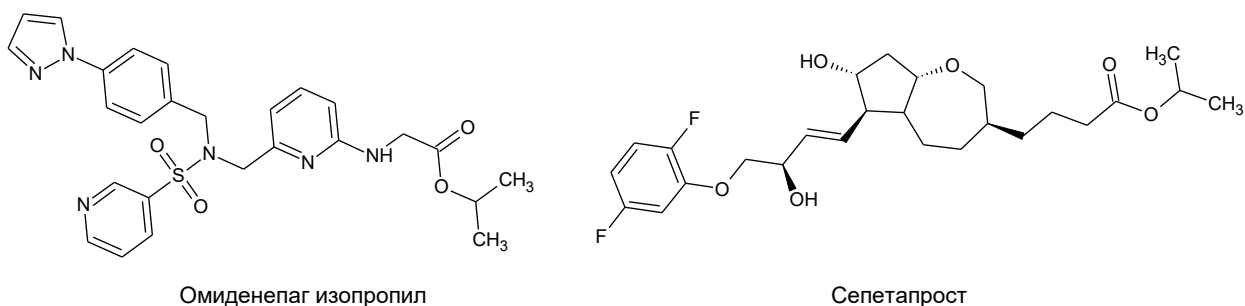


Рисунок 2.3. Новые аналоги простагландинов для терапии глаукомы.

2.2.2. Агонисты α -адренорецепторов

α -Адренергические препараты снижают ВГД за счет стимуляции α -2 адренорецепторов, которые локализованы в цилиарном теле, пигментном эпителии сетчатки и хориокапиллярах, радужной оболочке и нейросенсорной сетчатке. В цилиарном теле преобладает подтип α -2A рецепторов [76]. Активация этих рецепторов уменьшает продукцию водянистой влаги, хотя точный механизм этого процесса остается не до конца изученным. Предполагается, что он связан со снижением уровня внутриклеточного цАМФ, аналогично действию β -блокаторов [77,78].

Наличие α -2 рецепторов в сетчатке открывает возможности для нейропротекторного действия α -адренергических препаратов. Исследования показывают, что α -агонисты могут оказывать защитное действие не только через нормализацию уровня цАМФ [79], но и посредством нескольких механизмов: модуляции NMDA-рецепторов [80], увеличения экспрессии белков клеточного выживания p-Akt и bcl-2 [81], стимуляции нейротрофических факторов [82] и активации неамилоидогенного пути A β [83].

В клинической практике используют несколько α -адренергических препаратов для лечения глаукомы: апраклонидин, бримонидин, эпинефрин, дипивефрин и клонидин (Рисунок 2.4).

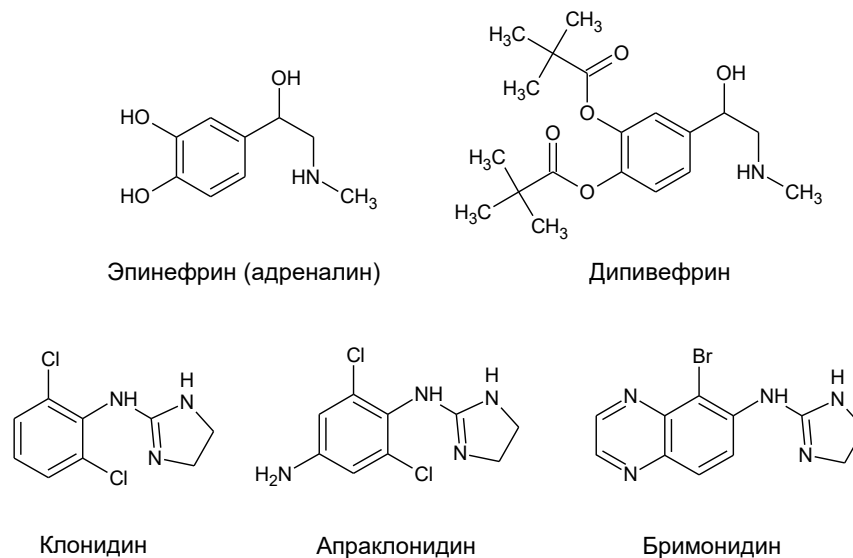


Рисунок 2.4. α -Адренергические препараты для терапии глаукомы.

Эпинефрин (адреналин) и его пролекарство **дипивефрин** (дипивалил адреналин), одобренные FDA в 1980-х годах для лечения хронической открытоугольной глаукомы, оказывают комбинированное действие на α_1 -, α_2 - и β_2 -адренорецепторы глазных структур [84,85]. Однако из-за выраженных системных побочных эффектов в настоящее время эти препараты практически вышли из клинической практики. Их гипотензивный эффект при длительном применении в основном связан с усилением кровотока через трабекулярную сеть и увеосклеральные пути оттока [86,87]. Клинические исследования показали, что у пациентов с открытоугольной глаукомой и офтальмогипертензией концентрации адреналина ниже 1% не оказывают значимого влияния на показатели оттока водянистой влаги [88]. Это ограничивало терапевтические возможности данных препаратов, поскольку более высокие концентрации были сопряжены с риском серьезных побочных реакций.

Клонидин (одобрен FDA в 1974 году) представляет собой преимущественно α_2 -агонист с частичной α_1 -активностью. Его выраженные липофильные свойства обеспечивают хорошее проникновение через гематоэнцефалический барьер, что может вызывать системную гипотензию вследствие воздействия на вазомоторные центры ствола мозга [89].

Апраклонидин (одобрен FDA в 1987 году) действует аналогично клонидину, но благодаря повышенной полярности обладает ограниченной способностью проходить через гематоэнцефалический барьер, что снижает риск системных эффектов [90]. Однако, клинические наблюдения показывают, что апраклонидин достаточно часто провоцирует аллергические реакции при местном применении, в то время как клонидин не вызывает

перекрестных аллергических реакций даже у пациентов с подтвержденной гиперчувствительностью к апраклонидину [91]. Хотя он может применяться для длительной терапии глаукомы в качестве препарата второй линии, его использование часто ограничено развитием привыкания и местными побочными реакциями [92].

Бримонидин (одобрен FDA в 1996 году) – высокоселективный α_2 -агонист с большей липофильностью и сродством к α_2 -адренорецепторам, чем апраклонидин, что позволяет применять его в меньших концентрациях [93]. Его гипотензивное действие обусловлено подавлением продукции водянистой влаги и, вероятно, усилением увеосклерального оттока [94]. Помимо снижения ВГД, бримонидин демонстрирует потенциальные нейропротекторные свойства, защищая ганглиозные клетки сетчатки от апоптоза, что подтверждено в доклинических исследованиях [93]. По гипотензивной эффективности на пике действия он сопоставим с 0,5% тимололом, однако уступает ему по стабильности и продолжительности эффекта [95].

Побочные эффекты α -адренергических агонистов проявляются в зависимости от их селективности к разным подтипам рецепторов. Стимуляция α_1 -адренорецепторов приводит к мидриазу, ретракции века и вазоконстрикции конъюнктивальных сосудов, тогда как активация α_2 -рецепторов чаще вызывает легкую гиперемию, отложение пигмента в роговице, временное затуманивание зрения и ощущение инородного тела [90,96]. Особую проблему представляют аллергические реакции, включающие блефароконъюнктивит, конъюнктивит и дерматит век. Бримонидин, благодаря высокой селективности к α_2 -рецепторам, реже провоцирует α_1 -опосредованные эффекты, а частота аллергических реакций при его применении составляет около 9% [95,97]. В отличие от него, апраклонидин вызывает аллергические реакции значительно чаще – у 25–48% пациентов, что ограничивает его длительное применение [98]. Эти различия в профиле безопасности делают бримонидин более предпочтительным выбором при необходимости длительной терапии.

2.2.3. β -Блокаторы

В организме человека выделяют три подтипа β -адренорецепторов: β_1 , β_2 и β_3 . В глазных структурах эти рецепторы распределены неравномерно - они обнаруживаются в цилиарных отростках, экстраокулярных мышцах, конъюнктивальной оболочке, роговичном эпителии и эндотелии, а также в трабекулярной сети и цилиарной мышце [99,100]. Фармакологическое действие β -адреноблокаторов на продукцию водянистой влаги реализуется через сложный механизм, ключевым элементом которого служит подавление катехоламин-индуцированного синтеза цАМФ, хотя детали этого процесса требуют дальнейшего изучения [78].

С точки зрения фармакодинамики, антиглаукомные β -блокаторы проявляют свойства конкурентных антагонистов β 1- и β 2-рецепторов, демонстрируя при этом минимальную активность в отношении рецептора β 3-подтипа. В клинической практике применяются как неселективные препараты (например, тимолол), одновременно блокирующие β 1- и β 2-рецепторы, так и селективные средства (в частности, бетаксолол), избирательно воздействующие только на β 1-рецепторы [101].

Важно отметить, что гипотензивный эффект этой группы препаратов обусловлен преимущественно угнетением секреции водянистой влаги, однако параллельно наблюдается незначительное снижение её оттока, что может рассматриваться как нежелательный аспект их фармакологического действия [102]. В настоящее время в арсенале офтальмологов имеется пять β -адреноблокаторов, одобренных FDA для лечения глаукомы: бетаксолол, тимолол, левобунолол, картеолол и метипранолол (Рисунок 2.5).

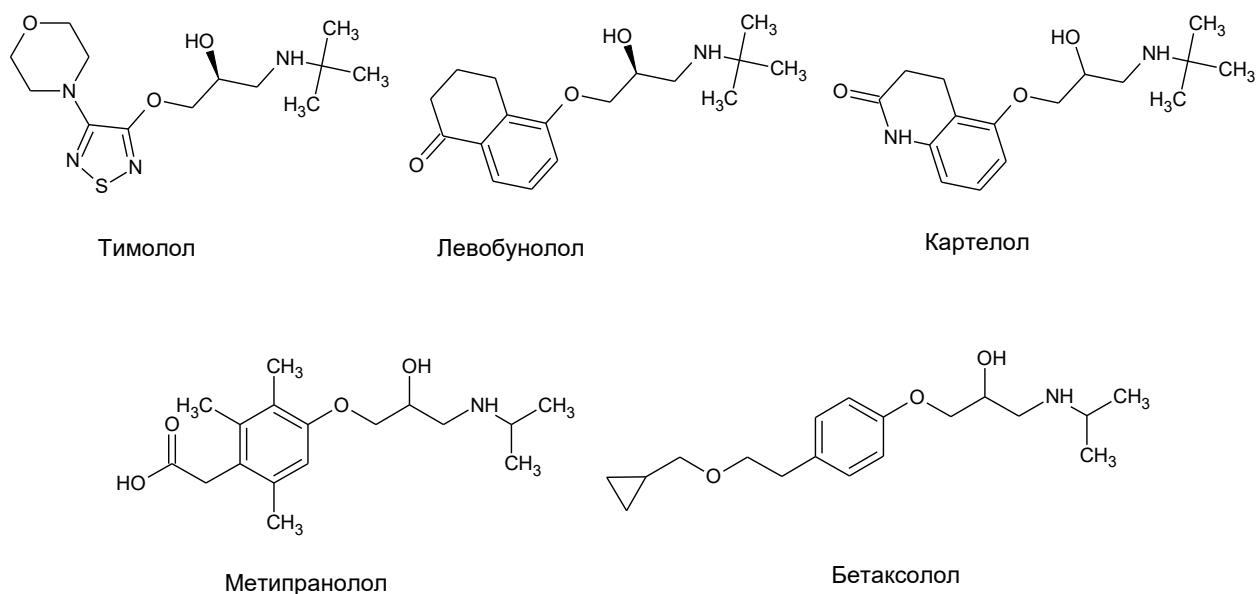


Рисунок 2.5. β -Блокаторы для терапии глаукомы.

Тимолол (одобрен FDA в 1978 году) представляет собой классический неселективный β -адреноблокатор, ставший первым препаратом этого класса, разрешенным для антиглаукомной терапии. Первоначально он применялся в свободной форме, но впоследствии были разработаны его производные - малеинат и гемигидрат тимолола, обладающие улучшенными фармакодинамическими характеристиками [103]. Особенностью тимолола является его способность легко преодолевать гематоретинальный барьер, что приводит к системной абсорбции и может вызывать различные нежелательные сердечно-сосудистые и респираторные эффекты [104,105].

Остальные неселективные β -блокаторы, такие как **левобунолол** (одобрен FDA в 1985 году), **картеолол** (одобрен FDA в 1988 году) и **метипранолол** (одобрен FDA в 1989 году)

действуют, вероятно, то тому же механизму, что и тимолол, и демонстрируют те же побочные эффекты [106–108]. Однако левобунолол и картеолол имеют важную особенность: их основные метаболиты (дигидролевобунолол и 8-гидроксикартеолол соответственно) сохраняют гипотензивную активность, что объясняет пролонгированное действие этих препаратов, причем 8-гидроксикартеолол обладает даже большим гипотензивным эффектом, чем его предшественник [109,110].

Бетаксолол (одобрен FDA в 1985 году) является селективным β_1 -адреноблокатором. Парадоксальность его действия заключается в том, что хотя цилиарное тело содержит преимущественно β_2 -рецепторы, бетаксолол, будучи селективен к β_1 -рецепторам, все же демонстрирует гипотензивный эффект, вероятно, за счет слабого взаимодействия с β_2 -рецепторами. По эффективности снижения ВГД он уступает тимололу, но благодаря β_1 -селективности оказывает менее выраженное влияние на сердечно-легочную систему, что делает его предпочтительным выбором для пациентов с сопутствующими кардиореспираторными заболеваниями [111].

Рассматриваемая группа β -адреноблокаторов демонстрирует более благоприятный профиль офтальмологических побочных эффектов по сравнению с агонистами α -адренорецепторов и холиномиметиками и также проявляет нейропротекторные свойства, основанные на блокировке калиевых каналов [112,113]. Тем не менее, их применение может сопровождаться рядом местных реакций, включая транзиторную гиперемию конъюнктивы, субъективные ощущения жжения и покалывания, развитие синдрома сухого глаза, а также поверхностные точечные повреждения роговицы (кератит) [114]. Основную же опасность представляют системные эффекты β -адреноблокаторов: блокада β_1 -рецепторов сердца приводит к брадикардии, аритмиям, сердечной недостаточности и обморокам, а угнетение β_2 -рецепторов бронхов - к бронхоспазму и обострению астмы [115]. Эти нежелательные явления особенно опасны для пожилых пациентов и людей с кардиореспираторными заболеваниями.

2.2.4. Ингибиторы карбоангидраз

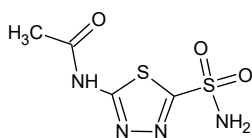
Карбоангидразы (CA) представляют собой группу цинксодержащих ферментов, катализирующих обратимое превращение углекислого газа и бикарбоната, что играет ключевую роль в различных физиологических процессах. Поэтому ингибиторы карбоангидраз (CAI) используются при лечении глаукомы, ретинопатии, гемолитической анемии, эпилепсии, ожирения и онкологических заболеваний [116]. В организме человека идентифицировано 16 изоформ этого фермента, каждая из которых выполняет специфические функции в разных тканях и органах. В глазу человека обнаружено шесть изоформ карбоангидразы (CA I, II, IV, IX, XII и XIV), однако только три из них (CA II, IV и XII) рассматриваются как потенциальные

мишени для антиглаукомных препаратов [117,118]. При этом доказанное влияние на секрецию водянистой влаги установлено лишь для изоформы СА II, которая преимущественно локализована в цилиарном отростке.

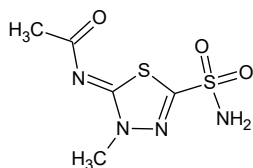
Ингибиторы карбоангидразы, относящиеся к сульфаниламидным соединениям, представляют собой единственную группу препаратов, доступных как в местной, так и в системной формах для лечения глаукомы. Их механизм действия основан на подавлении активности СА II в эпителиальных клетках цилиарных отростков, что приводит к уменьшению образования бикарбоната и последующему снижению секреции водянистой влаги, а значит и понижению ВГД [116]. Структурно изоформы СА I и СА II относятся к цитозольным ферментам, в то время как СА IV является мембраносвязанной формой. Распределение этих изоферментов в тканях глаза имеет выраженную гетерогенность: все три изоформы (СА I, II и IV) обнаруживаются в хрусталике; в роговичной эндотелии присутствуют только СА I и II; тогда как исключительно СА II выявляется как в сетчатке, так и в цилиарном отростке [119,120]. Неселективность ингибиторов карбоангидразы в отношении изоформы СА I представляет собой существенный терапевтический недостаток, поскольку приводит к развитию различных нежелательных побочных реакций. Также особый интерес представляет видоспецифичность распределения СА IV - в отличие от лабораторных животных (мышей и кроликов), у человека этот изофермент практически отсутствует в цилиарном отростке [119,121]. Хотя экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли СА IV в регуляции секреции водянистой влаги у животных, потенциальное применение его селективных ингибиторов ограничивается ветеринарной практикой.

Для терапии глаукомы используются следующие ингибиторы карбоангидраз: бринзоламид, дорзоламид, ацетазоламид, метазоламид, этоксзоламид и дихлорфенамид (Рисунок 2.6).

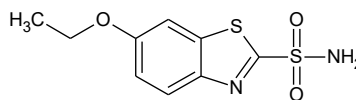
Ингибиторы СА системного действия:



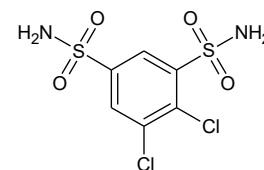
Ацетазоламид



Метазоламид

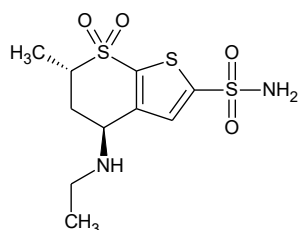


Этоксзоламид

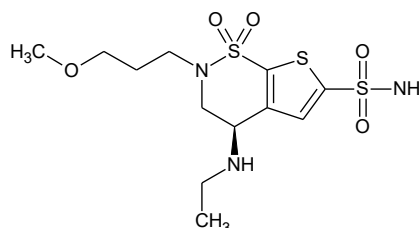


Дихлорфенамид

Ингибиторы СА местного действия:



Дорзоламид



Бринзоламид

Рисунок 2.6. Ингибиторы карбоангидраз для терапии глаукомы.

Системные ингибиторы СА

Ацетазоламид (одобрен FDA в 1953 году) представляет собой неселективный, но наномолярный САИ. Первоначально разработанный как диуретик, он вскоре продемонстрировал выраженную способность снижать ВГД, превосходя по эффективности более поздние местные аналоги - бринзоламид и дорзоламид [122]. Однако широкое клиническое применение пероральной формы ацетазоламида ограничил серьезный профиль системных побочных эффектов, включая метаболический ацидоз, парестезии и нефролитиаз [123]. Попытки создания местной формы препарата столкнулись с проблемой низкой биодоступности из-за плохой проницаемости через роговицу, что существенно снижало гипотензивный эффект [124]. В результате сегодня ацетазоламид применяют преимущественно для купирования острых приступов глаукомы, когда требуется быстрое снижение ВГД [125]. В последние годы исследователи предприняли ряд инновационных подходов для улучшения местной доставки ацетазоламида: инкапсуляция в липосомы, включение в циклодекстриновые комплексы, использование полимерных и гелевых носителей, а также применение поверхностно-активных веществ [126–129]. Эти технологии направлены на преодоление естественного барьера роговицы и повышение терапевтической концентрации препарата в тканях глаза, что может в будущем расширить показания для местного применения ацетазоламида. Однако на сегодняшний день ни одна из этих разработок не получила широкого клинического распространения.

В 1950-х годах, наряду с ацетазоламидом, для применения в клинической практике были одобрены и другие системные САИ, включая **метазоламид**, **этоксзоламид** и **дихлорфенамид** [130–132]. Подобно своему более известному аналогу, эти соединения представляют собой неселективные САИ, демонстрирующие выраженный гипотензивный эффект при системном введении, но оказывающиеся неэффективными при местном применении из-за ограниченной способности проникать через роговичный барьер. Особого внимания заслуживает этоксзоламид, который стал ключевой молекулой в разработке современных местных ингибиторов карбоангидразы. Именно структурная модификация этоксзоламида позволила создать такие препараты, как бринзоламид и дорзоламид, обладающие улучшенными характеристиками проникновения в глазные ткани при местном применении [133]. Эти производные сохранили фармакологическую активность в отношении карбоангидразы, но приобрели свойства, необходимые для эффективной топической терапии.

Топические ингибиторы СА

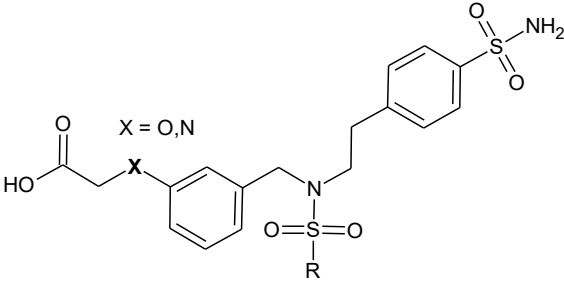
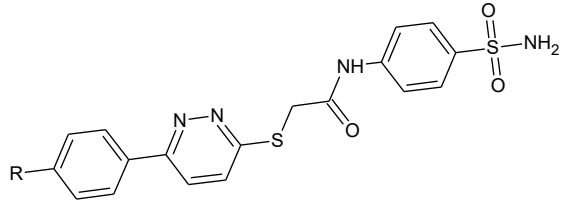
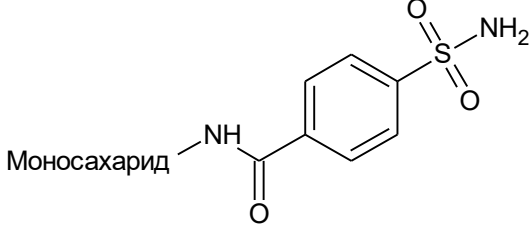
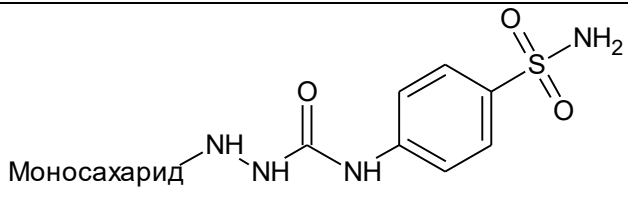
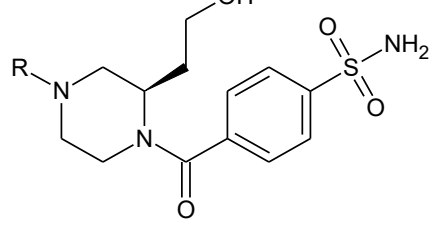
Дорзоламид (одобрен FDA в 1995 году) стал первым эффективным местнодействующим САИ и до сих пор является одним из двух, вместе с **бринзоламидом** (одобрен FDA в 1999 году), местных САИ, применяемыми в клинической практике [134]. Оба соединения проявляют наномолярную активность в отношении изоформ СА II и СА XII, обеспечивая значительное снижение внутриглазного давления при минимальных системных побочных эффектах по сравнению с пероральными формами ингибиторов карбоангидразы [135]. Типичные местные побочные реакции включают преходящее жжение, покалывание, гиперемию конъюнктивы, затуманивание зрения и зуд, что связано главным образом с низким pH этих препаратов [117]. Характерным системным проявлением является горький привкус во рту, обусловленный дренированием препарата через носослезный канал в ротоглотку, где он взаимодействует с СА VI в слюне и СА II, VI во вкусовых рецепторах [136]. Однако дорзоламид ассоциирован и с более серьезными нежелательными явлениями. В клинической практике зафиксированы случаи контактной аллергии, нефролитиаза, нарушений пищевого поведения (анорексия), психических расстройств (депрессия) и когнитивных нарушений [137–139]. Особую опасность препарат представляет для пациентов с предшествующей патологией роговицы, у которых может развиваться ее необратимая декомпенсация.

Новые разработки ингибиторов СА

За последние пять лет получено множество соединений с потенциальным антиглаукомным действием. Особое внимание исследователей сосредоточено на разработке ингибиторов СА II, что обусловлено их широким терапевтическим потенциалом не только в офтальмологии, но и при лечении других патологий, включая высокогорную болезнь, эпилепсию и отечные состояния. В пяти независимых исследованиях (Таблица 2.1) были разработаны и

протестированы на нормотензивных кроликах новые соединения -ингибиторы СА II. Все изученные вещества содержат критически важный для взаимодействия с ионом цинка в активном сайте карбоангидразы фенил-сульфонамидный фармакофор, который соединен через различные линкерные группы с основной молекулярной структурой.

Таблица 2.1. Новые ингибиторы hCA II и их влияние на ВГД.

| № | Структурная формула | hCA II Ki (nM) | ΔВГД макс. (мм.рт.ст.) | Ссылка |
|---|---|---------------------------|------------------------|--------|
| 1 |  | 1-122 | 11 | [140] |
| 2 |  | 0,6-10 | 7 | [141] |
| 3 |  | 9-270 (IC ₅₀) | 8 | [142] |
| 4 |  | 14-58 (IC ₅₀) | 7 | [143] |
| 5 |  | 4-445 | 7 | [144] |

Прямой корреляции между аффинностью по отношению к СА II и гипотензивным эффектом не наблюдается – так, в статье [140] наибольшее снижение ВГД (до 11 мм.рт.) демонстрирует соединение с Ki (hCA II) = 9,4 нМ, тогда как его аналоги со сравнимой аффинностью (4,5 и 7,7 нМ) показывают заметно более слабый гипотензивный эффект (5,7 и

6,7 мм.рт. соответственно) (Таблица 2.1, строка 1). Вероятно, в данном случае большой вклад в снижение ВГД вносит биодоступность соединения. Авторы статей [140–143] (Таблица 2.1, строки 3 и 4) используют моносахариды в качестве скаффолда для своих антиглаукомных соединений именно ради увеличения биодоступности и водорастворимости. Использование амидного или гидразидного линкеров приводит к схожим результатам как в аффинности к hCA II, так и в снижении ВГД. Любопытным решением проблемы биодоступности является биоизостерическая замена моносахаридного скаффолда на пиперазиновый фрагмент (Таблица 2.1, строка 5). Хотя в данном случае такая замена не привела к выраженному увеличению активности или эффективности, в статье [144] показано, что стереоизомеры, отличающиеся положением алкил-спиртовой группы, демонстрируют разную аффинность по отношению к карбоангидразам. Так для R-изомера наиболее активного соединения K_i (hCA II) = 4,4 нМ, а для S-изомера K_i (hCA II) = 320,7 нМ, в то время как в тестах *in vivo* наблюдался обратный эффект: максимальное снижение ВГД для R-изомера составляло 5 мм.рт., тогда как S-изомер демонстрировал снижение на 7 мм.рт. Таким образом, прямой корреляции между аффинностью по отношению к СА II и гипотензивным эффектом вновь не обнаружено.

Новые мультитаргетные ингибиторы СА и АСhe

Большая часть современных исследований направлена на разработку препаратов, демонстрирующих мультитаргетное действие. Наиболее популярным направлением остается создание ингибиторов карбоангидраз, но с дополнительным действием на ацетилхолинэстеразу (АСhe). В Таблице 2.2 представлено несколько соединений из современных работ, которые проявляют активность в отношении hCA II и АСhe, что при применении в терапии глаукомы потенциально позволяет снижать секрецию водянистой влаги и одновременно увеличивать её отток через трабекулярную сеть.

Таблица 2.2. Мультитаргетные ингибиторы hCA II и АСhe.

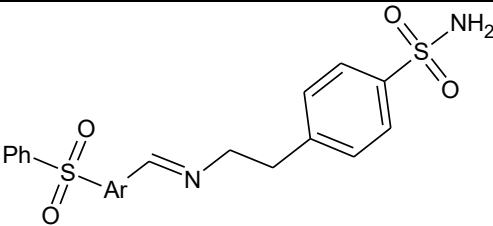
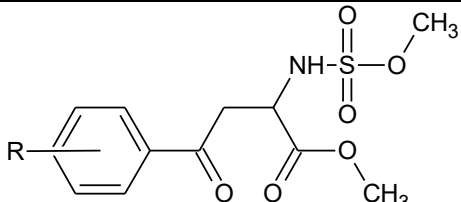
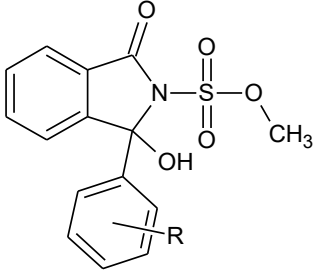
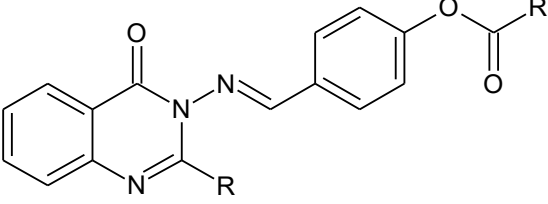
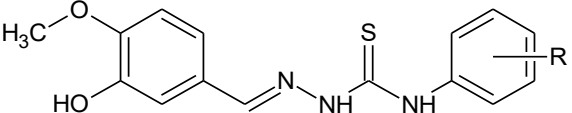
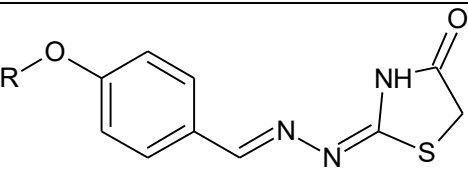
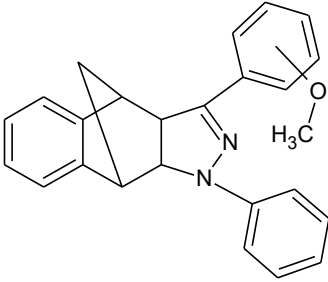
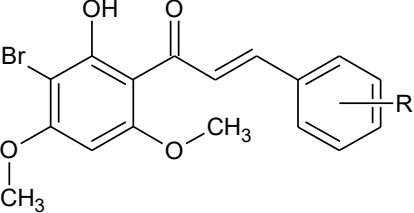
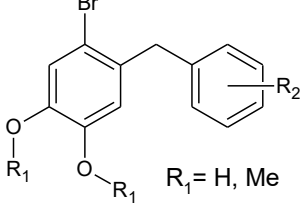
| № | Структурная формула | hCA II Ki (нМ) | АСhe Ki (нМ) | Ссылка |
|---|---|-------------------|-----------------|--------|
| 1 |  | 8-15 | 13-16 | [145] |
| 2 |  | >400 | >1000 | [146] |

Таблица 2.2 (продолжение). Мультицелевые ингибиторы hCA II и AChE.

| № | Структурная формула | hCA II Ki (nM) | AChE Ki (nM) | Ссылка |
|---|--|-------------------|-----------------|--------|
| 3 |  | >2000 | >2000 | [147] |
| 4 |  | 2-85 | 12-93 | [148] |
| 5 |  | 101-285 | 111-382 | [149] |
| 6 |  | 151-880 | >800 | [150] |
| 7 |  | 2-5 | 0,3-1 | [151] |
| 8 |  | 24-55 | 2-11 | [152] |
| 9 |  $R_1 = \text{H, Me}$ $R_2 = \text{Br, OH}$ | 2-15 | 7-25 | [153] |

Любопытно, что, хотя некоторые соединения (Таблица 2.2, строки 1-3) содержат стандартную для ингибиторов СА сульфонамидную группу, только у одного из них (Таблица 2.2, строка 1) сульфонамидный азот не замещен. Считается, что именно незамещенная сульфонамидная группа обеспечивает наилучшее связывание с ионом цинка в активном сайте СА, что косвенно подтверждается более высокой активностью первого соединения по сравнению со вторым и третьим (Таблица 2.2, строки 1-3).

В последнее время публикуется много исследований, посвященных созданию ингибиторов карбоангидраз на основе хиназолинонов [154,155], однако обычно в их структурах присутствуют фенилсульфонамидные фрагменты для связи с цинком в активном сайте СА. В Таблице 2.2 показаны примеры замещенных хиназолинонов и их биоизостеров, в структуре которых нет сульфонамидной группы, но которые демонстрируют аффинность к hCA II на уровне сульфонамидных производных (Таблица 2.2, строки 4-6). Судя по результатам молекулярного докинга [148,149], связывание с ионом цинка осуществляется с помощью спиртовых или сложноэфирных групп в фенильном кольце.

Это подтверждается высокой аффинностью к hCA II соединений с метоксифенильными фрагментами (Таблица 2.2, строки 7-9). И хотя испытаний по снижению этими соединениями ВГД пока не проводилось, их высокая аффинность к hCA II и AChE демонстрирует их высокий потенциал в качестве антиглаукомных соединений.

2.2.5. Холинергические препараты

Холинергические препараты, также известные как парасимпатомиметики или миотики, классифицируются на две основные группы в зависимости от механизма действия. К первой группе относятся препараты прямого действия, такие как пилокарпин и карбахол, которые структурно подобны ацетилхолину и непосредственно активируют мускариновые холинергические рецепторы. Вторая группа включает препараты непрямого действия, например физостигмин и эхотиофат, которые ингибируют фермент ацетилхолинэстеразу, тем самым повышая концентрацию эндогенного ацетилхолина в синаптической щели [156].

Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR), относящиеся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком, представлены пятью подтипами (M1-M5) с различной тканевой локализацией и функциональными особенностями [157]. В глазных структурах, включая цилиарную мышцу, радужную оболочку и трабекулярную сеть, преобладает подтип M3 [158]. Парасимпатомиметики прямого действия активируют эти рецепторы, что приводит к сокращению цилиарной мышцы, вызывает натяжение склеральной шпоры и расширение пространств трабекулярной сети, тем самым увеличивая отток водянистой влаги и снижая

внутриглазное давление [159]. Хотя теоретически такая стимуляция может уменьшать и увеосклеральный отток, клинически значимого эффекта в терапевтических дозах не наблюдается [160].

Парасимпатомиметики непрямого действия реализуют свой эффект через блокировку ацетилхолинэстеразы, что приводит к накоплению ацетилхолина и последующей стимуляции мускариновых рецепторов. Это вызывает характерные фармакологические реакции: усиление слезоотделения, сужение зрачка (миоз) и снижение внутриглазного давления через описанные выше механизмы [161].

Для терапии глаукомы используются следующие парасимпатомиметики: карбахол, демекариум, эхотиофат, пилокарпин и физостигмин (Рисунок 2.7).

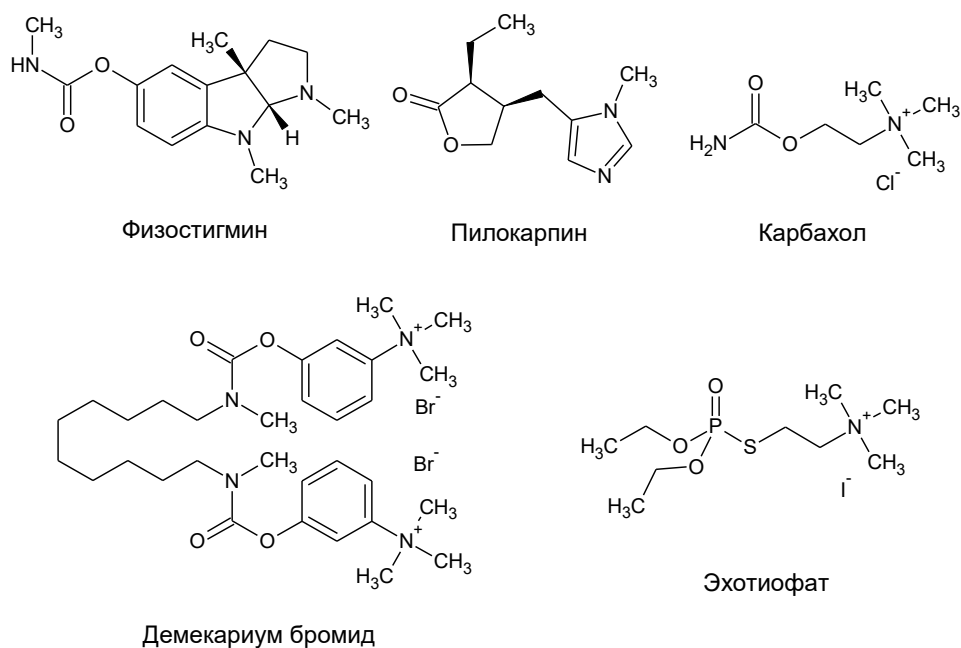


Рисунок 2.7. Парасимпатомиметики для терапии глаукомы.

Физостигмин представляет собой природный алкалоид, впервые выделенный из калабарских бобов (бобов Ордалии) в Нигерии в 1846 году. Исторически эти бобы использовались местным населением в качестве "суда божьего" - из-за крайней токсичности физостигмина употребление даже половины боба в сыром виде в большинстве случаев приводило к смерти, что считалось доказательством вины [162]. Будучи первым обнаруженным ингибитором холинэстеразы, физостигмин с 1860-х годов применяется в лечении глаукомы в составе экстракта. Этот обратимый ингибитор короткого действия блокирует как ацетилхолинэстеразу, так и менее специфичную бутирилхолинэстеразу, повышая концентрацию ацетилхолина. При применении физостигмина возможны серьезные побочные эффекты: брадикардия, желудочно-кишечные расстройства (рвота, диарея), гиперсекреция различных желез (пот, слюна, бронхиальный секрет), бронхоспазм, а при

передозировке - нервно-мышечная блокада с развитием паралича [163]. Однако в форме салицилата его токсичность значительно снижается, что позволяет использовать его в современной офтальмологической практике в случаях острой закрытоугольной глаукомы.

Пилокарпин (одобрен FDA в 1974 году) это алкалоид из листьев южноамериканских растений *Pilocarpus*, применяется в лечении глаукомы с 1870-х [164]. Как прямой парасимпатомиметик, он активирует мускариновые ацетилхолиновые рецепторы и особенно эффективен при острых приступах закрытоугольной глаукомы, способствуя оттоку водянистой влаги через расширение угла передней камеры и канала Шлемма [165]. Хотя пилокарпин менее токсичен, чем физостигмин, он также может вызывать бронхоспазм, гипотензию и абдоминальные колики [90].

Карбахол (одобрен FDA в 1972 году) является парасимпатомиметиком прямого действия, как и пилокарпин, но в отличие от него является синтетическим аналогом холина [166]. Благодаря химической модификации молекулы, карбахол демонстрирует значительно большую стабильность в биологических тканях и медленнее подвергается ферментативному гидролизу, что обеспечивает его пролонгированное фармакологическое действие по сравнению с природными парасимпатомиметиками [167,168]. Карбахол может вызывать выраженный миоз, спазм аккомодации, болевые ощущения в глазном яблоке и даже увеит, а при системной абсорбции - типичные холинергические реакции: брадикардию, бронхоспазм, усиленную перистальтику кишечника [90,169]. Фармакокинетические особенности карбахола делают его применение оправданным в случаях, когда требуется пролонгированный гипотензивный эффект. Однако высокий риск побочных реакций существенно ограничивает его использование в современной офтальмологической практике, особенно при наличии альтернативных методов лечения.

Среди ингибиторов холинэстеразы длительного действия выделяются **демекариум бромид** (одобрен FDA в 1982 году) и **эхотиофат** (одобрен FDA в 1960 году). Демекариум, сохраняющий значение преимущественно в ветеринарной практике (для лечения глаукомы у собак), является обратимым ингибитором с высокой специфичностью к ацетилхолинэстеразе [170,171]. Эхотиофат же образует необратимую ковалентную связь с ферментом, обеспечивая эффект продолжительностью до недели, но вызывая множество побочных реакций: от местного раздражения до миопии и мышечных подергиваний [172]. Эти препараты редко применяются в современной офтальмологии из-за выраженных нежелательных эффектов.

2.2.6. Ингибиторы Rho-киназы

Цитоскелет клетки, состоящий из микротрубочек, актиновых филаментов и промежуточных филаментов, играет ключевую роль в поддержании клеточной

архитектоники, механизмах адгезии и подвижности. Особое значение в регуляции цитоскелетных перестроек принадлежит Rho-киназе (ROCK), представленной в виде двух изоформ ROCK1 и ROCK2, причем обе экспрессируются в трабекулярной сети. ROCK опосредует свои эффекты через сигнальный каскад Rho. Этот путь включает активацию Rho-ГТФазы с последующей модуляцией ее эффекторов - легкой цепи миозина, LIM-киназы и кофилина [173].

Ингибиторы Rho-киназы вызывают деполимеризацию актиновых филаментов, что приводит к серии физиологических изменений, способствующих улучшению оттока водянистой влаги через традиционный путь (канал Шлемма и трабекулярную сеть). Основные механизмы этого процесса включают релаксацию гладкомышечных элементов, уменьшение отложения компонентов внеклеточного матрикса в трабекулярной сети и расширение межклеточных пространств в юстаканаликулярной зоне (наружная части трабекулярной сети, прилегающая к каналу Шлемма) [174]. Важно отметить, что такой механизм снижения внутриглазного давления принципиально отличается от действия других классов антиглаукомных препаратов, поскольку направлен непосредственно на уменьшение сопротивления в трабекулярной сети.

Помимо гипотензивного действия, ингибиторы ROCK демонстрируют многочисленные дополнительные терапевтические эффекты. Они обеспечивают защиту клеток трабекулярной сети от повреждающего действия окислительного стресса, улучшают перфузию зрительного нерва, проявляют нейропротекторную активность в отношении ГКС, способствуют регенерации роговичного эндотелия и даже уменьшают рубцовые процессы после антиглаукомных хирургических операций [175]. Такой уникальный спектр фармакологических свойств делает ингибиторы Rho-киназы перспективными препаратами для комплексного лечения глаукомы, воздействующими одновременно на несколько звеньев патогенеза этого многофакторного заболевания.

Rho-киназы являются самой новой мишенью для терапии глаукомы, так что на текущий момент в антиглаукомных препаратах используют всего два ингибитора ROCK: нетарсудил, рипасудил (Рисунок 2.8).

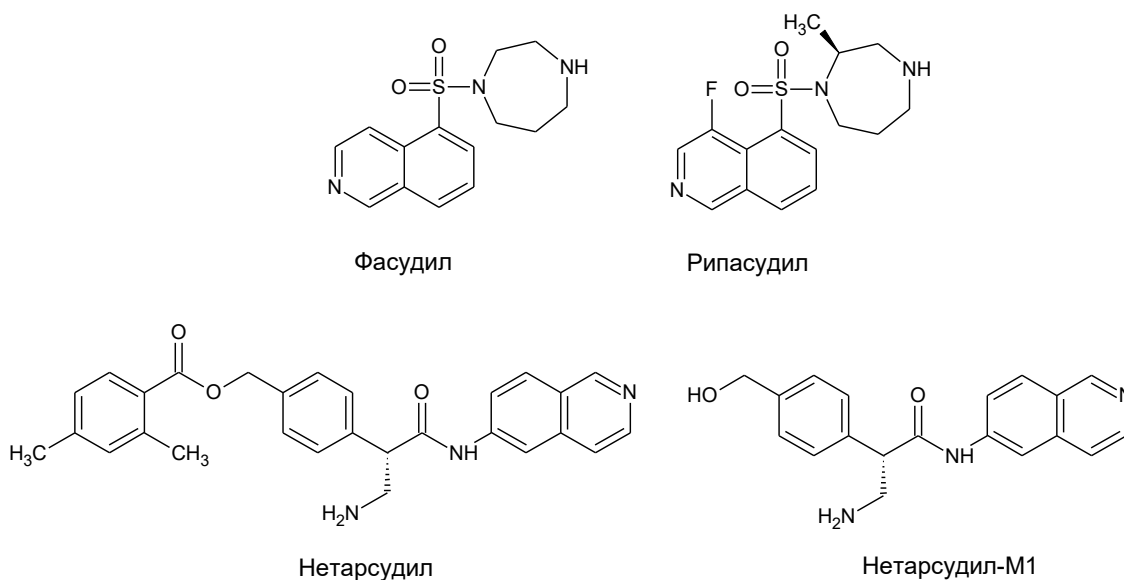


Рисунок 2.8. Ингибиторы ROCK для терапии глаукомы.

Гипотензивный эффект ингибиторов ROCK впервые был обнаружен у **фасудила** - мощного ингибитора ROCK, одобренного в Японии в 1995 году для лечения церебрального вазоспазма после субарахноидальных кровоизлияний. Хотя единственное клиническое исследование на ограниченной выборке продемонстрировало безопасность местного применения фасудила у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и офтальмогипертензией, этот препарат не получил широкого распространения в офтальмологической практике [176].

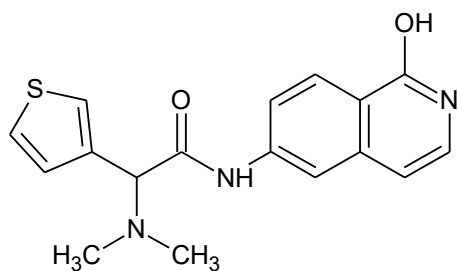
Рипасудил, фторированный аналог фасудила, был одобрен в Японии в 2014 году в качестве антиглаукомного препарата. Однако его более широкое внедрение ограничивается несколькими факторами: отсутствием масштабных сравнительных исследований с существующими стандартами терапии, а также относительно умеренным гипотензивным эффектом [173]. В отношении безопасности рипасудил демонстрирует благоприятный профиль системной переносимости, не вызывая значимых системных побочных эффектов. Однако местные реакции встречаются достаточно часто и включают конъюнктивальную гиперемию (наиболее распространенный эффект), блефарит и аллергический конъюнктивит [177]. Эти офтальмологические побочные явления, хотя и не представляют серьезной угрозы для здоровья, могут существенно влиять на качество жизни пациентов и приверженность лечению.

Нетарсудил (одобрен FDA в 2017 году) является единственным одобренным FDA, а позже и EMA (в 2021 году) антиглаукомным ингибитором ROCK [173]. Этот представитель класса аминоксанолинамидов структурно отличается от фасудила и рипасудила и демонстрирует наибольшую эффективность в регуляции ВГД среди своих биоизостеров. Механизм действия нетарсудила включает увеличение трабекулярного оттока за счет расширения

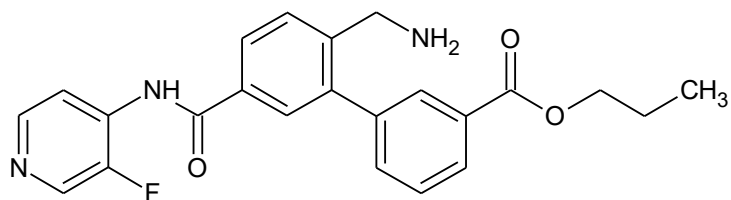
межтрабекулярных пространств, увеличения площади фильтрации и дилатации эписклеральных вен [178]. Кроме того, нетарсудил также является ингибитором транспорта норадреналина, что, вероятно, приводит к его дополнительному действию на секрецию водянистой влаги [179,180]. В исследованиях *in vitro* было показано, что нетарсудил является наиболее активным ингибитором ROCK среди всех препаратов данного класса. Интересно, что его основной метаболит (нетарсудил-М1) проявляет в 5 раз большую активность в отношении Rho-киназы, чем исходное соединение, обеспечивая пролонгированный эффект [181]. Несмотря на выраженный гипотензивный эффект, нетарсудил имеет существенные ограничения в применении из-за частых побочных реакций. Более 50% пациентов отмечают конъюнктивальную гиперемию, у 25% развивается вертициллыта роговицы, а у 15-20% наблюдаются конъюнктивальные кровоизлияния [182,183]. Такой профиль безопасности приводит к более высокой частоте отмены препарата по сравнению с традиционными средствами, такими как тимолол, что ограничивает его широкое клиническое применение.

Новые ингибиторы ROCK для терапии глаукомы

Среди прошедших доклинические испытания антиглаукомных ингибиторов ROCK стоит отметить **веросудил**, также известный под шифром AR-12286, и **совесудил** (RHP-201, АМА0076) (Рисунок 2.9). Оба соединения являются высокоселективными ингибиторами ROCK и перешли на третью фазу клинических испытаний в 2024 и 2021 году соответственно. Веросудил в клинических испытаниях второй фазы в 2010 году показал снижение ВГД на 28% у пациентов с глаукомой в концентрации 0,25% после двукратного ежедневного приема, однако дальнейшие исследования были заморожены и лишь недавно началась третья фаза клинических испытаний, о результатах которой пока не сообщалось [184,185]. Совесудил же в свою очередь исследовался на пациентах с открытоугольной глаукомой и по результатам второй фазы продемонстрировал снижение ВГД на 3,7 мм.рт.ст. при применении трижды в день в концентрации 0,5%, причем не было зарегистрировано ни одного системного побочного эффекта [186]. Третья фаза клинических испытаний завершена в 2023 году, но её результаты недоступны.



Веросудил (AR-12286)



Совесудил (PHP-201)

Рисунок 2.9. Новые ингибиторы ROCK для терапии глаукомы.

Также в 2023 году вторую фазу клинических испытаний прошел мультикиназный ингибитор **H-1337** [187]. Известно, что структура этого соединения состоит из изохинолина с сульфонамидным фрагментом, однако детали строения не раскрываются. В ходе испытаний было показано, что H-1337 способен снижать ВГД на 30% и более и хорошо переносился пациентами. Это соединение ингибирует сериновые/треониновые киназы, в том числе ROCK и протеинкиназы B [188]. Именно с действием на ROCK связывают гипотензивные свойства H-1337.

Исследования новых ингибиторов ROCK ведутся весьма активно, в том числе и ради создания новых антиглаукомных препаратов. В качестве примера можно привести исследование 2021 года, в котором была получена серия ингибиторов ROCK, обладающих ярко выраженным гипотензивным действием (Рисунок 2.10) [189].

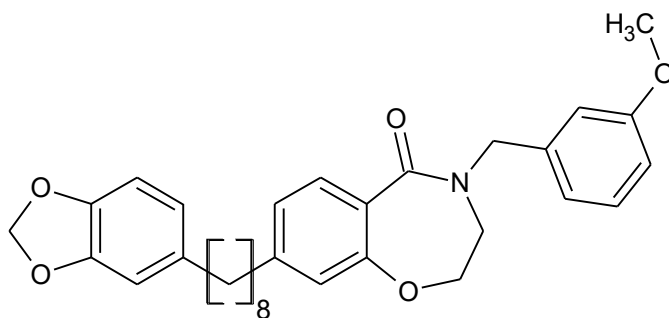


Рисунок 2.10. Структура наиболее активного соединения из работы [189].

В данной работе исследователи провели анализ существующих ингибиторов ROCK и выделили три важных фрагмента, каждый из которых изучили отдельно, модифицируя функциональные группы, изменяя длину линкера и подбирая наиболее эффективный скаффолд. В результате ими была получена серия биологически активных соединений, ингибирующих ROCK 1 и 2 в наномолярном диапазоне ($IC_{50} = 93$ нМ и 3 нМ соответственно для лучшего из полученных биоизостеров, структурная формула которого указана на Рисунке 2.10), улучшив аффинность изначального соединения-хита более чем в 20 раз. Также было показано, что наиболее аффинное соединение понижает ВГД нормотензивных кроликов на

34,3%. Таким образом, создание новых ингибиторов ROCK для терапии глаукомы является актуальным и перспективным направлением.

2.2.7. NO-доноры

Оксид азота (NO) и его вторичный посредник циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) играют ключевую роль в регуляции физиологических процессов в глазных тканях. Эти молекулы участвуют в контроле динамики водянистой влаги, нейротрансмиссии в сетчатке и процессах фототрансдукции. В норме синтез NO осуществляется двумя конститутивными изоформами NO-синтазы (NOS): нейрональной (nNOS, NOS-1) и эндотелиальной (eNOS, NOS-3), которые продуцируют небольшие количества NO (от пико- до наномолярных концентраций) в ответ на повышение внутриклеточного кальция. При патологических состояниях, таких как воспаление или ишемия, активируется индуцируемая форма NOS (iNOS, NOS-2), способная генерировать микромолярные и миллимолярные концентрации NO независимо от уровня кальция [190].

В здоровом глазу eNOS экспрессируется в эндотелии увеальных сосудов, трабекулярной сети, канале Шлемма и цилиарном теле, тогда как nNOS обнаруживается в нервных волокнах лимба, роговицы и эпителия хрусталика. iNOS присутствует в радужке, цилиарном теле и сосудистой сети, причем ее экспрессия значительно усиливается в трабекулярной сети при повышении перфузионного давления [191]. NO участвует в регуляции апоптоза клеток, тонуса сосудов и воспалительных реакций через механизм S-нитрозилирования белков, таких как GAPDH [192].

Дисбаланс в системе NO/цГМФ может способствовать развитию различных глазных патологий, включая воспалительные заболевания (увеит, ретинит) и дегенеративные процессы (глаукома, дистрофии сетчатки) [190]. Повышенная продукция NO через iNOS при патологических состояниях может оказывать как защитное, так и повреждающее действие на ГКС и глазной нерв, что зависит от концентрации NO и длительности его воздействия [193,194]. Эти данные подчеркивают важность точной регуляции NO-зависимых процессов для поддержания гомеостаза глазных тканей и потенциальные терапевтические возможности модуляции этой системы при различных офтальмологических заболеваниях.

Исследования влияния NO-доноров на внутриглазное давление проводились на различных животных моделях, включая мышей, кроликов, собак и обезьян. Установлено, что местное применение таких соединений, как нитроглицерин, ISDN, нитрит натрия и нитропруссид натрия, вызывает быстрое снижение ВГД [195–197]. Основным механизмом этого эффекта связан с воздействием на традиционный путь оттока водянистой влаги, хотя отмечается и некоторое влияние на процессы ее секреции.

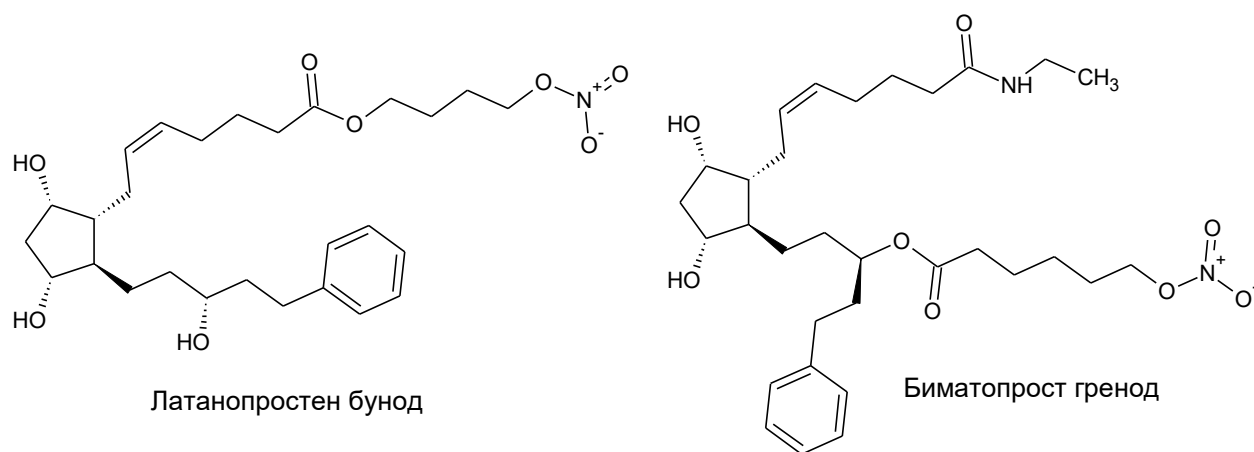


Рисунок 2.11. NO-доноры для терапии глаукомы.

Единственным одобренным FDA (в 2017 году) NO-донором для лечения глаукомы в настоящее время является **латанопростен бунод** (Рисунок 2.11). Это соединение является двойным лекарством и после инстилляций гидролизуется с образованием кислотной формы латанопроста (аналог простагландина F2 α) и 1,4-бутандиолмононитрата, который в дальнейшем распадается на 1,4-бутандиол и оксид азота (NO) [198]. Таким образом, механизм действия латанопростен бунода включает два параллельных процесса. Латанопрост стимулирует FP-рецепторы, что приводит к активации матриксных металлопротеиназ и последующему ремоделированию внеклеточного матрикса в цилиарной мышце, усиливая увеосклеральный отток. Одновременно высвобождаемый NO активирует растворимую гуанилатциклазу в клетках трабекулярной сети, увеличивая продукцию цГМФ и вызывая релаксацию этих структур, что улучшает традиционный путь оттока [199].

Клинические исследования продемонстрировали, что латанопростен бунод превосходит по эффективности как стандартный латанопрост, так и тимолол в монотерапии глаукомы, обеспечивая более выраженное и стабильное снижение ВГД [200,201]. Однако комбинированный механизм действия может ассоциироваться с несколько более высокой частотой местных побочных реакций по сравнению с латанопростом, включая гиперемию конъюнктивы и пигментные изменения переднего отрезка глаза [202].

Также стоит упомянуть еще один NO-донор, в основе которого лежит структура другого аналога простагландина – биматопроста. **Биматопрост гренод** (Рисунок 2.11), известный под шифром **NCX 470**, после проникновения через роговицу под действием эстераз расщепляется на активные метаболиты: биматопрост, который является агонистом рецептора простагландина F2 α , и 6-(нитроокси)гексановую кислоту, являющуюся донором NO. Гипотензивный эффект NCX 470 превышает таковой у биматопроста и латанопроста, а его профиль безопасности такой же, как и у других аналогов простагландина [203,204]. Сейчас

NCX 470 проходит третью стадию клинических испытаний и, возможно, вскоре станет вторым представителем класса NO-доноров, одобренным для применения в терапии глаукомы.

Новые NO-доноры для терапии глаукомы

Также за последние 5 лет особое место в дизайне разнообразных лекарственных средств заняли гибридные молекулы на основе NO-доноров. Так в статье [205] осуществлен синтез аналогов антиглаукомного ингибитора ROCK нетарсудила с NO-донорными группами (Рисунок 2.12).

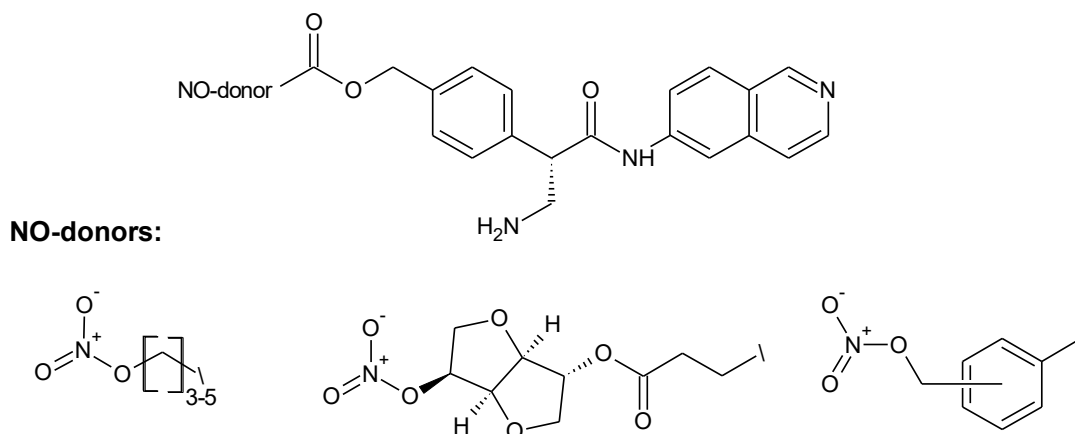


Рисунок 2.12. Структуры гибридных антиглаукомных соединений на основе нетарсудила с NO-донорными фрагментами.

Полученные соединения показали сравнимую и даже большую аффинность к ROCK 1 и 2 ($IC_{50} = 1,26-35,41$ нМ и $0,66-25,34$ нМ соответственно), чем нетарсудил ($IC_{50} = 13,18$ нМ и $10,18$ нМ соответственно). Также на кроличьей модели острой глазной гипертензии, вызванной метилцеллюлозой было показано, что полученные соединения снижают ВГД аналогично нетарсудилу - на 20% от исходного. Кроме того, полученные соединения демонстрировали защитное действие по отношению к ГКС, так же, как и нетарсудил. В результате, хотя аффинность гибридных молекул к ROCK была выше, чем у нетарсудила, их биологический эффект оказался таким же.

В исследовании [206] были синтезированы антиоксиданты с NO-донорной группой для терапии глаукомы, предназначенные не только для снижения ВГД, но и для защиты ГКС от активных форм кислорода (Рисунок 2.13).

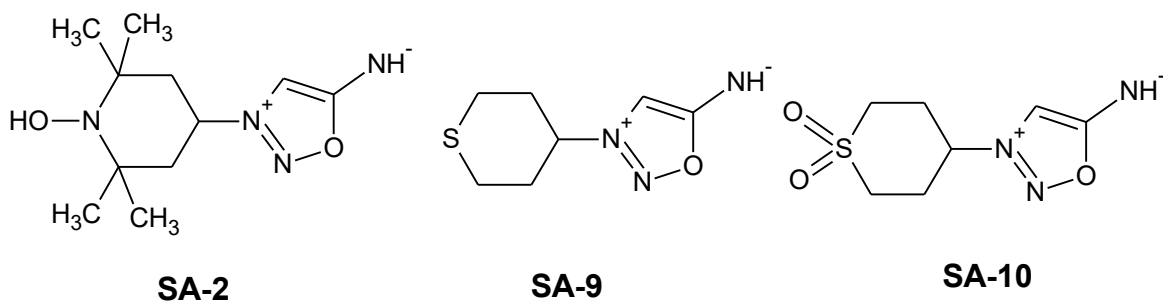


Рисунок 2.13. Структуры гибридных антиглаукомных соединений, сочетающих антиоксидантный и NO-донорный фрагменты.

Ранее в этой научной группе уже проводились подобные исследования и было синтезировано новое бифункциональное гибридное соединение SA-2, обладающее как NO-донорной, так и антиоксидантной активностью [207]. Было показано, что соединение SA-2 обладает нейропротекторными свойствами как при гипоксическом поражении эксплантатов сетчатки взрослых крыс *ex vivo*, так и при повреждении зрительного нерва мыши *in vivo*, а также снижает ВГД в глазах грызунов. Основываясь на структурах простых сиднониминов (NO-донорных аналогов нитратов), исследовали два новых серосодержащих соединения: SA-9 и его активный окисленный метаболит, SA-10. В исследовании показан высокий потенциал полученных соединений в удалении супероксидных и хлорноватистых радикалов. Также был оценен гипотензивный эффект наночастиц SA-9 на мышинной модели глазной гипертензии, вызванной дексаметазоном – максимальное снижение ВГД составило 61%, причем препарат снижает ВГД практически до уровня контроля. Таким образом, синтез новых гибридных соединений с NO-донорными группами является перспективным направлением, которое может позволить получить более эффективные антиглаукомные препараты.

2.3. Новые мишени для антиглаукомных препаратов

Мишеней, так или иначе связанных с терапией глаукомы (через снижение ВГД или защиту ГКС) великое множество – по некоторым данным, их более 2700 [7]. Далее мы коснемся нескольких наиболее перспективных, лиганды которых уже были исследованы в качестве антиглаукомных средств.

2.3.1. Аденозиновые рецепторы

Аденозин (Рисунок 2.14) представляет собой эндогенный нуклеозидный модулятор, который секретируется практически всеми типами клеток. Аденозиновые рецепторы (AR), относящиеся к семейству G-белок-сопряженных, играют ключевую роль в регуляции фундаментальных физиологических процессов, включая поддержание энергетического баланса, оксигенацию и метаболизм питательных веществ. При гипоксических и других

стрессовых условиях наблюдается повышение внеклеточной концентрации аденозина, который взаимодействует с четырьмя известными подтипами рецепторов (A1, A2A, A2B и A3). Три из этих подтипов (A1, A2A и A3) рассматриваются как перспективные терапевтические мишени для лечения глаукомы. Механизмы гипотензивного действия через аденозиновые рецепторы разнообразны, но преимущественно связаны с модуляцией хлоридных каналов в пигментированных клетках цилиарного эпителия (через A3-рецепторы, регулирующие секрецию водянистой влаги) или с изменениями клеточного объема и ремоделированием внеклеточного матрикса трабекулярной сети (через A1 и A2A рецепторы, влияющие на отток) [208–210].

В последние годы синтезировано множество соединений, модулирующих активность аденозиновых рецепторов и демонстрирующих значительный гипотензивный эффект. Однако ключевой проблемой в их разработке является видозависимость фармакологического ответа. Один и тот же агонист A3-рецепторов может снижать ВГД у человека, но повышать его у мышей, или наоборот [211]. Это существенно осложняет доклинические исследования, поскольку данные, полученные на животных моделях, не всегда коррелируют с ожидаемым эффектом у пациентов.

Несмотря на эти сложности, некоторые соединения достигли стадии доклинических испытаний. Наиболее известным представителем является **трабоденосон** (INO-8875, PJ-875), который продолжает изучаться как потенциальный антиглаукомный препарат, действующий через аденозиновые рецепторы.

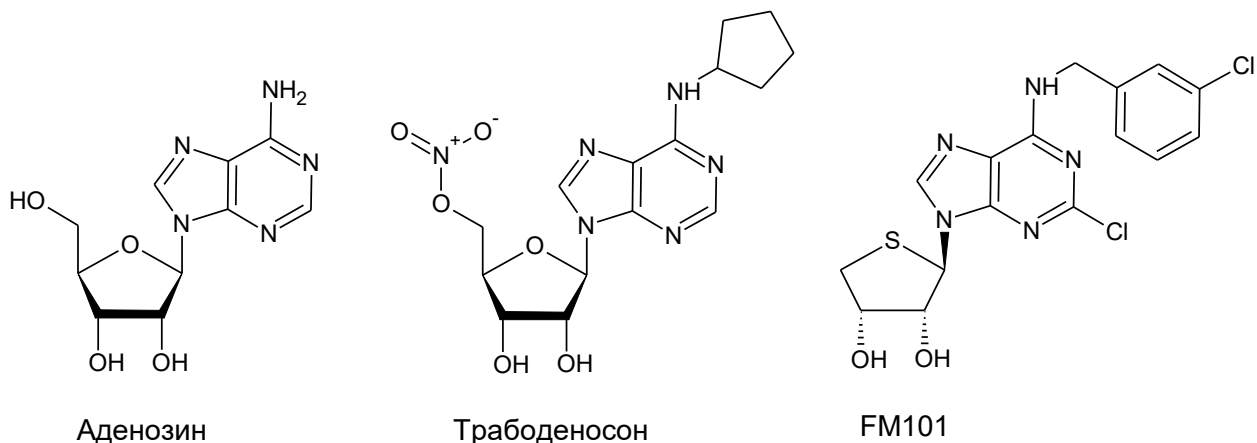


Рисунок 2.14. Ингибиторы аденозиновых рецепторов для терапии глаукомы.

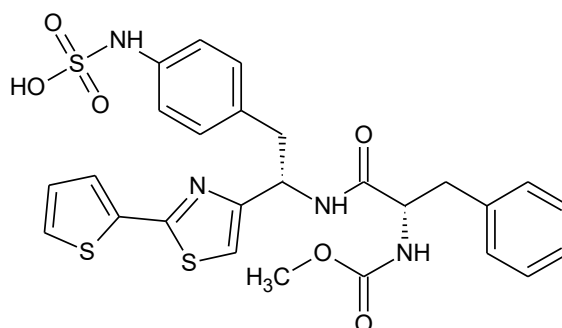
Трабоденосон – частичный агонист рецепторов A1 и NO-донор. По результатам второй фазы клинических испытаний было показано, что трабоденосон хорошо переносился, был безопасен и приводил к значительному (20–25%) снижению ВГД у взрослых с гипертиреозом или первичной открытоугольной глаукомой, однако в 2017 году трабоденосон провалил третью фазу клинических испытаний из-за того, что не достиг первичной конечной точки

(снижение ВГД в сравнении с плацебо в течение трех месяцев) [212]. Предпринимались также попытки создания антиглаукомных препаратов на основе модуляторов рецепторов A2A и A3. **ОРА-6566** – агонист рецепторов A2A, проходивший вторую фазу клинических испытаний в 2011 году, однако её результаты так и не были опубликованы, как и структура соединения, а в 2019 году компания, разработавшая ОРА-6566, объявила о прекращении клинических испытаний ОРА-6566 для лечения глаукомы и глазной гипертензии в США [208]. **FM101** – антагонист рецепторов A3, который в 2022 году также проходил вторую стадию клинических испытаний. Препарат продемонстрировал эффективность и низкую токсичность ($LD_{50} > 2000$ мг/кг), однако текущий статус его исследований остаётся неизвестным [213].

2.3.2. Сигнальный путь ангиопоэтин/Tie

Ангиопоэтины 1 и 2 (Ang1,2) – белковые факторы роста, являющиеся в том числе первичными лигандами тирозинкиназы с иммуноглобулинподобным и эпидермальным фактором роста (EGF)-подобным доменами 2 (Tie2). Путь Ang-Tie2 контролирует созревание и стабилизацию сосудов, поэтому его нарушение может привести к проблемам при развитии сердечно-сосудистой системы, дефектам созревания лимфатической системы, а также к нарушению целостности канала Шлемма, что негативно влияет на регуляцию ВГД. Таким образом, нарушения в работе сигнального пути Ang-Tie2 могут являться одной из причин возникновения врожденной глаукомы [214].

Сосудистая эндотелиальная тирозинфосфатаза (VE-PTP, также известная как PTPRB), в значительной степени специфична для эндотелия, в том числе, VE-PTP экспрессируется в эндотелиальных клетках канала Шлемма. Она влияет на стабильность эндотелиального соединения, регулируя активность Tie2. Ингибирование VE-PTP активирует сигнальный путь Ang-Tie2, что приводит к расслаблению трабекулярной сети и увеличению оттока глазной жидкости [215].



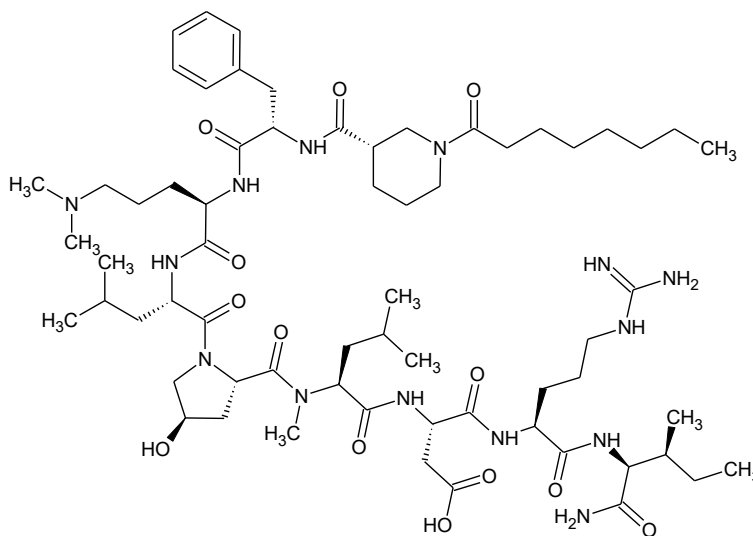
Разупротафиб

Рисунок 2.15. Структура антиглаукомного соединения разупротафиба.

На сегодняшний день наиболее известным ингибитором VE-PTP, предназначенным для терапии глаукомы, является **разупротафиб** (также известен под шифром АКВ9778) (Рисунок 2.15) [216,217]. В 2020 году разупротафиб прошел вторую фазу клинических испытаний, в которой показал, что при применении два раза в день (с одновременным применением латанопроста единожды в день вечером) оказывает дополнительное гипотензивное действие, превышающее эффект латанопроста, снижая ВГД на 7,95 мм.рт.ст, (в сравнении с 7,04 мм.рт.ст. для латанопроста). Никакой информации о начале третьей фазы испытаний пока нет.

2.3.3. Рецепторы натрийуретического пептида типа C

В человеческом организме встречаются три вида натрийуретических пептидов: предсердный натрийуретический пептид (ANP), мозговой натрийуретический пептид (BNP) и натрийуретический пептид типа C (CNP). Также существует три типа рецепторов натрийуретических пептидов, лишь два из которых генерируют циклический цГМФ – рецепторы ANPA и ANPB. Как было сказано выше, соединения, повышающие клеточную концентрацию цГМФ (например, NO), оказывают нейропротекторное действие и снижают ВГД [218,219]. Рецепторы ANPA демонстрируют высокое сродство к ANP и BNP, а рецепторы ANPB – к CNP. Известно, что каждый из трех натрийуретических пептидов при внутриглазном введении незначительно снижает ВГД, однако их использование для терапии глаукомы ограничено неспособностью проникать через роговицу глаза при топическом применении [220]. Также было показано, что CNP, в отличие от ANP, обеспечивает нейропротекторное действие против NMDA-индуцированной гибели ГКС, что сделало именно этот пептид наиболее привлекательной основой для дальнейшей модификации [221].



TAK-639

Рисунок 2.16. Структура антиглаукомного пептидомиметика TAK-639.

ТАК-639 (Рисунок 2.16) – пептидомиметик, действующий на ANPB, который в 2020 году прошел первую фазу клинических испытаний в качестве противоглаукомного препарата [222]. Он представляет из себя синтетический аналог CNP, состоящий из девяти аминокислот и, в отличие от своего предшественника, способный проникать через роговицу. ТАК-639 является селективным агонистом ANPB, вызывая полную активацию рецептора с $EC_{50} = 61 \pm 3$ nM, и способен снижать ВГД нормотензивных мышей на 36,1% (по сравнению с 30% для тимолола) без побочных эффектов. На сегодняшний день это первый и единственный пептидомиметик, дошедший до клинических испытаний в качестве антиглаукомного препарата.

2.3.4. Сероводород

В организме продуцируются три основные молекулы газа – оксид азота (NO), оксид углерода (CO) и сероводород (H_2S). В определенном диапазоне концентраций H_2S играет важную роль в нервной системе человека, сосудистой системе и иммунной системе [223]. В центральной нервной системе H_2S присутствует в высоких концентрациях и оказывает защитное действие на нейроны, модулируя окислительный стресс и воспалительные реакции, противодействуя апоптозу, а также действуя как васкулопротекторный фактор. В периферической нервной системе доказано, что H_2S защищает ГКС при различных патологических состояниях, таких как диабетическая ретинопатия, нейротоксичность, вызванная NMDA, и ишемическое состояние [224]. Также вещества, продуцирующие H_2S , ингибируют симпатическую нейротрансмиссию в радужно-цилиарных телах посредством калиевых АТФ каналов и, следовательно, расслабляют цилиарную мышцу радужки и диастолическую гладкую мускулатуру сосудов глаза, косвенно влияя на снижение ВГД [225]. Расширяя кровеносные сосуды, H_2S улучшает приток крови, кислорода и метаболитов к сетчатке, а также стабилизирует гемодинамику сетчатки, тем самым модулируя окислительный стресс в сетчатке при глаукоме.

Большинство исследований, направленных на синтез H_2S -доноров с антиглаукомными свойствами, используют мультитаргетный подход. Например, в недавнем исследовании известные антиглаукомные препараты – бринзоламид (ингибитор СА) бетаксолол (β -адреноблокатор) и бримонидин (α -адреномиметик) – были соединены через эфирную или сложноэфирную связи с фенолом с H_2S -донорной группой в пара-положении (Рисунок 2.17) [226].

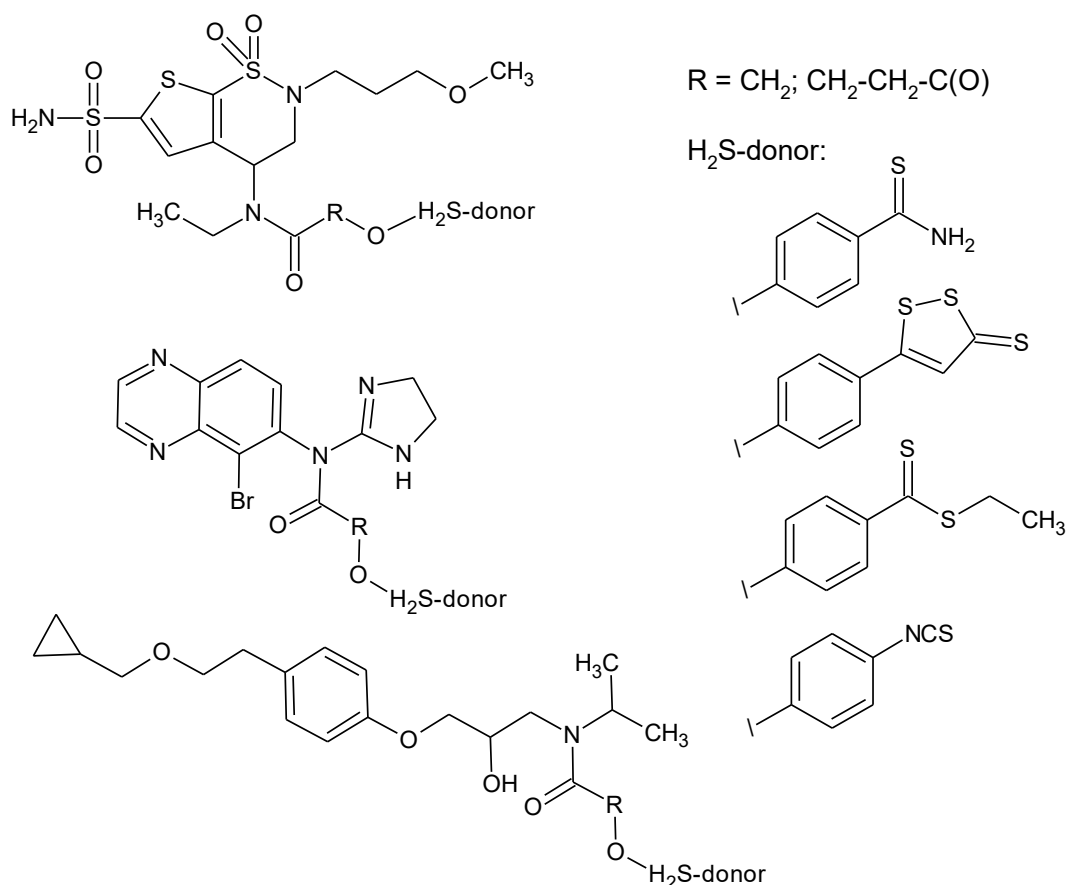


Рисунок 2.17. Гибридные H₂S-доноры на основе известных препаратов для терапии глаукомы.

Полученные гибридные соединения были исследованы на способность выделять H₂S. Все они, кроме производных бетаксолола, выделяли терапевтически значимые количества H₂S, как в водном растворе (в присутствии L-Cys), так и во внутриклеточной среде. К сожалению, влияние модификаций на аффинность соединений к соответствующим мишеням, а также гипотензивные свойства гибридов не исследовались в данной работе.

2.3.5. Каннабиноидные рецепторы

Строго говоря, каннабиноидные рецепторы не являются новой мишенью для терапии глаукомы. Влияние модуляторов каннабиноидных рецепторов на ВГД известно с 1970-ых годов [227], но в последнее время на каннабиноиды обращено пристальное и научное внимание, так что тема остается актуальной.

Эндоканнабиноидная система (ECS) включает в себя эндогенные каннабиноиды (eCB), каннабиноидные рецепторы и белки, которые транспортируют, синтезируют и разрушают eCB. Внутри глаза ECS обнаруживается в различных глазных структурах, включая роговицу, конъюнктиву, сетчатку и различные клетки, такие как ГКС, цилиарное тело и трабекулярную сеть, так что её активация может модулировать различные функции, включая воспаление, ВГД, нейротрансмиссию, фоторецепцию и сосудистую регуляцию. Классические

каннабиоидные рецепторы CB1 и CB2 являются естественными рецепторами для eCB и могут взаимодействовать с фитоканнабиноидами и синтетическими каннабиноидами. Активация этих рецепторов приводит как к снижению секреции водянистой влаги, так и к увеличению её оттока посредством нескольких механизмов. Наиболее явным из них является регуляция калиевых и кальциевых каналов, опосредованная рецептором CB1 [228]. Другими механизмами, которые способствуют снижению ВГД, являются сокращение цилиарной мышцы и снижение секреции из цилиарного отростка за счет уменьшения высвобождения норадреналина. Также рецепторы CB1 и CB2 отвечают за функциональную модуляцию нейроретинальных клеток в тканях животных и, следовательно, могут быть потенциальной мишенью для нейропротекции.

Известно, что пероральное, внутривенное и ингаляционное введение как фитоканнабиноидов, так и их синтетических аналогов пациентам с глаукомой способно вызвать существенное снижение ВГД на 10-60% в зависимости от способа введения, дозы и других факторов. Однако при таких способах введения наблюдаются общеизвестные побочные эффекты, такие как: эйфория, головокружение, спутанность сознания и предобморочные симптомы. Также употребление каннабиноидов негативно сказывается на сердечно-сосудистой, офтальмологической, легочной, желудочно-кишечной, печеночной, почечной, дерматологической и мышечной системах [229]. Решением данной проблемы стало бы их топические применение, однако на сегодняшний день местное применение каннабиноидов продолжает сталкиваться с ограничениями, связанными, в основном, с их низкой водорастворимостью. Обычно данные проблемы решают с посредством различных способов доставки (циклодекстрины, наночастицы) или создания пролекарств [230].

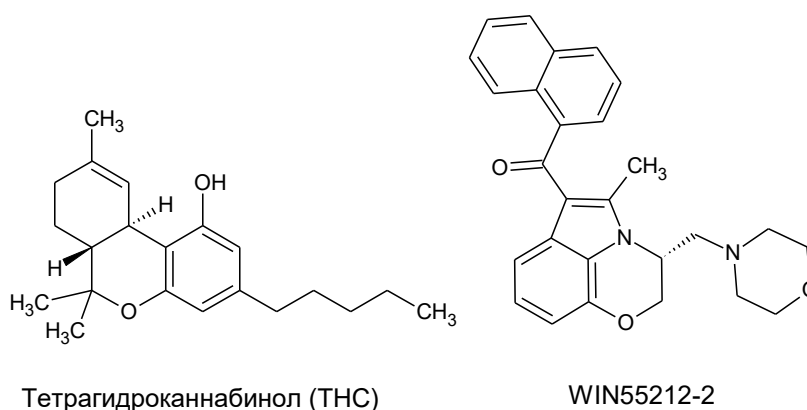


Рисунок 2.18. Структуры агонистов каннабиноидных рецепторов.

Например, применение синтетического селективного агониста CB1-рецептора **WIN55212-2** (Рисунок 2.18) в сочетании с гидроксипропил- β -циклодекстрином привело к эффекту снижения ВГД у пациентов с глаукомой на 31% [231]. Создание пролекарства на основе тетрагидроканнабинола (THC), фитоканнабиоида и неселективного агониста

каннабиноидных рецепторов, также позволило преодолеть некоторые трудности в использовании этого класса препаратов для терапии глаукомы [232]. Кроме того, использование ТНС-валин-гемисукцината (ТНС-VHS) в виде твердых липидных наночастиц позволило заметно увеличить длительность действия препарата при тестировании на нормотензивных кроликах, причем гипотензивный эффект длился дольше, чем у пилокарпина и тимолола [233]. Однако неразрешимой оставалась одна проблема – рецептор CB1, ответственный за регуляцию ВГД, также ответственен и за психотропные свойства каннабиноидов, поэтому его агонисты незаконны или относятся к контролируемым веществам во многих странах по всему миру.

Сравнительно недавно был обнаружен другой подход к созданию антиглаукомных агонистов рецепторов CB1. Как выяснилось, взаимодействие с аллостерическим сайтом этого рецептора позволяет не только сохранить гипотензивный эффект, но и полностью избежать нежелательных побочных эффектов, типичных для агонистов CB1. Так было получено соединение **GAT211** (Рисунок 2.19) - прототипический агонист позитивного аллостерического модулятора рецепторов CB1 – который продемонстрировал доклиническую анальгетическую эффективность и терапевтическую активность против глаукомы без очевидных побочных эффектов [234–236]. Причем GAT211, его энантиомеры и аналоги являются «смещенными лигандами», то есть демонстрируют возможность вызывать специфический отклик рецептора, направленный, в данном случае, в сторону передачи сигналов, зависящих от G-белка, в отличие от эндогенных лигандов CB1 [237,238].

Однако существует значимое ограничение – сами по себе аллостерические агонисты CB1 не вызывают существенного снижения ВГД, эффект проявляется лишь при одновременном введении субпороговых концентраций ортостерических лигандов CB1 [237]. Работа над модификацией GAT211, которая бы позволила преодолеть данное ограничение, ведется до сих пор. Так в 2021 году было опубликовано исследование [239], в котором в структуре GAT211 фенил в положении 2 индольного скаффолда был заменен на другие ароматические структуры с целью улучшения связывания с CB1. Всего было получено 18 гетероароматических вариаций этого кольца, причем наиболее эффективной оказалась замена на фуран или тиофен (Рисунок 2.19).

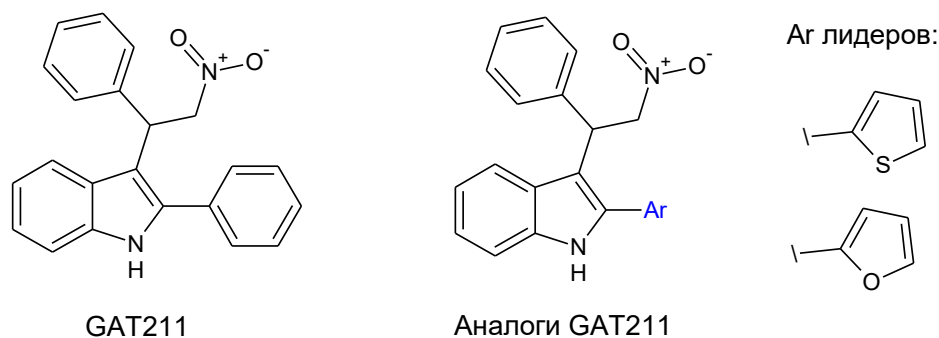


Рисунок 2.19. Антиглаукомный аллостерический агонист CB1- рецептора GAT211 и его аналоги.

Наиболее активное соединение в 3 раза превосходит GAT211 в способности увеличивать сигнальную силу G-белка, сопряженного с рецептором CB1 и способно снижать ВГД нормотензивных мышей на 3,2 мм.рт.ст., что делает возможным создание потенциального антиглаукомного препарата на его основе.

2.3.6. Серотониновые рецепторы

Серотонин (Рисунок 2.20) – нейромедиатор и гормон, участвующий в нейротрансмиссии и регулирующий множество биологических процессов. Его местное применение способно как повышать, так и понижать ВГД нормотензивных кроликов, что намекает на наличие нескольких серотониновых рецепторов, противоположным образом влияющих на ВГД [240,241]. К настоящему времени описано семь семейств серотониновых рецепторов (5HT1–5HT7), имеющих диффузную локализацию, включая структуры глаза. Экспериментальные исследования показали, что 5HT1A, 5HT2A/2C и 5HT7 расположены в комплексе радужки и цилиарного тела. Считается, что стимуляция рецепторов 5HT1A снижает ВГД за счет уменьшения секреции водянистой влаги, в то время как рецепторы 5HT2A/2C и 5HT7 повышают ВГД, усиливая выработку водянистой влаги за счет стимуляции кровотока цилиарного тела [242]. Однако данные об эффектах селективных модуляторов 5HT1A и 5HT2A-С зачастую противоречивы и указывают на видозависимость действия серотониновых рецепторов на ВГД. Как агонисты, так и антагонисты 5HT-рецепторов способны снижать ВГД на различных животных моделях, однако с разной эффективностью. Наибольший гипотензивный эффект наблюдается обычно у селективных агонистов 5HT2A-С.

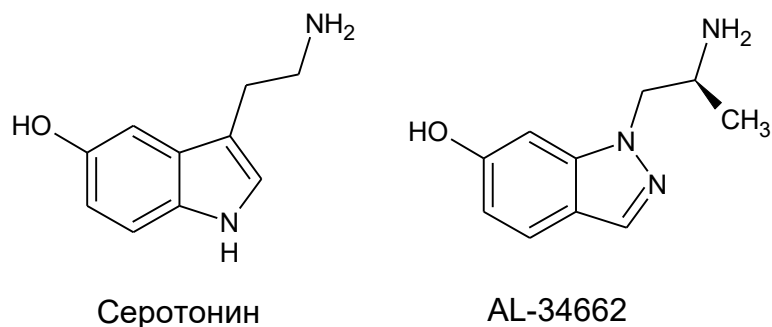


Рисунок 2.20. Структурные формулы серотонина и его аналога AL-34662.

Доподлинно известно, что эффективно (> 20%) снижать ВГД у гипертензивных макак способны следующие лиганды серотониновых рецепторов: 5-этокси-DMT (неселективный агонист 5HT), (R)-DOI (агонист 5HT_{2A}), α-метил-5HT (агонист 5HT_{2A}), mCPP (агонист 5HT_{2C}), AL-34662 (агонист 5HT_{2A-C}) и SB-258510A (антагонист 5HT₆) [243,244]. Особо выделяется соединение **AL-34662** (Рисунок 2.20), обладающее высоким сродством к каждому из подтипов 5-HT₂-рецепторов (IC₅₀ = 3-14.5 нМ для 5HT_{2A-C} человека), но значительно более низким сродством к другим 5-HT-рецепторам. AL-34662 – мощный высокоаффинный агонист рецепторов 5HT_{2A-C}, который снижает ВГД за счет взаимодействия с кальциевыми каналами в клетках трабекулярной сети [245]. Это соединение способно снижать ВГД гипертензивных макак на 31.4% и демонстрирует минимум побочных эффектов, что делает его перспективным лидером для разработки новых антиглаукомных препаратов.

2.3.7. Мелатониновые рецепторы

Мелатонин (Рисунок 2.21) – нейромедиатор и основной гормон эпифиза, ключевая роль которого заключается в регуляции циркадных ритмов. Помимо эпифиза, локальными очагами продукции мелатонина были идентифицированы фоторецепторы сетчатки, где он, по-видимому, действует паракринно из-за минимального системного высвобождения. Дальнейшие исследования показали его биосинтез в эпителии цилиарного тела с последующей секрецией во внутриглазную жидкость. Помимо своей общепризнанной роли в регуляции сна и снижении ВГД, мелатонин действует как мощный эндогенный антиоксидант, внося решающий вклад в окислительно-восстановительный гомеостаз и цитопротекцию [246]. Механизм, посредством которого мелатонин участвует в регуляции ВГД пока неясен, однако обычно этот эффект связывают с влиянием на секрецию водянистой влаги через усиление транспорта хлорида в реснитчатом эпителии, а также на выработку NO и цГМФ в клетках цилиарного эпителия человека [247]. Кроме того, показано, что регуляция ВГД мелатонином частично опосредована действием на адренергическую и симпатическую системы. Мелатонин взаимодействует с тремя подтипами рецепторов: MT₁, MT₂ и предполагаемым рецептором

MT3. Несколько исследований продемонстрировали, что именно активация MT3 играет решающую роль в снижении ВГД, однако рецепторы MT2 также участвуют в регуляции ВГД независимо от MT3 [248,249].

Сам мелатонин снижает ВГД через действие на MT2, так как к своему рецептору MT3 он проявляет сравнительно низкую аффинность [249]. Таким образом, гипотензивный эффект мелатонина, по всей видимости, связан с взаимодействием с MT2. Из-за низкой биодоступности и побочного седативного действия и быстрого разложения на свету мелатонин не используется в терапии глаукомы в качестве топического средства, а попытки его перорального применения показывают неоднозначные результаты [250,251].

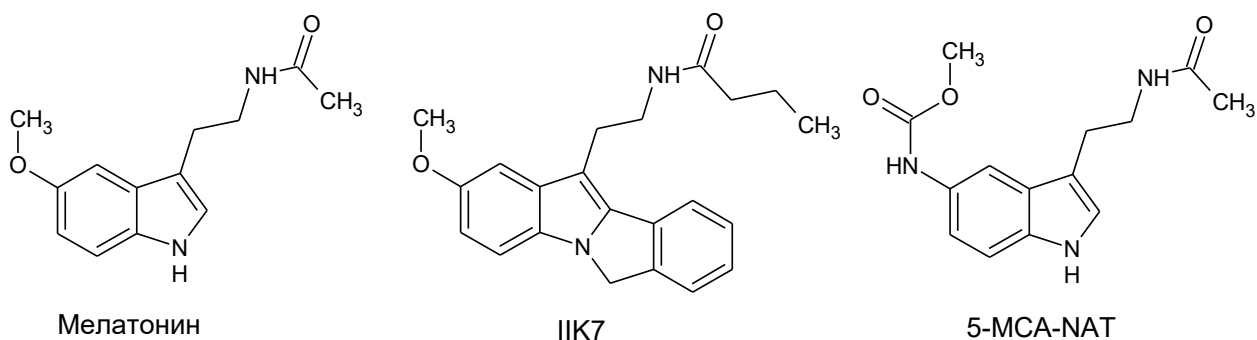


Рисунок 2.21. Структурные формулы мелатонина и его аналогов 5-HT7 и 5-MCA-NAT.

Селективный агонист MT2 рецептора 5-HT7 (Рисунок 2.21) демонстрирует в шесть раз большую аффинность к этому рецептору, чем мелатонин (pK_i 0.05 нМ против 0.33 нМ), и способен снижать ВГД кроликов эффективнее, чем мелатонин (на 39% вместо 20% соответственно), причем в присутствии агонистов β -адренорецепторов гипотензивный эффект увеличивается до 45% [252,253]. Однако рецептор MT2 также задействован в регуляции цикла сна-бодрствования, так что его агонисты оказывают мощное седативное действие [254].

В отличие от MT1 и MT2, рецептор MT3 не задействован в регуляции циркадных ритмов, но через него, предположительно, мелатонин оказывает нейропротекторное и гипотензивное действия. Наиболее известным селективным агонистом MT3 является биоизостер мелатонина 5-MCA-NAT (Рисунок 2.21), о роли которого в регуляции ВГД кроликов было впервые сообщено в 2010 году. 5-MCA-NAT демонстрирует значительный гипотензивный эффект, превосходящий таковой у мелатонина (снижение ВГД у кроликов на 43% и 24% соответственно) [255]. Также 5-MCA-NAT, как и мелатонин, модулирует экспрессию β_2 и α_2A -адренорецепторов в цилиарных эпителиальных клетках кролика, усиливая гипотензивное действие тимолола (на 14% для мелатонина и 17% для 5-MCA-NAT) и бримонидина (на 29% для мелатонина и 39% для 5-MCA-NAT), а также подавляет активность карбоангидраз САII и САXII в реснитчатых эпителиальных клетках кролика, что приводит к

снижению ВГД на 51,3% с эффектом, сохраняющимся до 96 часов [256]. По неизвестным причинам 5-MCA-NAT не участвовал в клинических испытаниях.

2.3.7.1. Исследования ингибиторов МТЗ на основе оксиндольного скаффолда

В нашей научной группе с 2011 года разрабатываются биоизостеры мелатонина, действующие на рецептор МТЗ [257]. Изначально было выдвинуто предположение, что замена индольного скаффолда мелатонина на оксиндольный (Рисунок 2.22) не только увеличит стабильность соединения и поможет избежать быстрой биodeградации в светлое время суток, что характерно для мелатонина, но и увеличит связывание соединения с ферментом хинон оксидоредуктазой 2 (NQO2), который, как было показано ранее, считают мелатониновым рецептором третьего подтипа.

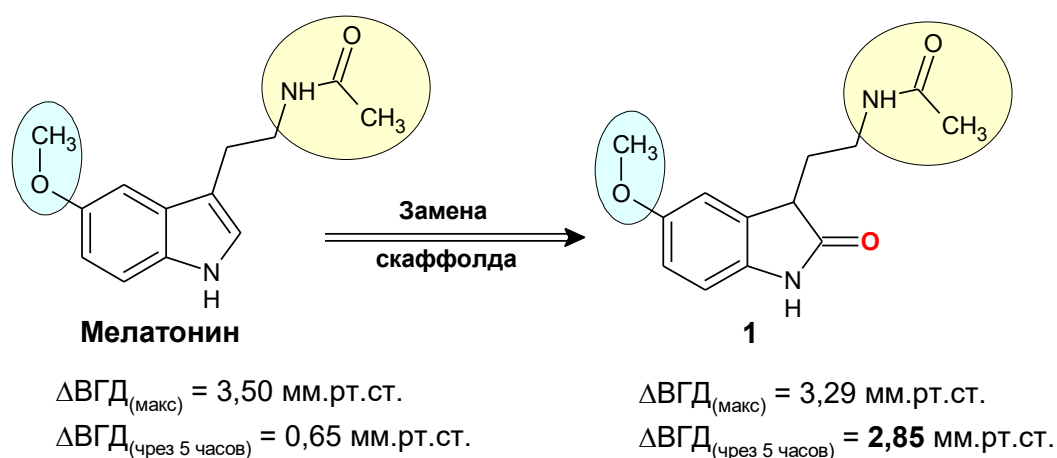


Рисунок 2.22. Стратегия скаффолд-хоппинга при создании новых лигандов МТЗ.

Прямая биоизостерическая замена индола на оксиндол в структуре мелатонина хотя и не приводит к увеличению гипотензивного эффекта соединения, положительно влияет на длительность его действия. ВГД нормотензивных кроликов через 5 часов после однократного введения мелатонина практически неотличимо от ВГД интактных животных, тогда как при введении его оксиндольного аналога **1** гипотензивный эффект сохраняется [258].

Дальнейшая модификация структуры мелатонина и селективного агониста МТЗ рецептора 5-MCA-NAT привела к созданию нескольких оксиндолов, продемонстрировавших аффинность к NQO2 на уровне мелатонина ($\text{IC}_{50} = 6,6 \text{ мкМ}$) (Рисунок 2.23) [259].

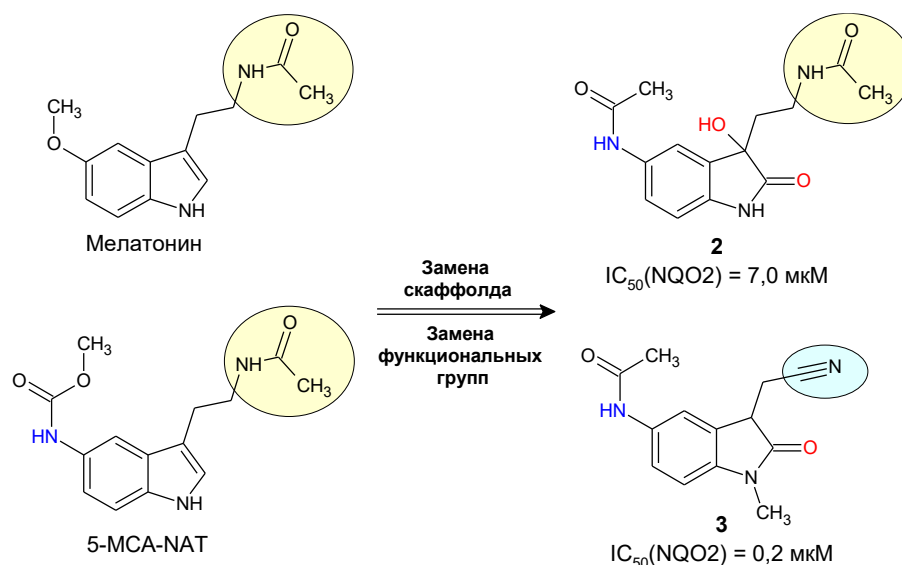


Рисунок 2.23. Биоизостерическая замена скаффолда и функциональных групп для увеличения аффинности соединений к NQO2.

Несмотря на сравнительно высокую аффинность соединений **2** и **3** к NQO2, оставался открытым вопрос о локализации их связывания. Чтобы установить, взаимодействуют ли они с тем же сайтом, что мелатонин и 5-MCA-NAT, был проведен рентгеноструктурный анализ (Рисунок 2.24). Полученные данные подтвердили, что оба соединения действительно занимают активный центр фермента, причем конфигурация их связывания идентична таковой для мелатонина [257,258,260].

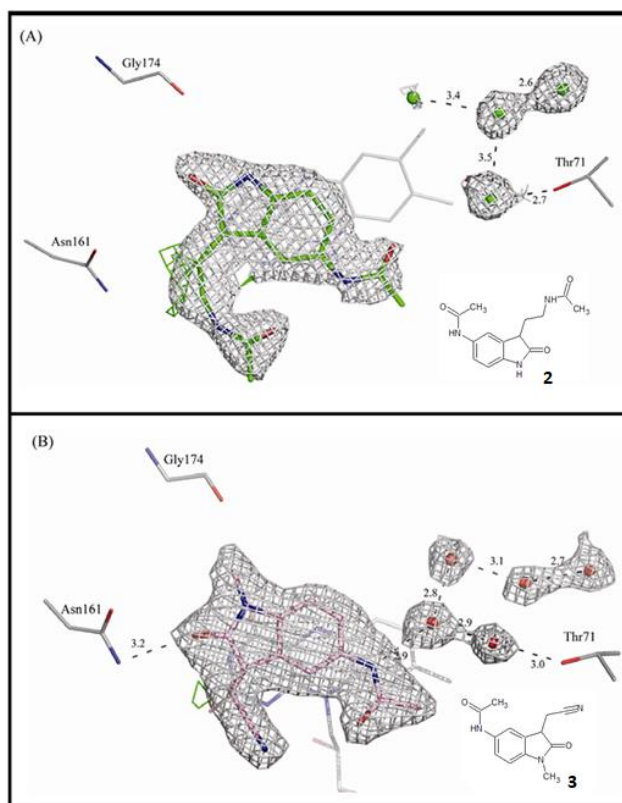


Рисунок 2.24. Рентгеноструктурный анализ расположения новых 2-оксиндольных аналогов мелатонина в активном сайте NQO2 [257,258,260].

Исходя из результатов рентгеноструктурного анализа, было выдвинуто предположение, что замена характерной для мелатонина и 5-MCA-NAT ацетамидэтильной группы в 3 положении на цианометильную или карбоксиметильную группы может положительно повлиять на связывание с ферментом. Следуя этому предположению, была синтезирована серия 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов с ацетамидной группой в 5 положении, гипотензивный эффект которых был проверен в исследованиях на нормотензивных кроликах.

Биологические исследования *in vivo* показали, что наибольшим гипотензивным эффектом обладает 5-ацетамид-3-карбоксиметил-2-оксиндол **4**, тогда как его аналоги с 3-цианометил (**5**) и 3-гидрокси (**6**) группами заметно уступают ему в способности снижать ВГД (Рисунок 2.25). Соединение **4** демонстрирует наибольший гипотензивный эффект (41%) на 4 часу после введения и превосходит в способности снижать ВГД как мелатонин (31%), так и тимолол (32%) [259].

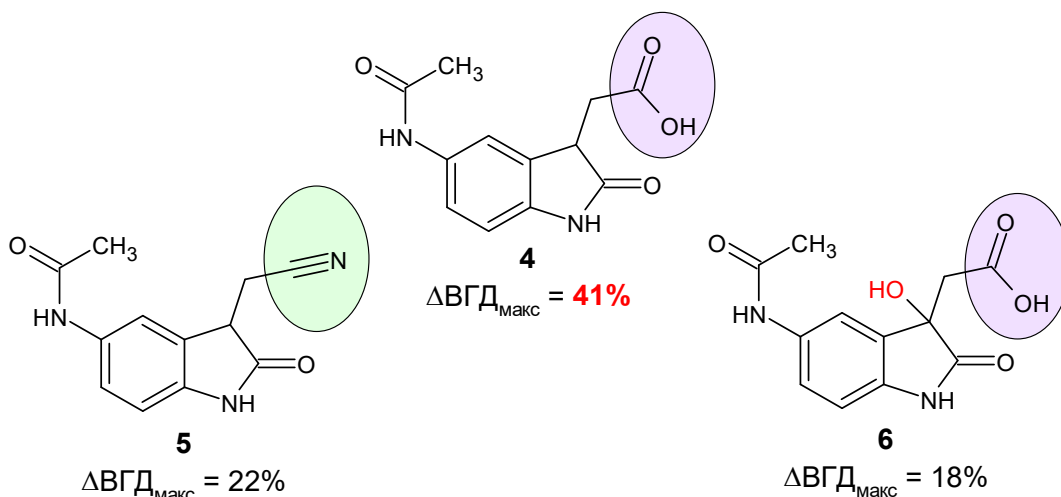


Рисунок 2.25. Максимальное снижение ВГД 5-ацетамидо-3-карбоксиметил-2-оксиндола и его аналогов.

Таким образом были определены основные функциональные группы, благодаря которым 2-оксиндольные аналоги мелатонина проявляют антиглаукомную активность.

2.4. Методы синтеза функционально замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов

2.4.1. Основные подходы

Среди многообразия применяемых методов можно выделить три основных подхода к синтезу 3-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов (Рисунок 2.26). Первый подход – это замыкание оксиндольного цикла с одновременным образованием 3-гидроксииндолин-2-онов. Подобных реакций немало, но они достаточно редко приводят к созданию гидрокси-группы в третьем положении продукта в одну стадию. Второй подход – это окисление 3-замещенного 2-оксиндола. Подобные реакции идут легко даже под действием кислорода воздуха, но иногда

используются пероксиды и другие источники кислород-радикала. Третий же подход самый распространенный – присоединение различных соединений к изатину.

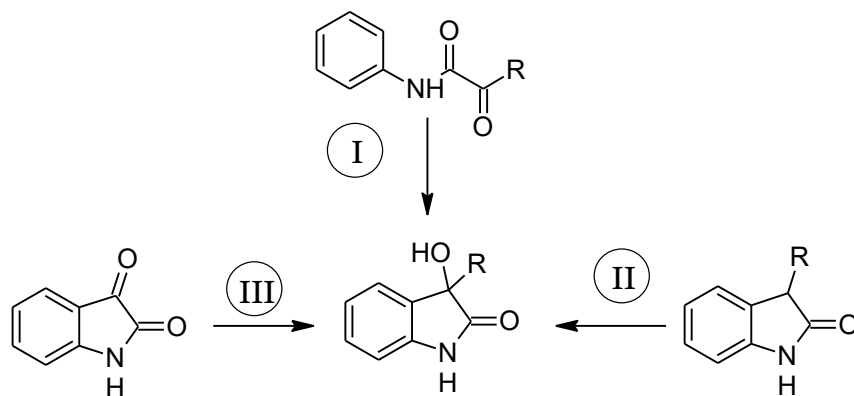


Рисунок 2.26. Классификация подходов к синтезу функционально замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов.

Далее будут рассмотрены статьи, посвященные синтезу 3-гидрокси-2-оксиндолов, опубликованные за последние 5 лет.

2.4.2. Методы синтеза с замыканием оксиндольного цикла

Существует несколько основных методов получения 3-гидрокси-2-оксиндолов при замыкании оксиндольного цикла. Из них за последние 5 лет наиболее часто используются два: кросс-сочетание, как внутримолекулярное, так и межмолекулярное, и циклизация орто-алкилнитроаренов. Первый подход представлен в работах [261,262]. Катализируемая никелем внутримолекулярная реакция кросс-сочетания α -кетоанилидов, содержащих галоген в орто-положении к аминогруппе ароматического кольца, позволяет получить как 3-арил, так и 3-алкил-производные 3-гидрокси-2-оксиндолов с количественными выходами (Рисунок 2.27). Применение хирального лиганда на основе ферроцена позволяет достичь энантиомерного избытка вплоть до 98%.

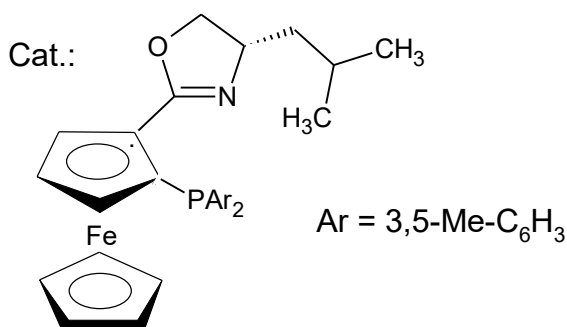
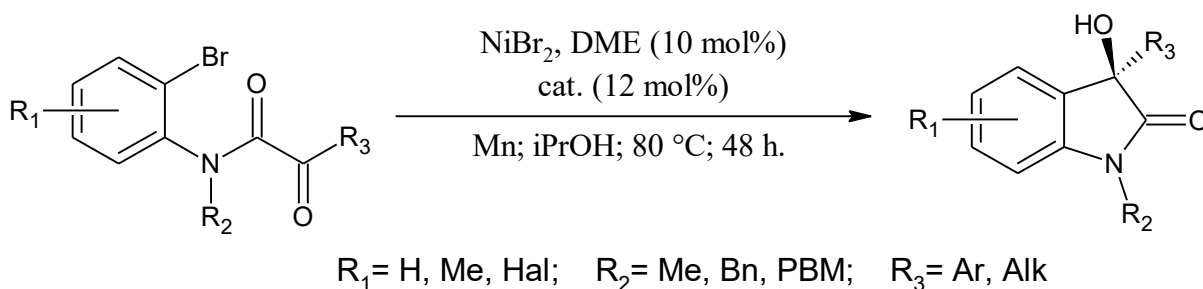


Рисунок 2.27. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов методом замыкания цикла.

Межмолекулярное кросс-сочетание диариламина и α -кетоефира, которое приводит к получению 3-гидрокси-2-оксиндола, осуществляется с помощью фотокатализа на иридиевом катализаторе [262]. Реакция успешно проходит как с донорными, так и с акцепторными заместителями в ароматических кольцах диариламина и α -кетоефира, с выходами от умеренных до хороших (40-99%) и с энантиомерным избытком вплоть до 96%, обеспечиваемым катализатором на основе фосфорной кислоты (Рисунок 2.28).

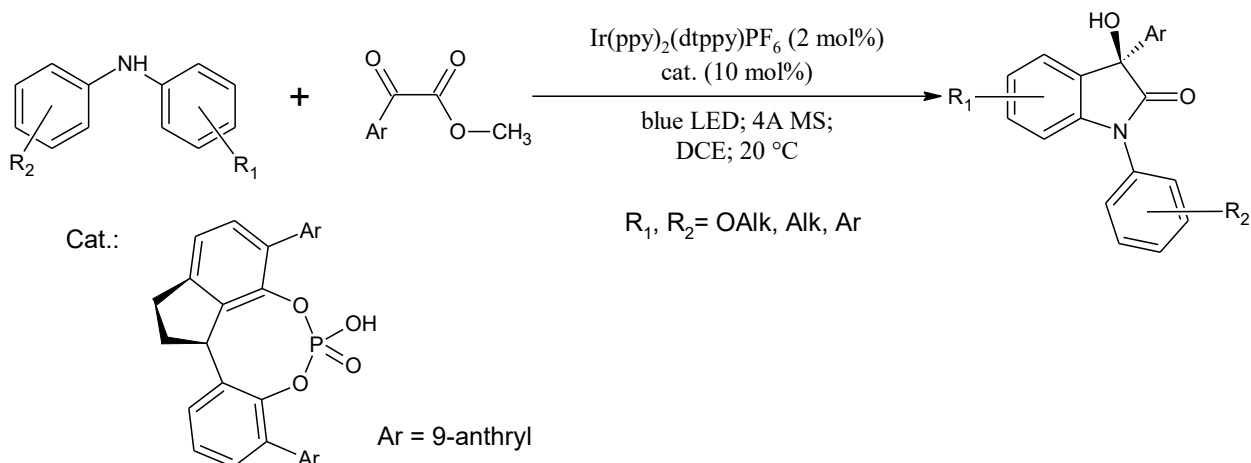


Рисунок 2.28. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью межмолекулярного кросс-сочетания диариламина и α -кетоефира.

Второй подход предусматривает внутримолекулярную циклизацию орто-алкилнитроаренов. Любопытно отметить, что кислород в 3 положении оксиндола, по-видимому, берется из нитро-группы, тогда как происхождение кислорода во 2 положении остается неоднозначным, в статье [263] предполагается, что он приходит из воды, тогда как в

статье [264] авторы предполагают сложный бимолекулярный механизм, в котором кислород во 2 положении берется из второй молекулы орто-алкилнитроарена (Рисунок 2.29).

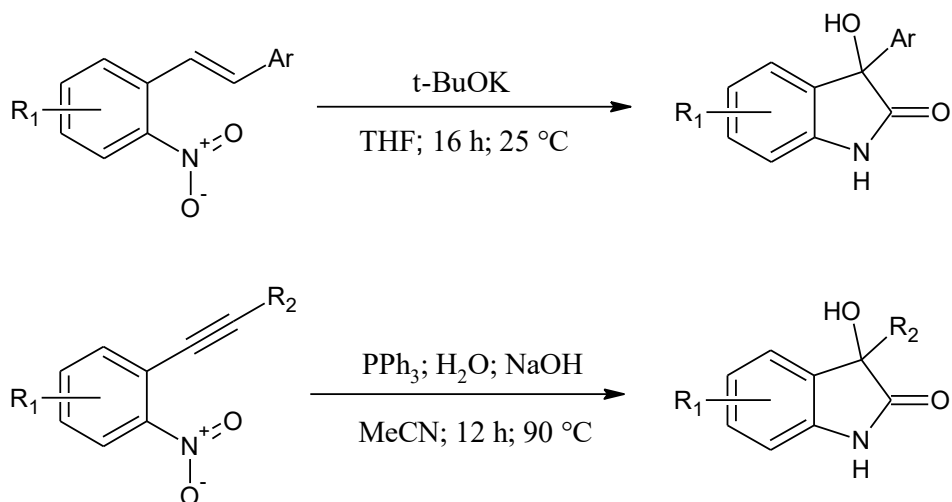


Рисунок 2.29. Синтез 3-гидрокси-2-оксидолов с помощью внутримолекулярной циклизации орто-алкилнитроаренов.

Данный метод синтеза позволяет получить 3-арил-3-гидрокси-2-оксидолы в одну стадию с умеренными выходами (около 40-70%).

2.4.3. Окисление 3-замещенных оксидолов

Еще одним распространенным путем получения 3-гидрокси-2-оксидолов является окисление моно-замещенных по третьему положению оксидолов. Тот факт, что в качестве окислителя может выступать даже кислород воздуха, явно указывает на нестабильность исходных соединений в растворе.

В статье [265] рассматривается функционализация 3 положения 2-оксидола производными бензилового спирта в основных условиях с одновременным окислением продукта кислородом воздуха (Рисунок 2.30).

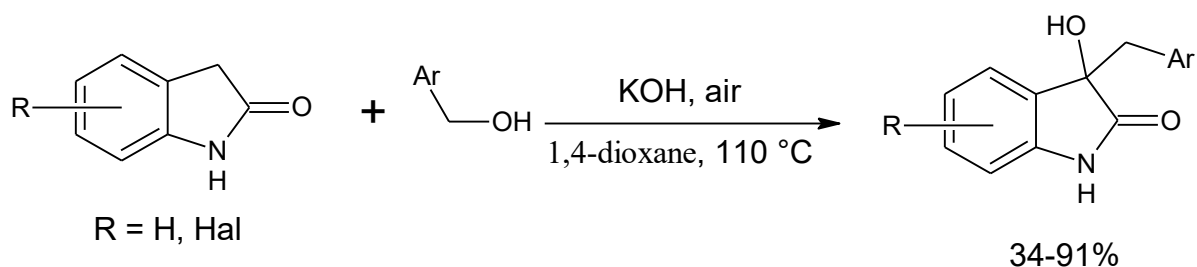


Рисунок 2.30. Синтез 3-гидрокси-2-оксидолов с помощью окисления кислородом воздуха.

Другим примером получения 3-гидрокси-2-оксидолов при помощи окисления может служить реакция 2-оксидолов с органическими перекисями, как в статье [266]. В данной работе был использован интересный подход – окисление субстрата с помощью *m*-CPBA проводилось в присутствии хирального катализатора на основе фосфорной кислоты, что

позволило получить оптически активные 3-гидрокси-2-оксиндолы с энантиомерным избытком вплоть до 99% и высокими выходами (82-99%) (Рисунок 2.31).

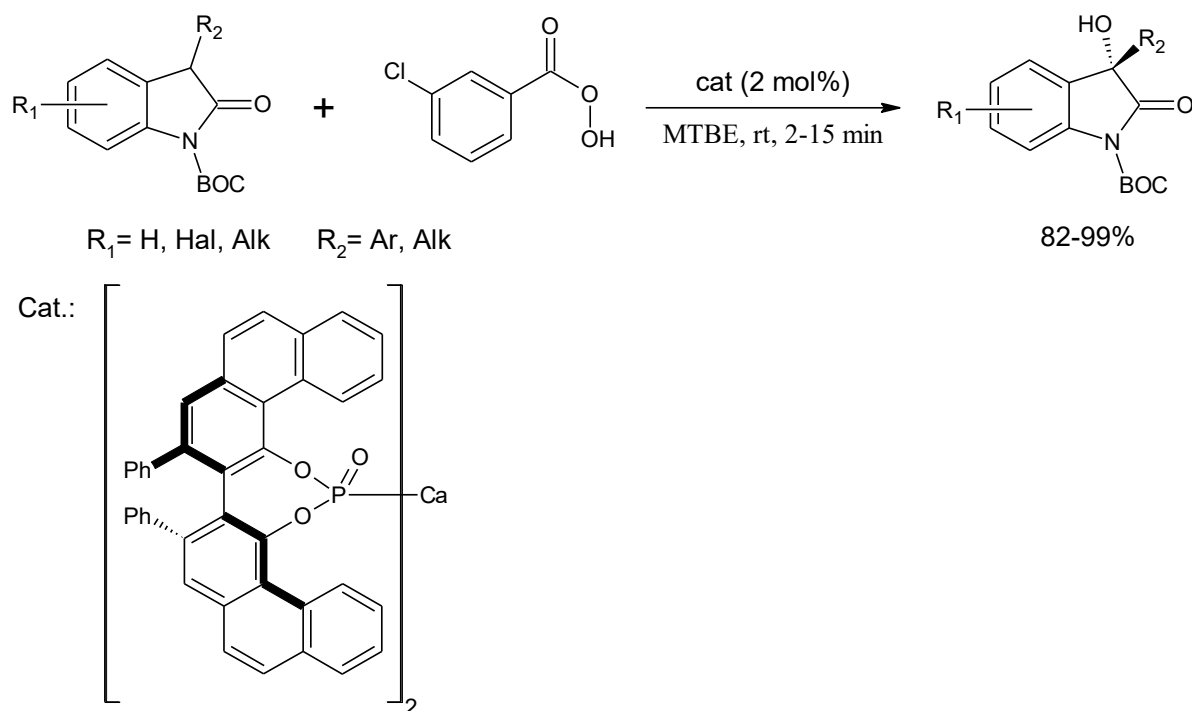


Рисунок 2.31. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью окисления органическим пероксидом (mCPBA).

Аналогичным образом окисление 3-замещенных оксиндолов можно проводить с помощью других окислителей. Например, в статье [267] в качестве окислителя и хирального катализатора используется (+)-(камфорилсульфонил)оксазиридин, более известный как хиральный оксазиридин Дэвиса (Рисунок 2.32).

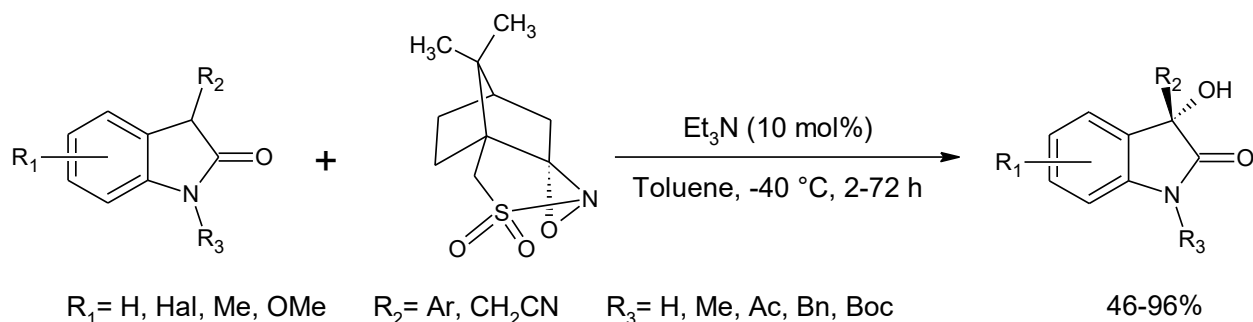


Рисунок 2.32. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью окисления хиральным оксазиридином Дэвиса.

Стоит отметить, что в указанных условиях окисление идет с наибольшими выходами при использовании 1-Вос-замещенных оксиндолов. Также 3-арил-2-оксиндолы окисляются оксазиридином Дэвиса с большим энантиомерным избытком (78-98%), чем 3-цианометил-2-оксиндолы (70%).

2.4.4. Синтезы на основе изатина

Изатин является продуктом крупнотоннажного производства. Доступность и низкая стоимость делают его наиболее удобным и распространенным исходным соединением для синтеза разнообразных 3-гидрокси-2-оксиндолов. Модификация третьего положения 2-оксиндольного цикла посредством нуклеофильного и, реже, радикального или катализируемого переходными металлами присоединения является основным способом получения 3-гидрокси-2-оксиндолов в одну стадию.

2.4.4.1. Реакция Морита-Бейлиса-Хиллмана

Еще один популярный способ получения 3-гидрокси-2-оксиндолов из изатина – это реакция Морита-Бейлиса-Хиллмана (МБХ). Чаще для катализа данной реакции используется 1,4-дизабициклооктан (DABCO), как, например, в статье [268]. Авторы этой работы используют реакцию МБХ для введения в 3 положение оксиндольного цикла оксадиазольный фрагмент (Рисунок 2.33). Полученные соединения были протестированы на внутриклеточных амастиготах *T. cruzi* и *L. Infantum*, так как оксадиазолы известны тем, что соединения на их основе часто проявляют антипаразитарные свойства.

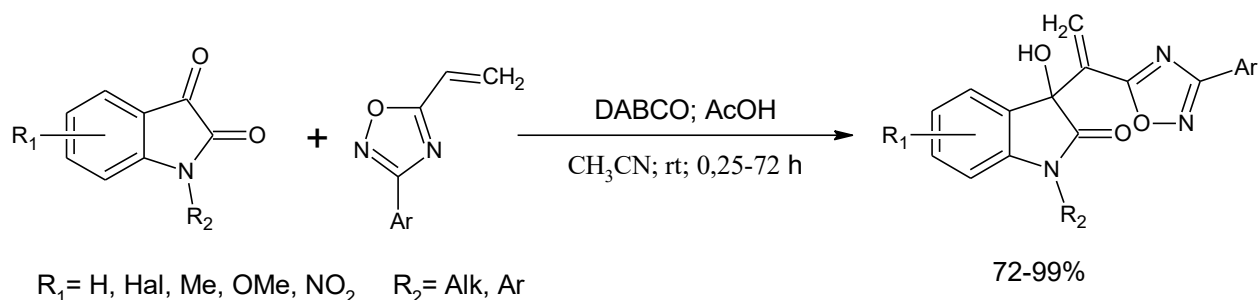


Рисунок 2.33. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью реакции МБХ.

Также недавно было опубликовано любопытное исследование об использовании глубоких эвтектических растворителей при проведении реакции МБХ с изатинами. Судя по результатам, представленным в статье [269], использование смеси хлорида холина и этиленгликоля позволяет сократить необходимое для реакции количество DABCO за счёт сокатализирующего действия хлорида холина, а также сокращает время реакции, практически не влияя на выходы продуктов (Рисунок 2.34).

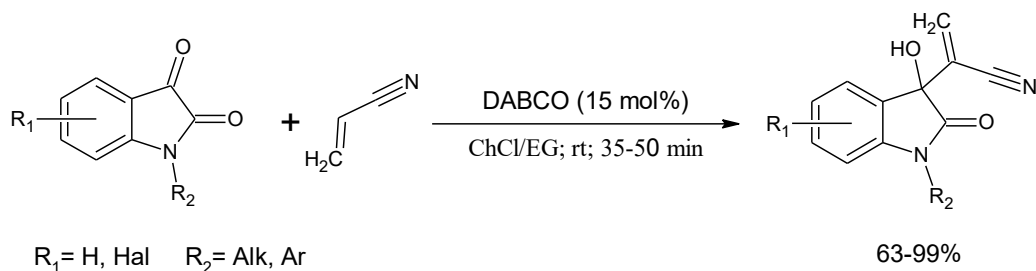
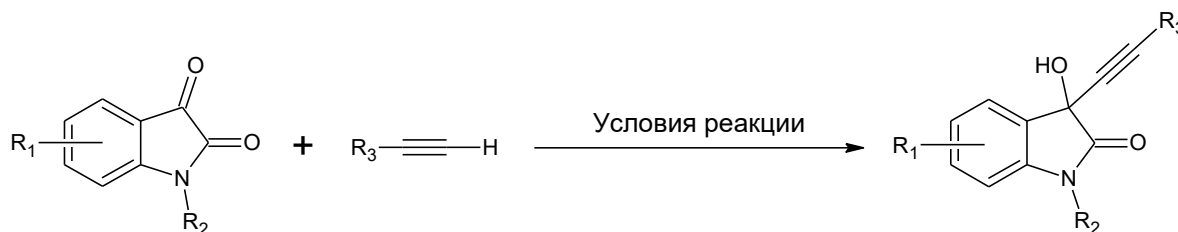


Рисунок 2.34. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью реакции МБХ.

2.4.4.2. Реакция Фаворского

Другим известным методом получения 3-гидрокси-2-оксиндолов из изатиннов является реакция Фаворского. Присоединение терминальных алкинов к карбонильной группе в 3-положении изатина обычно катализируется основанием, органическим или неорганическим, и солями переходных металлов (Таблица 2.4). Использование разнообразных хиральных катализаторов позволяет получать продукты присоединения с высоким энантиомерным избытком (до 99%).

Таблица 2.4. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью реакции Фаворского.



| № | Условия реакции | Заместители | Выход | Ссылка |
|---|---|---|--------|--------|
| 1 | AgOAc, K ₂ CO ₃ , мезитилен, 40-70°C, 72 ч. | R ₁ = H, Me, OMe, Hal R ₂ = PMB, Bn R ₃ = Ar | 61-91% | [270] |
| 2 | AgBF ₄ , Et ₃ N, 4 Å 40-70°C, 72 ч. | R ₁ = H, Me, OMe, NO ₂ , Hal R ₂ = PMB R ₃ = Ar, Alk | 49-99% | [271] |
| 3 | CuOTf * 0.5 PhH, Et ₃ N, H ₂ O, TFE, комн. т., 24 ч. | R ₁ = H, Me, OMe, Hal R ₂ = H, Bn R ₃ = Ar, Alk | 43-99% | [272] |
| 4 | Co(OAc) ₂ * 4 H ₂ O, K ₂ CO ₃ , EtOH, 30°C, 20 ч. | R ₁ = H, Me, OMe, NO ₂ , Hal R ₂ = H, Ar, Alk R ₃ = Ar, Alk | 92-99% | [273] |

Стоит отметить несколько любопытных моментов. Обычно в данную реакцию вводят N-замещенные изатины, однако в статье [273] (Таблица 2.4, строчка 4) на нескольких примерах показано, что заместитель в 1-положении изатина не влияет ни на протекание реакции, ни на выходы.

2.4.4.3. Реакция Фриделя-Крафтса

Для получения 3-гидрокси-2-оксиндолов с арильными заместителями в 3-положении часто используют реакцию Фриделя-Крафтса. Для создания хиральности в данном случае используют те же катализаторы, что и для энантиоселективной реакции альдольной конденсации – хиральные фосфорные кислоты или катализаторы Такемото (Рисунок 2.35). Так в статье [274] к замещенным изатинам присоединяют электронно-избыточные фенолы с выходами вплоть до 96%.

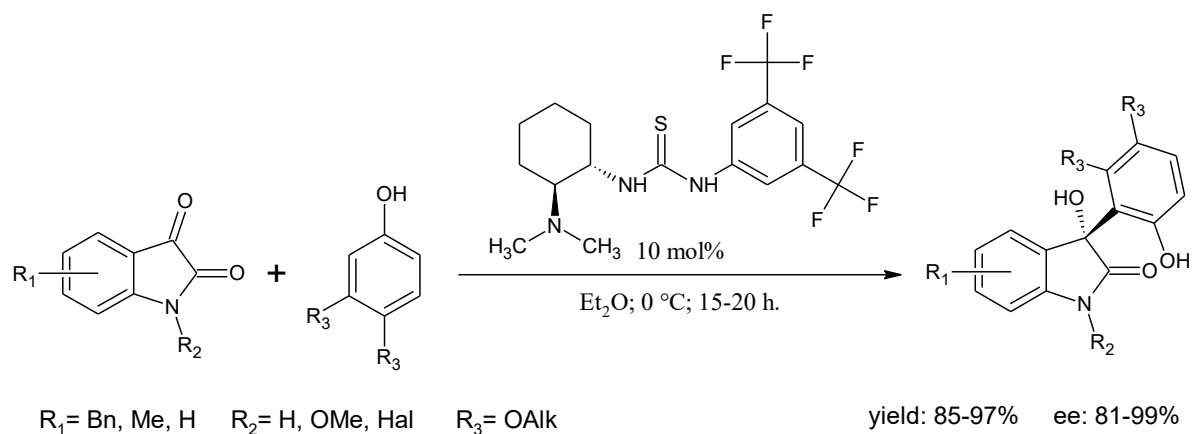


Рисунок 2.35. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов с помощью реакции Фриделя-Крафтса.

Также реакция Фриделя-Крафтса часто используется для присоединения к изатину других гетероароматических структур. В статьях [275,276] продемонстрирован простой метод присоединения индола к изатину, однако продукт выделяется с весьма низким выходом, вероятно, из-за побочного продукта двойного присоединения (Рисунок 2.36). Впрочем, в работе [276] показано, что при замене индола на индолизин, выходы реакции увеличиваются вплоть до количественных.

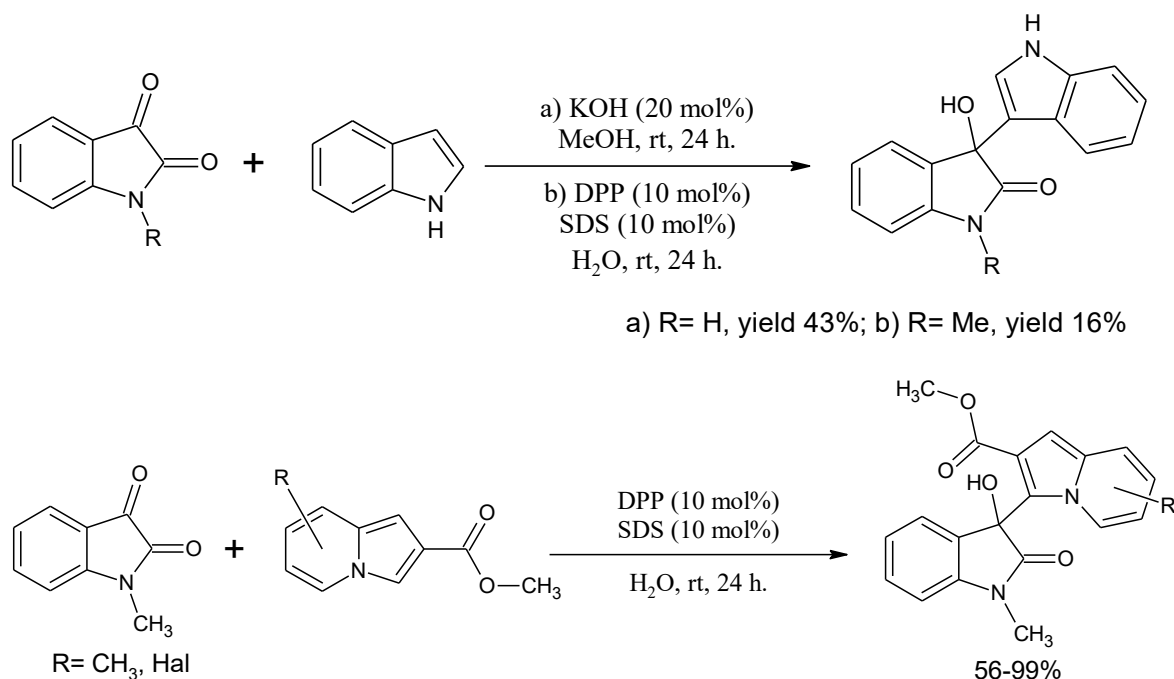


Рисунок 2.36. Присоединение индола и индолизинов к изатинам.

Стоит подчеркнуть, что реакции проходят в таких мягких условиях благодаря дифенил фосфату (DPP), который используется в качестве активатора изатина, и додецил сульфату натрия (SDS), который увеличивает растворимость компонентов реакции в воде.

2.4.4.4. Присоединение борорганических соединений

Введение аллильного фрагмента в 3 положение изатина зачастую является нетривиальной задачей, решить которую возможно с использованием борорганических соединений. В литературе представлено несколько условий, в которых пинаколовый эфир аллилбороновой кислоты или его производные используются как нуклеофилы в каталитическом аллилировании [277,278] (Рисунок 2.37). Использование хиральных фосфорных кислот позволяет проводить данную реакцию энантиоселективно с энантиомерным избытком до 95%. Более того, в статье [278] указано, что перекристаллизация полученных 3-гидрокси-2-оксиндолов из дихлорметана позволяет увеличить энантиомерный избыток на 5-10%.

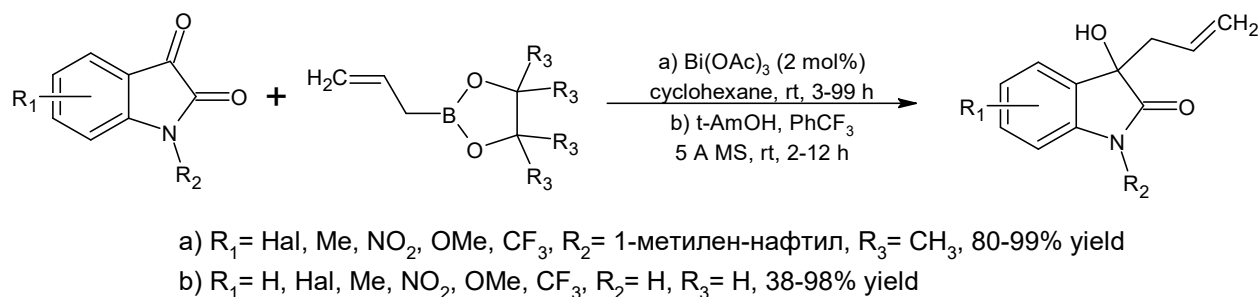


Рисунок 2.37. Присоединение борорганических соединений к изатинам.

2.4.4.5. Присоединение галогенорганических соединений

Введение аллильного фрагмента в 3 положение изатина также возможно с использованием аллил бромида и его производных. Так, в статье [279] представлен сложный энантиоселективный (до 93% ee) фотохимический синтез с использованием кислот Льюиса и молекулярных сит (Рисунок 2.38). В результате авторам удалось создать универсальный способ получения 3-гидрокси-2-оксиндолов с ненасыщенным фрагментом в 3 положении цикла.

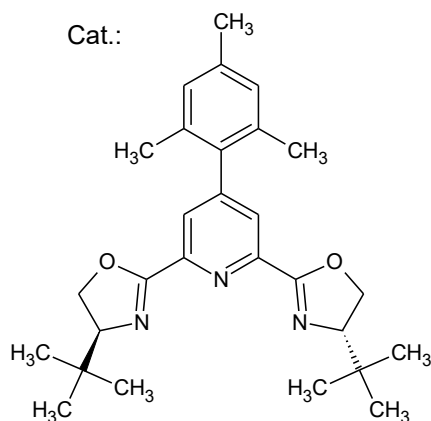
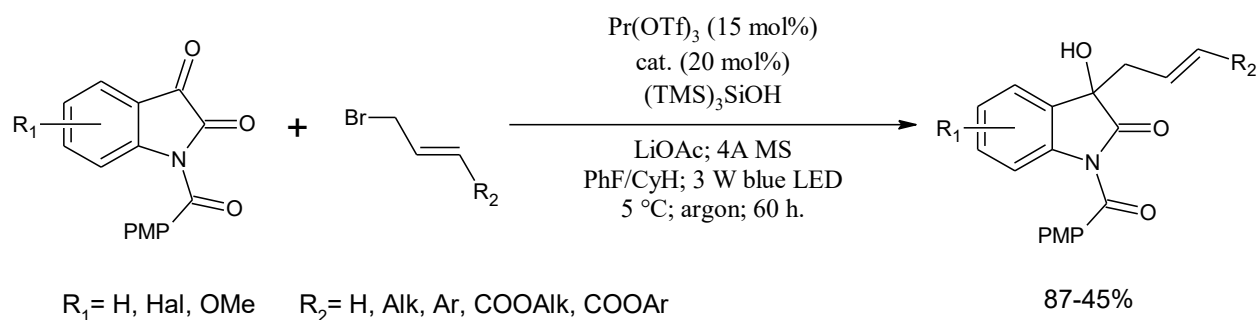


Рисунок 2.38. Присоединение галогенорганических соединений к изатинам.

Схожим, но более простым способом можно ввести в 3 положение изатина пропаргильный заместитель (Рисунок 2.39). В работе [280] была проведена реакция между 3-бромпропином и N-замещенными изатинами на цинке в присутствии каталитических количеств тетрахлорида гафния.

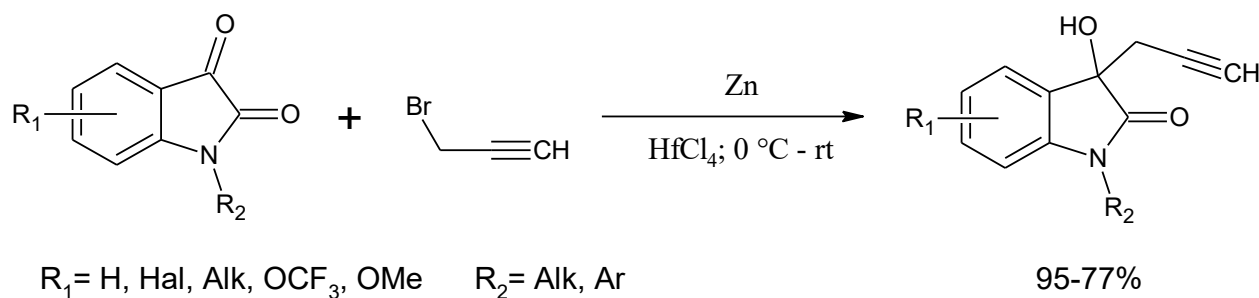


Рисунок 2.39. Присоединение 3-бромпропина к изатинам.

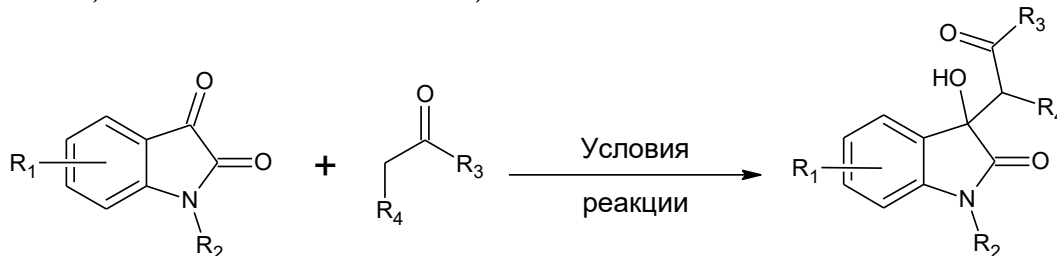
Авторы уточняют, что присутствие тетрахлорида гафния заметно увеличивает выходы продукта, что намекает на то, что данная реакция может проходить по механизму, схожему с механизмом протекания реакции Гриньяра.

2.4.4.6. Альдольная конденсация

Пожалуй, наиболее широко используемый подход к синтезу 3-гидроксиоксиндолов это альдольная конденсация изатина с различными карбонильными соединениями (Таблица 2.5). Эта реакция очень удобна и вариативна, а использование хиральных катализаторов делает ее незаменимой в синтезе биологически активных соединений. В данной реакции замещенные

изатины выступают в качестве карбонильной компоненты, тогда как структура метиленовой компоненты может колебаться в широких пределах. Чаще всего можно встретить конденсацию изатинов с кетонами с алкильными или арильными заместителями, но иногда в качестве метиленовой компоненты могут выступать амиды и β -кетокислоты.

Таблица 2.5. Альдольная конденсация изатинов с СН-кислотными соединениями.



| № | Условия реакции | Метиленовая компонента | Выход | Ссылка |
|---|---|---------------------------|--------|--------|
| 1 | Et ₃ N; EtOH; комн. т.; 8 ч. | | 83% | [281] |
| 2 | K ₂ CO ₃ или Et ₂ NH; комн. т. | R = CH ₃ , iPr | 63-93% | [282] |
| 3 | Фермент (коровий трипсин); H ₂ O | R = CH ₃ , Ph | 30-99% | [283] |
| 4 | Пиперидин; MeOH; комн. т.; 3 дня | | 87% | [284] |
| 5 | Имидазол; H ₂ O; 80°C; 23-48 ч. | | 30-86% | [285] |
| 6 | NaOAc; EtOH; 78°C; 3 ч. | | 62-91% | [286] |

Любопытно отметить, что в статье [283] (Таблица 2.5, строка 3) было показано, что альдольная конденсация, обычно требующая основания для снятия протона с метиленовой компоненты, может проходить и при ферментативном катализе.

Среди различных модификаций альдольной конденсации особенно выделяется реакция изатинов с СН-кислотными производными, содержащими карбоксильную группу, потому как она часто протекает с одновременным декарбоксилированием. Причем отщепление CO₂ может происходить как до присоединения метиленовой компоненты с образованием

активного енолята, так и после присоединения. Например, в статье [287] было доказано, что декарбоксилирование происходит после конденсации (Рисунок 2.40).

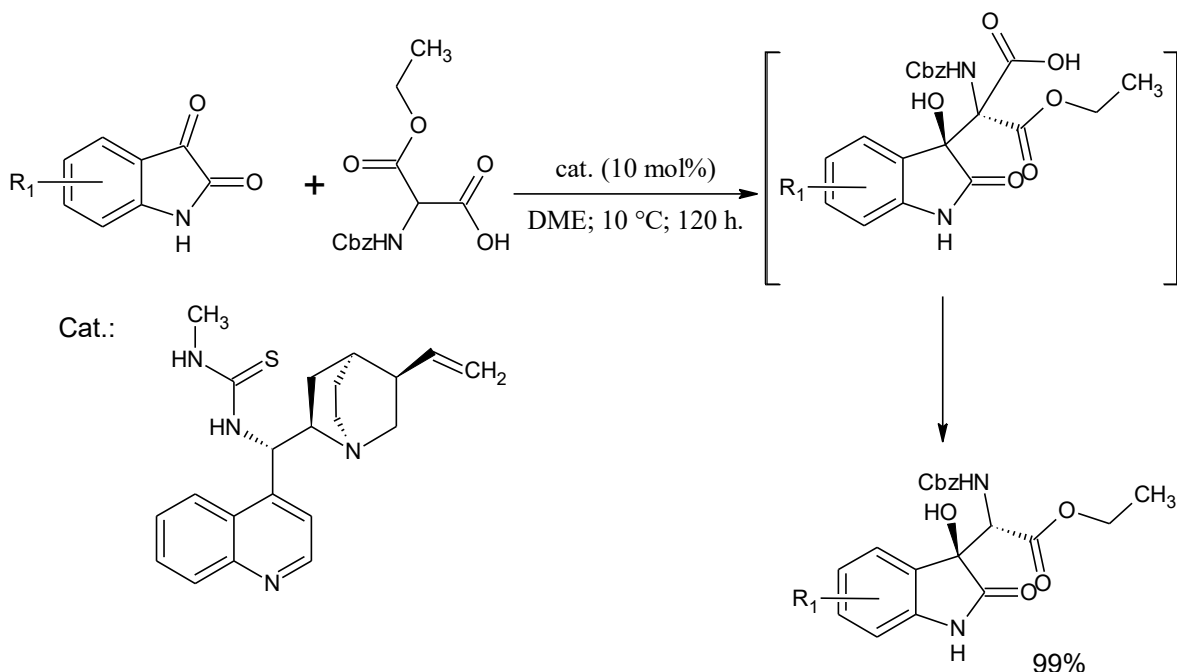


Рисунок 2.40. Альдольная конденсация изатинов с СН-кислотными производными с одновременным декарбоксилированием.

С другой стороны, в статьях [288,289] в роли метиленовой компоненты выступают соединения, у которых отрицательный заряд на углероде может быть создан только через декарбоксилирование (Рисунок 2.41).

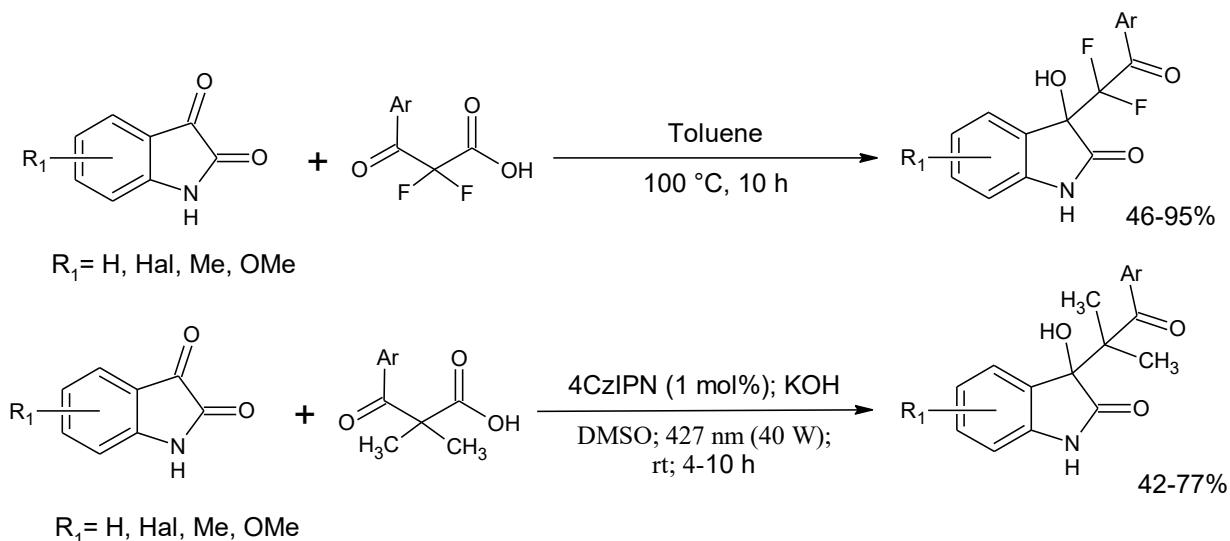


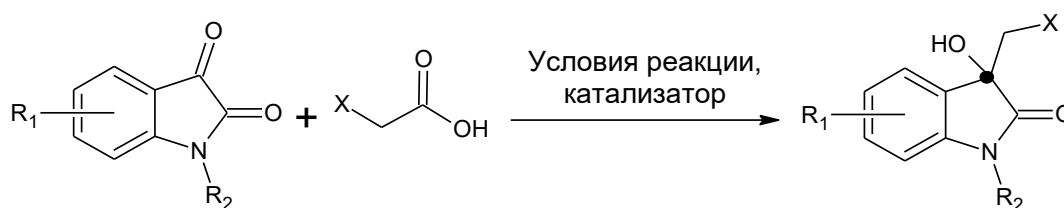
Рисунок 2.41. Альдольная конденсация изатинов с СН-кислотными производными, предваряемая декарбоксилированием.

Такое разнообразие реагентов и условий делает альдольную конденсацию очень гибким и надежным методом получения 3-гидрокси-2-оксиндолов.

2.4.4.7. Конденсация с циануксусной и малоновой кислотами

Производные малоновой кислоты также часто вступают в реакцию с изатинами с образованием альдольного продукта с одновременным декарбоксилированием [290–293]. Общий метод получения 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов включает в себя конденсацию изатинов с циануксусной или малоновой кислотами в апротонном растворителе в присутствии органического основания (Таблица 2.6). Иногда в качестве основания может выступать хиральный амин, что позволяет получать оптически активные продукты.

Таблица 2.6. Конденсация с циануксусной и малоновой кислотами.



| № | Заместители | Условия реакции | Катализатор | Выход/ee | Ссылка |
|---|---|--|-------------------|-------------------|-----------|
| 1 | R ₁ = H, Alk, Hal, OMe, NO ₂ R ₂ = H, Me, Bn, Ac, Bz X = CN | DMF, 70°C-r.t. | Et ₃ N | 73-96%/- | [290,291] |
| 2 | R ₁ = H, Me, Hal, OMe, NO ₂ R ₂ = H, Me, Bn X = CN | MTBE, 25°C | | 72-82%/ 70-99% | [292] |
| 3 | R ₁ = H, Me, Hal, R ₂ = H X = COOH | Ni(OAc) ₂ *H ₂ O, THF, 10°C, N ₂ | | 73-87%/ 71-81% | [293] |

Как видно из Таблицы 2.6, триэтиламина достаточно для того, чтобы реакция между изатином и циануксусной кислотой приводила к получению 3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндолов с высоким выходом.

Ранее в нашей лаборатории уже было разработано несколько подходов к синтезу 3-гидрокси-2-оксиндолов [257,259,294]. Было показано, что заместители в изатиновом кольце могут сильно влиять на прохождение реакции и соотношение продуктов. Так, например, продуктом реакции 5-нитроизатина с циануксусной кислотой без нагревания является

циано(3-гидрокси-5-нитро-2-оксиндол)уксусная кислота [257]. Причем даже перемешивание в кислой среде приводит не к декарбоксилированию, а к элиминированию (Рисунок 2.42).

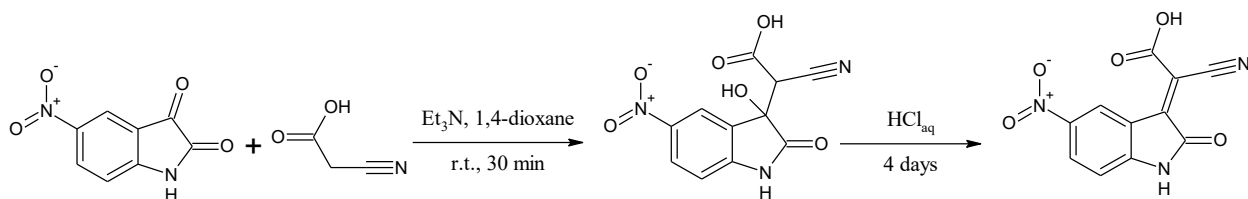


Рисунок 2.42. Реакция 5-нитроизатина с циануксусной кислотой.

Реакция изатинов с производными малоновой кислоты представляет собой удобный способ получения 3-гидрокси-2-оксиндолов с потенциальной антиглаукомной активностью, однако ранее она была изучена лишь для ограниченного ряда изатинов. Таким образом, подбор универсальных условий данного синтеза и изучение субстратных ограничений является важной и актуальной задачей.

3. Обсуждение результатов¹

Благодаря своим ярко выраженным гипотензивным свойствам и большей стабильностью по сравнению с мелатонином, новые 2-оксиндолы могут стать основой для создания антиглаукомного препарата нового поколения. Однако исследования были довольно разрозненными и сосредоточенными, в основном, на получении 2-оксиндолов с ацетамидной группой в 5 и/или 7 положениях оксиндольного цикла, тогда как соединения с другими функциональными группами либо не были синтезированы, либо не тестировались. В связи с этим возникла необходимость расширения ряда биологически активных 2-оксиндолов, создания новых быстрых и универсальных методик их получения, а также проведения дополнительных биологических испытаний для установления зависимостей структура-активность.

Ранее в нашей научной группе было обнаружено, что 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолы, как с гидроксигруппой в 3 положении цикла, так и без неё, демонстрируют выраженную антиглаукомную активность [259]. Поэтому целью данной работы стало создание нескольких серий разнообразно замещенных 2-оксиндолов и тестирование их биологической активности.

¹ При работе над данным разделом диссертации использованы материалы следующих публикаций автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1) **Efremov A.M.**, Beznos O.V., Ereemeev R.O., Chesnokova N.B., Milaeva E.R., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Microwave-Assisted Synthesis of 3-Hydroxy-2-oxindoles and Pilot Evaluation of Their Antiglaucomic Activity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 6. – P. 5101. – EDN SSEDQQ. Импакт-фактор 4.9 (JIF). Объем 1,50 п.л. Личный вклад автора 50%.

2) **Efremov A.M.**, Babkov D.A., Beznos O.V., Sokolova E.V., Spasov A.A., Ivanov V.N., Kurkin A.V., Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. Microwave-assisted synthesis of 5-aryl-3-hydroxy-2-oxindole derivatives and evaluation of their antiglaucomic activity // *Mendeleev Communications*. – 2023. – Vol. 33, No. 4. – P. 550-552. – EDN QLRUEC. Импакт-фактор 1.7 (JIF). Объем 0,81 п.л. Личный вклад автора 50%.

3) Ereemeev R.O., Beznos O.V., **Efremov A.M.**, Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. The rational design of novel 5-amino-2-oxindole derivatives with antiglaucomic activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2023. – Vol. 90. – P. 129334. – EDN PLWVHR. Импакт-фактор 2.2 (JIF). Объем 0,69 п.л. Личный вклад автора 40%.

4) Ereemeev R.O., **Efremov A.M.**, Zakharova D.V., Beznos O.V., Sokolova E.V., Kalitin K.Y., Mukha O.Y., Vinogradova D.V., Veselov I.M., Shevtsov P.N., Dubova L.G., Babkov D.A., Spasov A.A., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Discovery of Novel 2-Oxindoles as Compounds with Antiglaucoma Activity // *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. – 2025. – Vol. 20, No. 8. – P. e202400977. – EDN ORVXRF. Импакт-фактор 3.4 (JIF). Объем 1,16 п.л. Личный вклад автора 50%.

5) Лозинская Н.А., Бухаловский Ф.Г., Виноградова Д.В., **Ефремов А.М.**, Безнос О.В., Павленко Т.А., Науменко Л.В., Таран А.С., Чебанько А.М., Веселов И.М., Спасов А.А., Шевцова Е.Ф. Синтез и биологическая активность 5-сульфонамидзамещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов с 3-цианометильными и 3-карбоксиметильными заместителями // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2025. – Т. 74, № 8. – С. 2413-2426. – EDN MLANYH. Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ). Объем 1,62 п.л. Личный вклад автора 30%.

[перевод: Lozinskaya N.A., Bukhalovsky F.G., Vinogradova D.V., **Efremov A.M.**, Beznos O.V., Pavlenko T.A., Naumenko L.V., Taran A.S., Tchaban'ko A.M., Veselov I.M., Spasov A.A., Shevtsova E.F. Synthesis and biological activity of 5-sulfonamide-substituted 3-hydroxyoxindoles with 3-cyanomethyl and 3-carboxymethyl groups // *Russian Chemical Bulletin*. – 2025. – Vol. 74, No. 8. – P. 2413-2426. – EDN HVIWCN. Импакт-фактор 0.305 (SJR). Объем 1,02 п.л. Личный вклад автора 30%]

Для доступа к большой библиотеке биологически активных 2-оксиндолов потребовалась разработка простого, быстрого и универсального метода синтеза 2-оксиндолов, которые далее будут использованы в качестве основы для модификаций. Как было показано в предыдущих работах нашей научной группы [257,259,294], 3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндолы способны, в зависимости от заместителей в оксиндольном кольце и условий реакции, служить исходными соединениями для получения разнообразных 2-оксиндолов с доказанной антиглаукомной активностью (Рисунок 3.1).

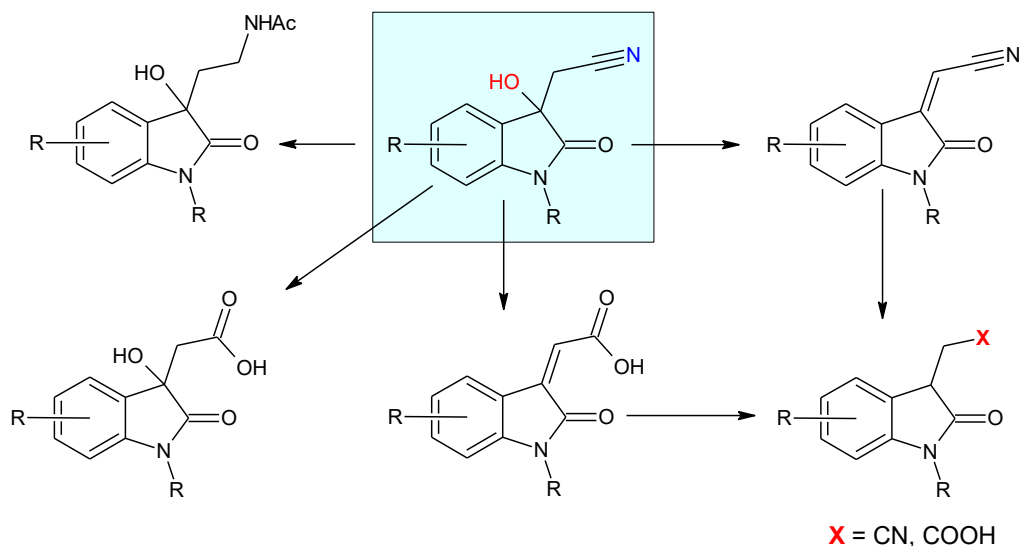


Рисунок 3.1. Рисунок получения различных 3-замещенных 2-оксиндолов из 3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндола.

Поэтому актуальной задачей на первоначальном этапе работы стало создание экспресс-метода синтеза 3-гидрокси-2-оксиндолов.

3.1. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов в условиях микроволновой активации

Так как нашей первоочередной задачей являлось получение разнообразно замещенных 3-цианометил и 3-карбоксиметил-3-гидрокси-2-оксиндолов, мы проанализировали существующую литературу по данной тематике и обнаружили, что оптимальным методом синтеза является конденсация исходных изатинов с малоновой или циануксусной кислотами (Рисунок 3.2) [290,292].

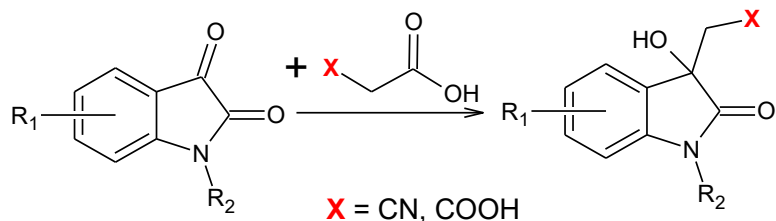


Рисунок 3.2. Рисунок реакции конденсации между замещенным изатином и малоновой или циануксусной кислотами.

Из литературы известно, что данная реакция конденсации обычно проводится в присутствии азотистых оснований, чтобы, с одной стороны, не допустить раскрытия изатинового кольца, которое происходит под действием сильных оснований, а с другой – способствовать снятию протона с СН-кислот. Данную реакцию проводят в апротонных растворителях, таких как тетрагидрофуран (ТГФ), N,N-диметилформамид (ДМФА) или 1,4-диоксан, так как протонные растворители облегчают отщепление гидроксигруппы и образование побочного продукта с двойной связью.

Реакция изатинов (**1a–i**) с цианоуксусной и малоновой кислотами с одновременным декарбоксилированием протекает по двум альтернативным механизмам **A** и **B** (Рисунок 3.3).

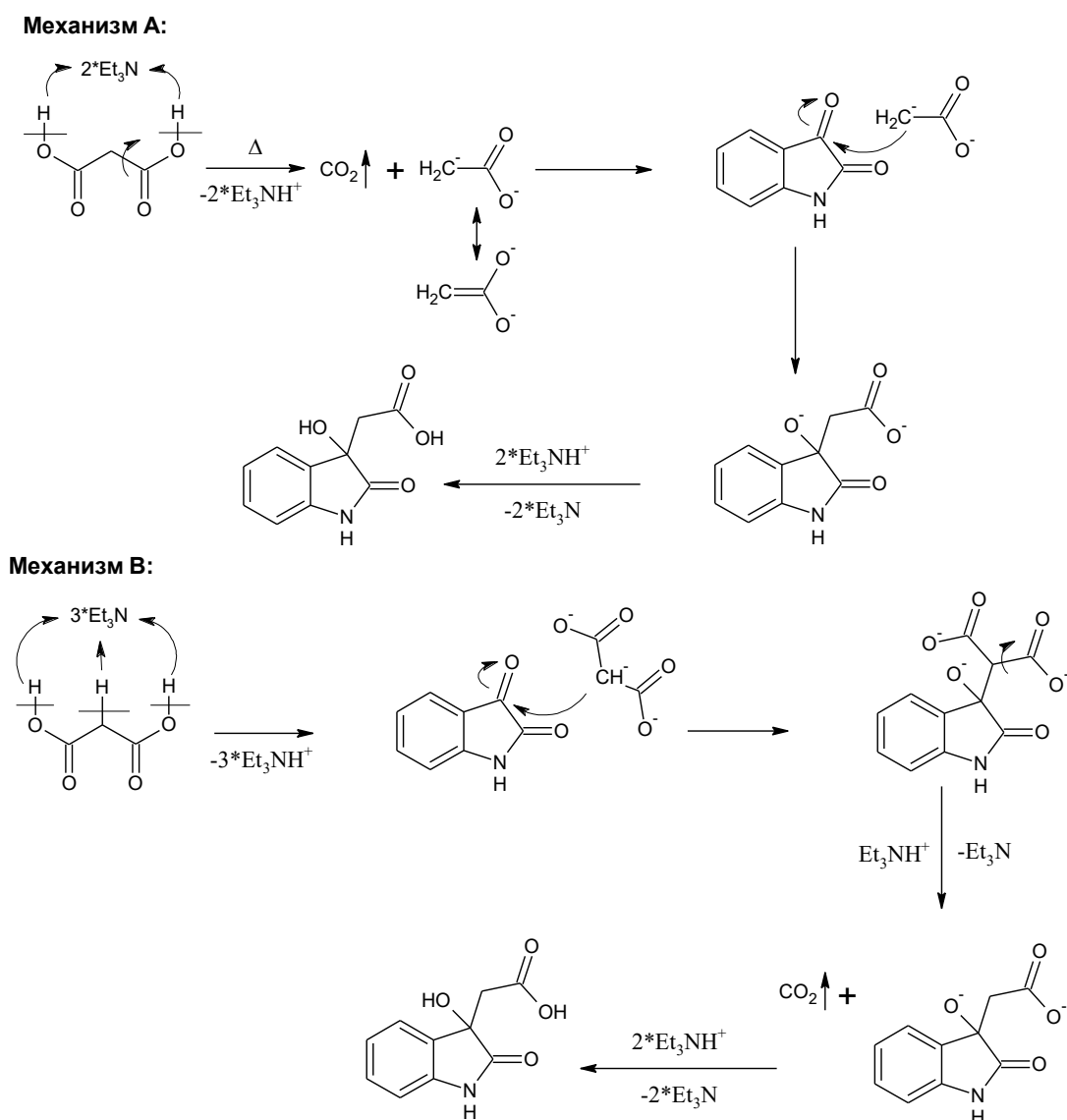


Рисунок 3.3. Предполагаемые механизмы конденсации изатинов с малоновой кислотой.

Данные механизмы являются конкурирующими и зависят от свойств конкретного изатина и катализатора. Механизм **A** включает декарбоксилирование с образованием енолята

in situ, как это происходит в реакции ароматических β -кетокислот с изатинами. Механизм **В**, напротив, протекает через нуклеофильное присоединение СН-кислоты к изатину с последующим декарбоксилированием. На рисунке выше представлены механизмы **А** и **В** на примере взаимодействия изатина с малоновой кислотой.

В литературе описаны оба механизма [295,296], однако с большей вероятностью в данном случае реализуется механизм **В**. Косвенным подтверждением этого факта являются следы недекарбоксилированного продукта, изредка наблюдаемые в ЯМР спектрах продуктов конденсации.

Ранее в нашей научной группе некоторые 3-гидрокси-2-оксиндолы уже были получены с помощью данной реакции с триэтиламином в диоксане или в смеси пиридина с пиперидином с хорошими выходами [257,259,294]. Однако реакции проходили при нагревании и занимали от 3 часов до нескольких дней в зависимости от природы и расположения функциональных групп в изатинах. Для получения большого числа разнообразных 3-гидрокси-2-оксиндолов было принято решение разработать экспресс-метод синтеза, в котором для ускорения прохождения реакции была применена микроволновая активация.

Оптимизация условий была проведена на модельной реакции 5-нитроизатина (**1a**) с малоновой кислотой (Рисунок 3.4, Таблица 3.1). В качестве реакционного сосуда была выбрана химическая пробирка, снабженная завинчивающейся крышкой, которая позволяла избежать потери растворителя вследствие выкипания. Активация реакции проводилась в бытовой микроволновой печи при различных значениях мощности (90-600W) в течение 5-20 минут. В качестве растворителя был выбран 1,4-диоксан, поскольку его дипольный момент равен нулю из-за симметричности структуры. Таким образом, он гораздо менее полярный, чем ДМФА или ТГФ, и медленнее разогревается и выкипает в условиях микроволнового облучения, что облегчает проведение реакции. Во избежание выкипания реакционной смеси облучение проводили дробно, по 2,5 минуты с охлаждением реакционного сосуда до комнатной температуры. Полноту протекания реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), в качестве элюента использовалась смесь этилацетат/петролейный эфир (EtOAc/ПЭ) в соотношении 3:1,

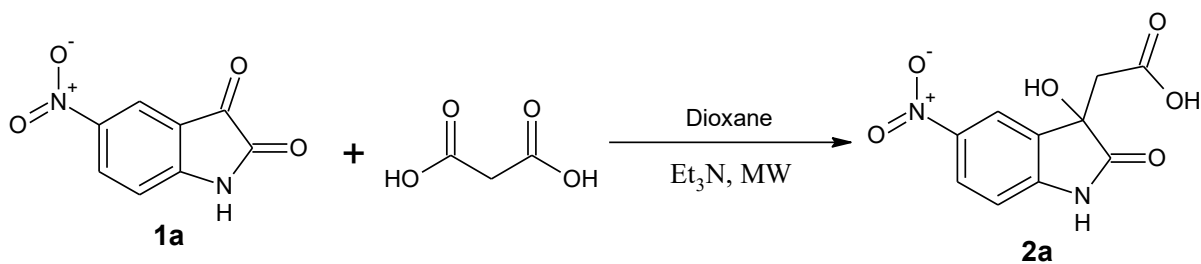


Рисунок 3.4. Модельная реакция 5-нитроизатина **1a** с малоновой кислотой.

Таблица 3.1. Оптимизация мощности и времени микроволнового облучения в модельной реакции 5-нитроизатина **1a** с малоновой кислотой.

| № | Мощность, W | Время, мин. | Комментарий |
|---|-------------|-------------|-------------------------------|
| 1 | 90 | 20 | Следов продукта не обнаружено |
| 2 | 180 | 20 | Неполная конверсия |
| 3 | 360 | 10 | Полная конверсия |
| 4 | 600 | 5 | Осмоление |

Было показано (Таблица 3.1, строка 3), что при конденсации изатинов с малоновой кислотой полная конверсия достигается за 10 минут при микроволновом облучении мощностью в 360W. Дополнительно был проведен опыт с использованием микроволнового реактора Monowave 300 (Anton Paar). При нагревании (120°C ≈ 3W) и интенсивном перемешивания на (600 rpm) полной конверсии 5-нитроизатина удалось достичь за 6 минут, что говорит о равнозначности бытовой микроволновой печи и микроволнового реактора при проведении данной реакции.

При проведении модельной реакции 5-нитроизатина **1a** с малоновой кислотой выяснилось, что эквимольное соотношение реагентов не приводит к полной конверсии исходного изатина. Поэтому была проведена дополнительная оптимизация соотношений реагентов в реакциях 5-нитроизатина **1a** с малоновой и циануксусной кислотами (Рисунок 3.5). Полноту протекания реакции контролировали методом ТСХ (элюент EtOAc/ПЭ 3:1).

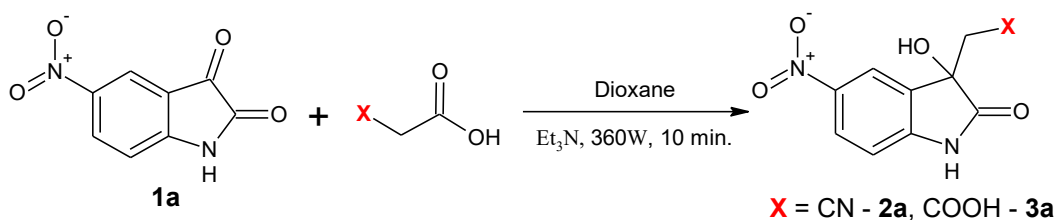


Рисунок 3.5. Модельная реакция 5-нитроизатина **1a** с малоновой и циануксусной кислотами.

Таблица 3.2. Оптимизация соотношения реагентов в модельной реакции 5-нитроизатина **1a** с малоновой и циануксусной кислотами.

| № | Кислота | Эквивалент* кислоты | Эквивалент* триэтиламина | Комментарий |
|---|----------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1 | Малоновая кислота | 1 | 1 | Неполная конверсия |
| 2 | | 1 | 2 | |
| 3 | | 2 | 1 | |
| 4 | | 2 | 2 | Полная конверсия |
| 5 | | 2 | 1,5 | |
| 6 | Циануксусная кислота | 1 | 1 | Полная конверсия |
| 7 | | 1 | 0,5 | |
| 8 | | 1 | 0,25 | |
| 9 | | 1 | 0 | Следов продукта не обнаружено |

*Количество вещества 5-нитроизатина принято за 1 эквивалент.

Из Таблицы 3.2 видно, что для реакции конденсации изатинов с малоновой и циануксусной кислотами наиболее оптимальное соотношение изатин/кислота/триэтиламин составляет 1/2/1,5 для реакции с малоновой кислотой и 1/1/0,25 для реакции с циануксусной кислотой. Вероятно, под действием микроволнового облучения и, соответственно, при нагревании реакционной смеси малоновая кислота декарбоксилируется с образованием уксусной кислоты, которая в данных условиях в реакцию с изатином не вступает, что вновь косвенно подтверждает, что реакция протекает по механизму **B** (Рисунок 3.3). Для реакции изатина с малоновой кислотой также требуется больше триэтиламина, так как он в первую очередь образует соли с двумя её кислотными остатками, прежде чем снимает протон с углерода. При оптимизации мы стремились к использованию наименьшего количества триэтиламина, однако было показано, что в данной реакции он может выступать не только в роли катализатора, но и в роли растворителя – реакция 5-нитроизатина **1a** с малоновой и циануксусной кислотами в чистом триэтилаmine также приводила к полной конверсии исходного изатина в соответствующий 3-гидрокси-2-оксиндол **2a** или **3a**.

При помощи разработанной методики синтеза 3-гидрокси-2-оксиндолов под действием микроволнового излучения была получена серия производных изатина с донорными и акцепторными заместителями в 5 и 7 положениях. Параллельно для выявления основных преимуществ синтеза 3-гидрокси-2-оксиндолов под действием микроволнового излучения

перед традиционным методом, был проведен аналогичный синтез в условиях термической активации, т.е. с кипячением на лабораторной плитке с обратным холодильником (Рисунок 3.6, Таблица 3.3). Состав реакционных смесей оставался неизменным для каждого из двух методов.

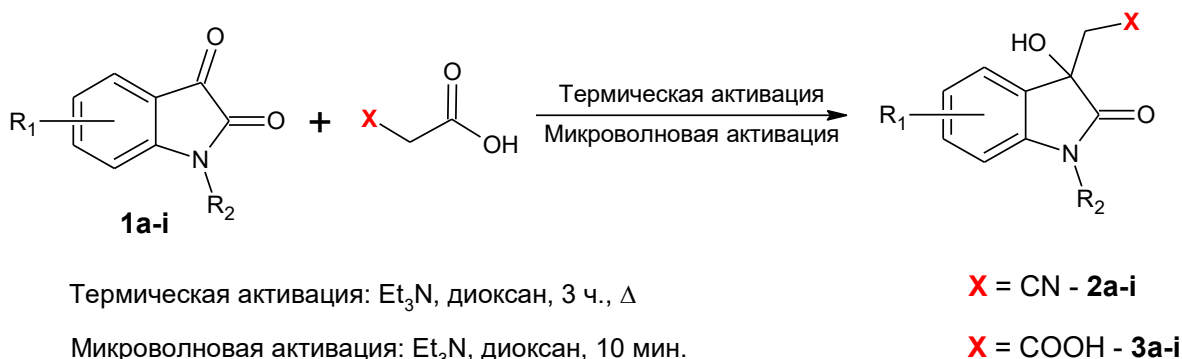


Рисунок 3.6. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов **2a-i** и **3a-i** методами термической или микроволновой активации.

Таблица 3.3. Выходы 3-гидрокси-2-оксиндолов **2a-i** и **3a-i**, полученных методами термической или микроволновой активации.

| № | R ₁ , R ₂ | X | Выход, % (МА*) | Выход, % (ТА†) |
|-----------|--|------|----------------|----------------|
| 2a | 5-NO ₂ | CN | 77 | 98 |
| 3a | | COOH | 86 | 87 |
| 2b | 7-NO ₂ | CN | 67 | 76 |
| 3b | | COOH | 97 | 93 |
| 2c | 5-OCH ₃ | CN | 60 | 70 |
| 3c | | COOH | 61 | 50 |
| 2d | 5-OCH ₃ , 4-NO ₂ | CN | 43 | 55 |
| 3d | | COOH | 71 | 73 |
| 2e | 5-OCH ₃ , 7-NO ₂ | CN | 80 | 73 |
| 3e | | COOH | 79 | 84 |
| 2f | 5,7-NO ₂ | CN | 81 | 77 |
| 3f | | COOH | 78 | 71 |
| 2g | H | CN | 66 | 61 |
| 3g | | COOH | 76 | 70 |
| 2h | 5-Br | CN | 72 | 79 |
| 3h | | COOH | 77 | 80 |
| 2i | 1-Bn, 5-OMe | CN | 60 | - |
| 3i | | COOH | 56 | - |

*МА – микроволновая активация; †ТА – термическая активация

Хотя выходы аддуктов присоединения кислот к изатинам, полученных с помощью традиционной методики сравнимы с полученными с помощью микроволновой активации, традиционный метод все же имеет несколько заметных недостатков. Во-первых, реакция под действием микроволнового излучения проходит заметно быстрее (5-10 минут вместо 1,5-3 часов). А во-вторых, конечные соединения, полученные традиционным методом сильнее

загрязнены продуктами побочных реакций, в частности, продуктом элиминирования гидроксигруппы, и требуют дополнительной очистки.

3.2. Синтез 3-замещенных 2-оксиндолов без гидроксигруппы

Как было сказано выше, в нашей научной группе уже было получено несколько биологически активных 2-оксиндолов, как с гидроксигруппой в 3-положении оксиндольного цикла, так и без неё, однако данные о биологической активности данных производных скудны и разрозненны. Так, метод получения 5-метокси-3-цианометил-2-оксиндола без 3-гидроксигруппы (**5c**) описан в статье (Рисунок 3.7) [297].

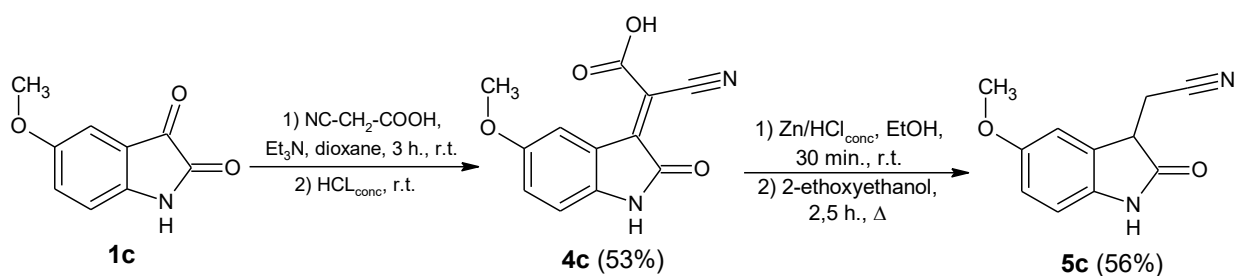


Рисунок 3.7. Синтез 5-метокси-3-цианометил-2-оксиндола **5c** [297].

По схожей методике, но с использованием уксусной кислоты и её ангидрида, был получен 5-ацетамидо-3-цианометил-2-оксиндол [257], который показал сравнительно высокую аффинность по отношению к NQO2 ($IC_{50} = 20,7 \pm 2,6$ мкМ) и способность снижать ВГД нормотензивных кроликов почти на 3 мм.рт.ст [258]. Его аналог с 3-гидроксигруппой также был синтезирован, однако не проходил биологических испытаний [257]. Таким образом, полученные данные не позволяют однозначно судить о том, способствует ли гидроксигруппа усилению биологического отклика 3-замещенных 2-оксиндолов и увеличению их аффинности к NQO2. Поэтому по описанной ранее методике [257,297] нами была получена серия 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов, не содержащих 3-гидроксигруппу (Рисунок 3.8, Таблица 3.4).

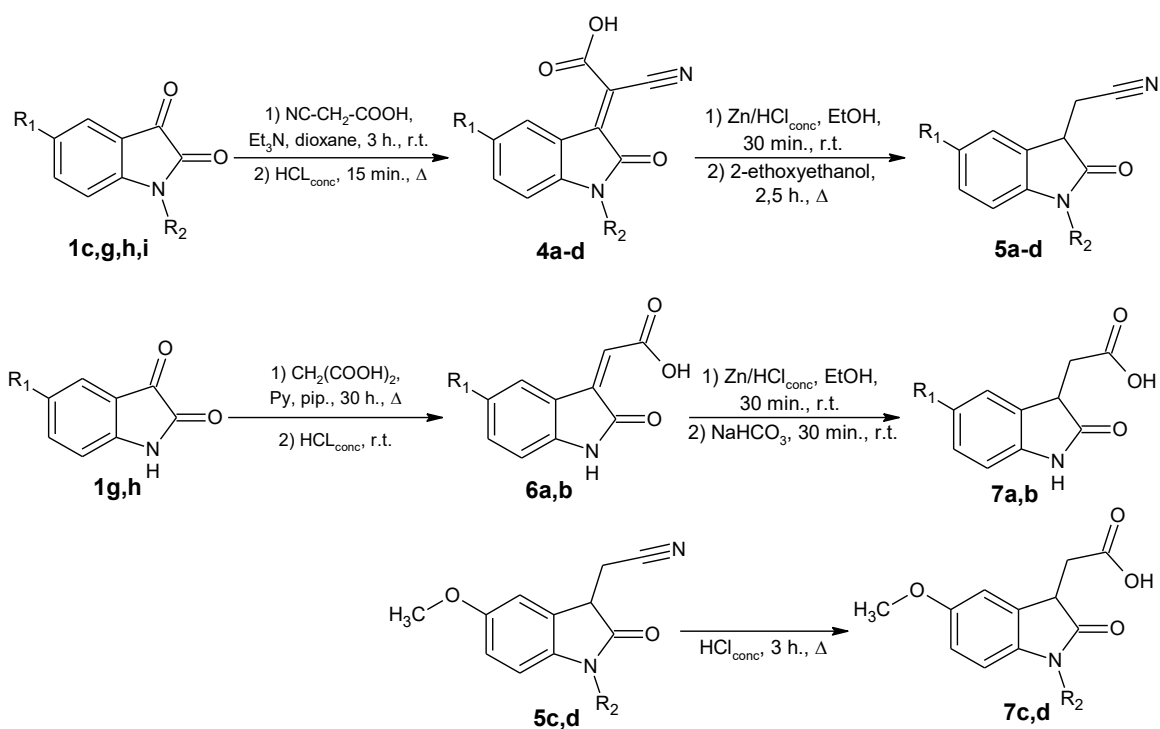


Рисунок 3.8. Синтез 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **5a-d** и **7a-d**.

Таблица 3.4. Выходы 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов.

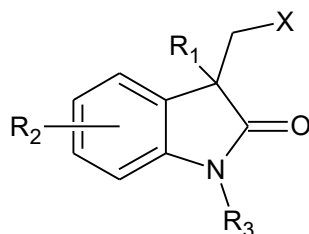
| Изатин | R ₁ | R ₂ | № | Выход, % | № | Выход, % | № | Выход, % | № | Выход, % |
|-----------|----------------|----------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| 1g | H | H | 4a | 85 | 5a | 69 | 6a | 58 | 7a | 77 |
| 1h | Br | H | 4b | 81 | 5b | 45 | 6b | 20 | 7b | 68 |
| 1c | OMe | H | 4c | 53 | 5c | 52 | | | 7c | 96 |
| 1i | OMe | Bn | 4d | 68 | 5d | 69 | | | 7d | 51 |

При конденсации изатинов с малоновой кислотой использование триэтиламина в качестве катализатора не приводило к полной конверсии продуктов даже при двукратном избытке, поэтому было принято решение использовать более сильное органическое основание – пиперидин. Кроме того, использование пиперидина приводит к дополнительной активации 3 положения изатина, так как образуется иминиевый катион, более активный, чем кето-группа. В процессе реакции выяснилось, что 5-метокси-3-цианометил-2-оксиндолы **5c,d** неустойчивы в кислой среде. При длительном кипячении в концентрированной соляной кислоте их циано-группа гидролизуется до кислоты. Этот эффект был использован для получения 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **7c** и **7d**.

3.3. Исследование биологической активности 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов²

Поскольку ранее в нашей научной было показано, что производные оксиндолов могут эффективно снижать внутриглазное давление, следующим этапом нашей работы стала проверка биологической активности всех полученных соединений *in vitro* и *in vivo* (Таблица 3.5).

Таблица 3.5. Биологическая активность 3-гидрокси-2-оксиндолов.



| № | X | R ₁ | R ₂ , R ₃ | Ингибирование NQO2 в 10 мкМ, % (IC ₅₀ , мкМ) | ΔВГД _{макс} , мм.рт.ст. |
|----|------|----------------|--|---|-------------------------------------|
| 2a | CN | OH | 5- NO ₂ | -6,91 | н/т† |
| 2b | CN | OH | 7-NO ₂ | н/т | н/т |
| 2c | CN | OH | 5-OCH ₃ | н/т | 3,88 |
| 2d | CN | OH | 4-NO ₂ , 5-OCH ₃ | н/т | н/т |
| 2e | CN | OH | 5-OCH ₃ , 7-NO ₂ | н/т | н/т |
| 2f | CN | OH | 5,7-NO ₂ | -9,23 | 1,13 |
| 2g | CN | OH | H | н/т | н/т |
| 2h | CN | OH | 5-Br | 22,57 | 5,25 |
| 2i | CN | OH | 5-OCH ₃ , 1-Bn | 46,97 (77,4±27,3) | 5,60 |
| 3a | COOH | OH | 5- NO ₂ | 11,96 | н/т |
| 3b | COOH | OH | 7-NO ₂ | н/т | н/а* |
| 3c | COOH | OH | 5-OCH ₃ | 43,92 (38,6±10,9) | 2,03 |
| 3d | COOH | OH | 4-NO ₂ , 5-OCH ₃ | 51,19 | н/а |
| 3e | COOH | OH | 5-OCH ₃ , 7-NO ₂ | н/т | н/т |

² Изучение ингибирующей активности по отношению к NQO2 проводилось совместно с группой академика А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград), изучение гипотензивного эффекта проводилось совместно с лабораторией д.б.н. Чесноковой Н.Б. (НИИ Глазных Болезней им. Гельмгольца, Москва).

Таблица 3.5 (продолжение). Биологическая активность 3-гидрокси-2-оксиндолов.

| № | X | R ₁ | R ₂ , R ₃ | Ингибирование NQO2 в 10 мкМ, % (IC ₅₀ , мкМ) | ΔВГД _{макс} , мм.рт.ст. |
|------------------|------|----------------|---------------------------------|---|-------------------------------------|
| 3f | COOH | OH | 5,7-NO ₂ | 10,09 | н/т |
| 3g | COOH | OH | H | н/т | 2,50 |
| 3h | COOH | OH | 5-Br | 23,09 | 2,40 |
| 3i | COOH | OH | 5-OCH ₃ , 1-Bn | н/т | 3,00 |
| 5a | CN | H | H | 45,96 | 2,96 |
| 5b | CN | H | 5-Br | 36,23 | 2,25 |
| 5c | CN | H | 5-OCH ₃ | 40,48 | 3,17 |
| 5d | CN | H | 5-OCH ₃ , 1-Bn | 49,62 | н/р‡ |
| 7a | COOH | H | H | 26,99 | 4,33 |
| 7b | COOH | H | 5-Br | 35,89 | 1,33 |
| 7c | COOH | H | 5-OCH ₃ | 56,78 | 1,20 |
| 7d | COOH | H | 5-OCH ₃ , 1-Bn | н/т | 1,43 |
| Кверцетин | | | | 98 (0,08) | н/т |
| Мелатонин | | | | 85,2 (63,5±26,7) | 2,71 |
| Тимолол | | | | н/т | 3,00 |

* н/а – неактивны; † н/т – не тестировались; ‡ н/р – нерастворимы в фосфатном буферном растворе

Как видно из Таблицы 3.5, явной связи между аффинностью к ферменту хинооксидоредуктаза 2 (NQO2) и биологической активностью *in vivo* не прослеживается. Более того, гипотензивным эффектом обладают как ингибиторы NQO2 (например, **2i** и **3c**), так и его слабые активаторы (например, **2f**). Тем не менее, наилучшую активность как на ферменте, так и *in vivo*, проявило соединение **2i**, содержащее метокси-группу в 5 положении и бензильную группу в 1 положении оксиндольного цикла. Его аналог с 3-карбоксиметильной группой **3i** продемонстрировал гипотензивный эффект чуть выше среднего. Из анализа Таблицы 3.5 можно сделать вывод, что 2-оксиндолы с 3-цианометильной группой, в среднем, способствуют лучшему биологическому отклику, чем их аналоги с 3-карбоксиметильной группой. Однако неожиданный результат продемонстрировал 3-карбоксиметил-2-оксиндол

7a, став одним из трех наиболее активных 2-оксиндолов из серии и показав большую эффективность, чем его аналоги с 3-гидрокси-группой (Рисунок 3.9).

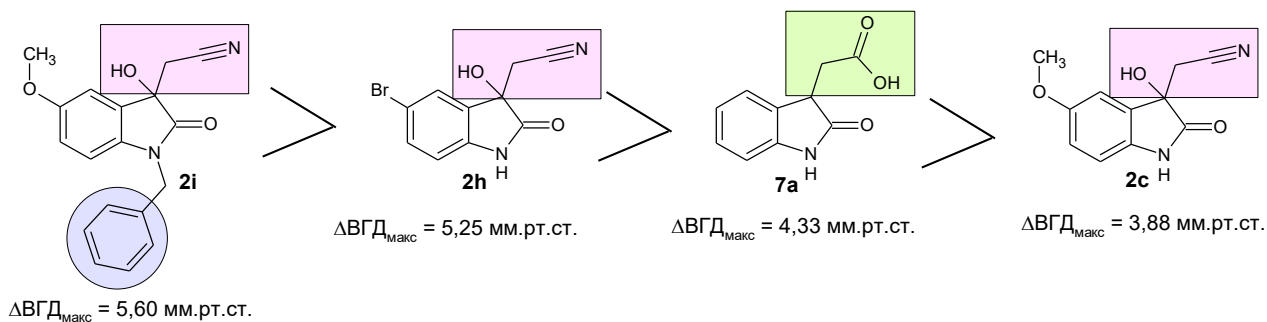


Рисунок 3.9. Соединения-лидеры по снижению ВГД.

Опираясь на структуры соединений-лидеров, представленных на Рисунке X, мы пришли к выводу, что для увеличения гипотензивного эффекта 2-оксиндолов необходимо наличие арильного фрагмента структуре соединения. Также выдвинута гипотеза о предпочтительном сочетании гидрокси и цианометильной групп в 3 положении оксиндольного кольца.

3.4. Синтез 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов³

Так как анализ данных биологических испытаний показал, что наличие арильного фрагмента в структуре 2-оксиндола положительно влияет на гипотензивный эффект соединения, было принято решение синтезировать серию 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов вышеописанным (раздел 3.1) экспресс-методом (Рисунок 3.10, Таблица 3.6).

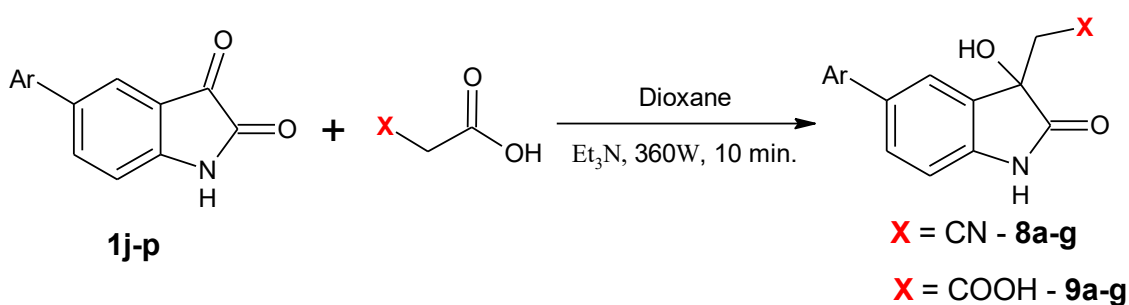
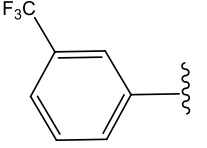
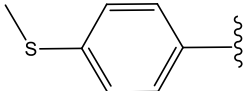
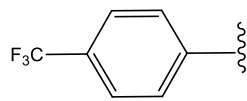
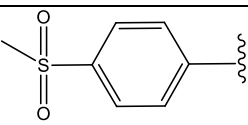
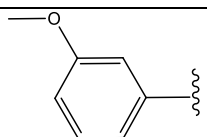
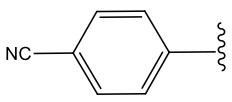
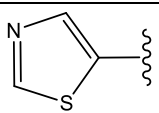


Рисунок 3.10. Синтез 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g**.

³ Исходные 5-арил-замещенные изатины (**1j-p**) были предоставлены к.х.н., Куркиным А.В. и к.х.н. Ивановым В.Н.

Таблица 3.6. Выходы 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g**.

| Ar | № | X | Выход, % | Ar | № | X | Выход, % |
|---|-----------|------|----------|--|-----------|------|----------|
|  | 8a | CN | 43 |  | 8e | CN | 76 |
| | 9a | COOH | 49 | | 9e | COOH | 71 |
|  | 8b | CN | 88 |  | 8f | CN | 64 |
| | 9b | COOH | 73 | | 9f | COOH | 75 |
|  | 8c | CN | 65 |  | 8g | CN | 82 |
| | 9c | COOH | 77 | | 9g | COOH | 74 |
|  | 8d | CN | 43 | | | | |
| | 9d | COOH | 40 | | | | |

Молекулярное моделирование связывания полученных соединений с активным сайтом фермента NQO2 (PDB-код: QWX) показало, что аддукты **8a-g** и **9a-g** могут эффективно связываться с ферментом, причем наименьшую энергию связывания показало соединение **8f** ($\Delta G_m = -12,01$ ккал/моль), оказавшаяся по результатам исследований *in silico* более аффинным, чем мелатонин ($\Delta G_m = -8,41$ ккал/моль) (Рисунок 3.11).

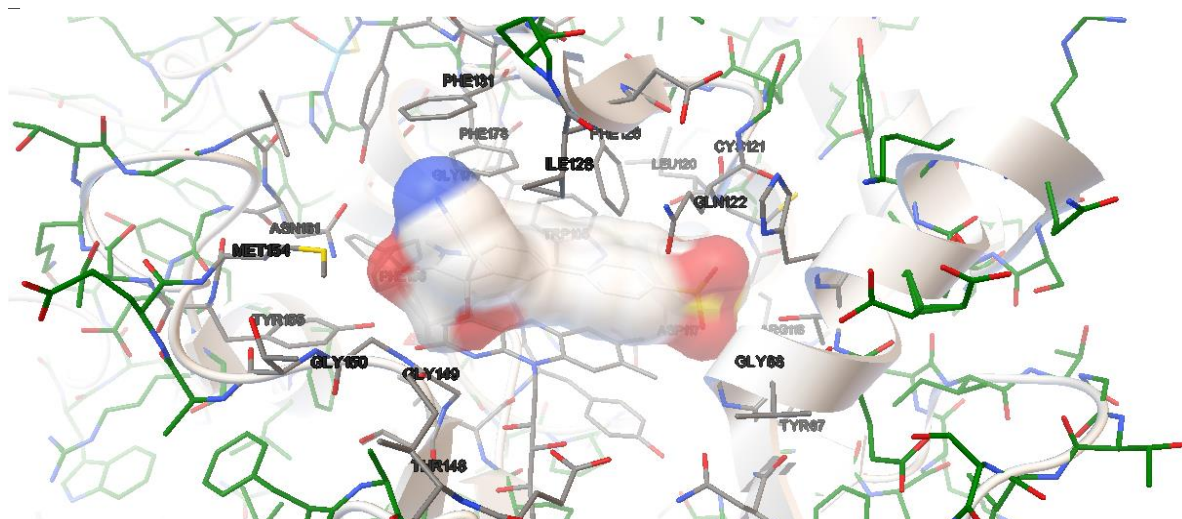
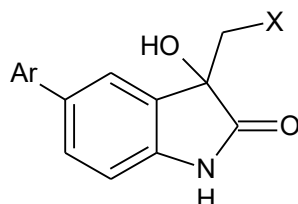


Рисунок 3.11. Молекулярное моделирование связывания 3-гидрокси-3-(цианометил)-5-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-оксиндола (**8f**) с ферментом NQO2 (PDB-код: QWX).

3.5. Исследование биологической активности 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов⁴

После многообещающих результатов молекулярного моделирования было решено протестировать биологическую активность всех полученных соединений *in vitro* на ферменте NQO2 и *in vivo* на нормотензивных кроликах (Таблица 3.7, Рисунок 3.12).

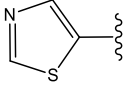
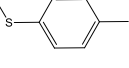
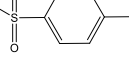
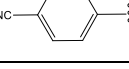
Таблица 3.7. Биологическая активность 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g**.



| № | X | Ar | Ингибирование NQO2 в 10 мкМ, % | Δ ВГД _{макс.} , мм.рт.ст. |
|----|------|----|--------------------------------|---|
| 8a | CN | | 20,29 | н/р* |
| 8b | CN | | 1,06 | н/р |
| 8c | CN | | 21,68 | н/р |
| 8d | CN | | 9,08 | 2,00 |
| 8e | CN | | 4,66 | н/р |
| 8f | CN | | 10,47 | 1,40 |
| 8g | CN | | 1,96 | н/р |
| 9a | COOH | | -0,82 | н/р |
| 9b | COOH | | 2,37 | н/р |
| 9c | COOH | | 2,45 | н/р |

⁴ Изучение ингибирующей активности по отношению к NQO2 проводилось совместно с группой академика А.А. Спасова (ВолГМУ, Волгоград), изучение гипотензивного эффекта проводилось совместно с лабораторией д.б.н. Чесноковой Н.Б. (НИИ Глазных Болезней им. Гельмгольца, Москва).

Таблица 3.7 (продолжение). Биологическая активность 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксидолов **8a-g** и **9a-g**.

| № | X | Ar | Ингибирование NQO2 в 10 мкМ, % | ΔВГД _{макс.} , мм.рт.ст. |
|------------------|------|---|--|-----------------------------------|
| 9d | COOH |  | 7,94 | н/р |
| 9e | COOH |  | 4,17 | н/р |
| 9f | COOH |  | 9,08 | н/р |
| 9g | COOH |  | 5,40 | н/р |
| Кверцетин | | | 98 (IC ₅₀ 0,08 мкМ) | н/т† |
| Мелатонин | | | 85,2 (IC ₅₀ 63,5±26,7 мкМ) | 2,71 |
| Тимолол | | | н/т | 3,00 |

* н/р – нерастворимы в фосфатном буферном растворе; † н/т – не тестировались

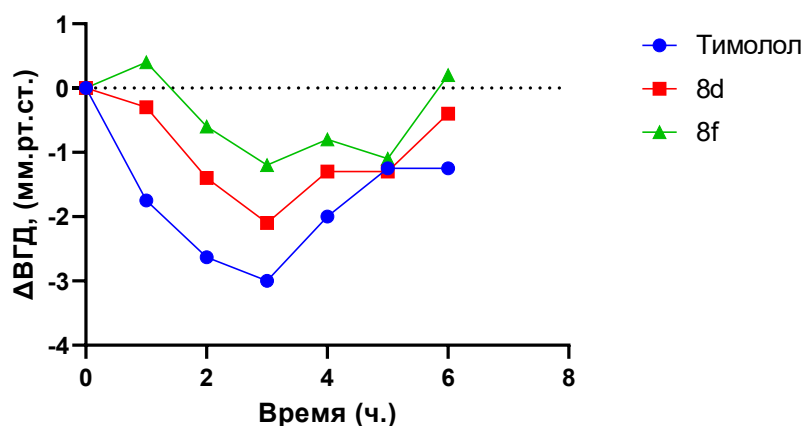


Рисунок 3.12. График изменения ВГД после введения 50 мкл 0,1% раствора соединений **8d** и **8f**.

Из результатов биологических исследований видно, что введение объемного гидрофобного фрагмента в пятое положение 2-оксидольного цикла привело к значительному ухудшению растворимости соединений в фосфатном буферном растворе. Это ограничение сделало невозможным проведение полноценной оценки гипотензивной активности данных соединений на модели нормотензивных кроликов. Дополнительным осложнением стало то, что, вопреки обнадеживающим результатам молекулярного моделирования, максимальная

степень ингибирования фермента NQO2 при концентрации 10 мкМ не превышала 22%, что свидетельствует об отсутствии значимой ингибирующей активности у всех синтезированных соединений в отношении данной мишени.

3.6. Синтез amino-замещенных 2-оксиндолов

Противоречие между весьма многообещающими результатами молекулярного моделирования и низкой биологической активностью полученных 5-арил-замещенных 2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g** можно объяснить низкой растворимостью соединений в буферном растворе, а также, возможно, ограниченной подвижностью арильной группы в 5 положении. Для решения обеих проблем было решено ввести арильный заместитель через линкер, способный повысить гидрофильность соединения.

В предыдущих работах нашей научной группы [257,259,297] уже была разработана методика восстановления нитро-группы в оксиндолах с одновременным восстановлением двойной связи и ацилированием (Рисунок 3.13).

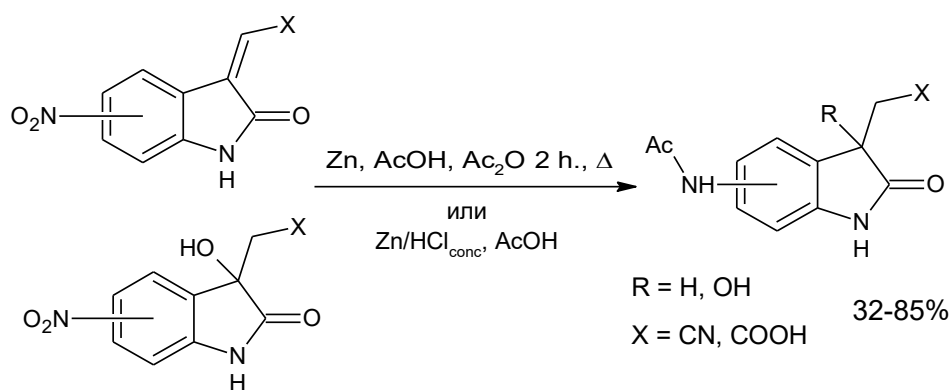


Рисунок 3.13. Восстановление нитро-оксиндолов до ацетамид-оксиндолов [259].

Однако препаративно данная методика неудобна, так как соли цинка способны образовывать комплексы с полученными амидами. Это сильно затрудняет выделение и загрязняет полученный продукт солями переходных металлов, что нежелательно при синтезе фармакологических препаратов.

Поэтому нами было предпринято несколько попыток разработать методику восстановления 5-нитро-2-оксиндолов, которая бы не включала использование переходных металлов и их солей, а также не затрагивала гидроксид и циано-группы. Наше внимание привлекли методики восстановления нитро-группы с использованием трихлорсилана и дитионита натрия. Была проведена первичная оптимизация методик восстановления 5-нитроизатина (Рисунок 3.14, Таблица 3.8). Полноту протекания реакции контролировали методом ТСХ (элюент EtOAc/ПЭ 3:1).



Рисунок 3.14. Восстановление 3-гидрокси-5-нитро-3-цианометил-2-оксиндола **2a**.

Таблица 3.8. Условия восстановления 3-гидрокси-5-нитро-3-цианометил-2-оксиндола **2a**.

| № | Условия реакции | Ссылка | Комментарий |
|---|--|--------|---|
| 1 | HSiCl ₃ ; Et ₃ N; MeCN; 0°C; 18 ч. | [298] | Неидентифицируемая смесь веществ |
| 2 | Na ₂ S ₂ O ₄ ; MeOH/H ₂ O; 90°C; 1 ч. | [299] | Неполная конверсия, низкая растворимость 5-нитро-оксиндола |
| 3 | 3 экв. Na ₂ S ₂ O ₄ ; диоксан/H ₂ O; 90°C; 1 ч. | | Полная конверсия |
| 4 | Zn/HClконц; EtOH/EtOAc; 25°C; 3 ч. | [259] | Полная конверсия |

Хотя восстановление 5-нитро-оксиндола с помощью трёх эквивалентов дитионита натрия прошло успешно со 100% конверсией, выделенный продукт представляет из себя смесь двух веществ. Предположительно, это 5-амино (**10a**) и 5-гидроксиламино (**10a'**) производные 3-гидрокси-3-цианометил-оксиндола (Рисунок 3.15).

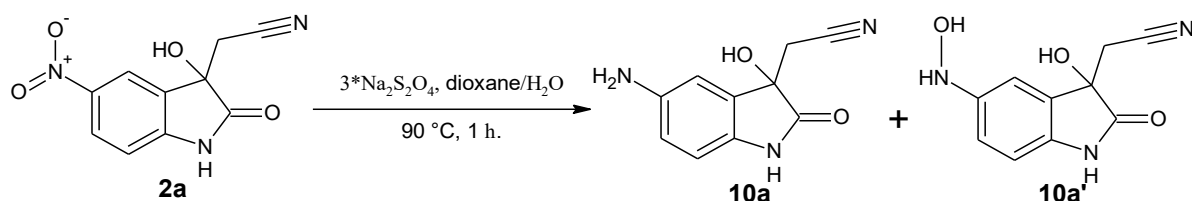


Рисунок 3.15. Восстановление 3-гидрокси-5-нитро-3-цианометил-2-оксиндола **2a** с помощью дитионита натрия.

Увеличение количества дитионита натрия до шести эквивалентов также не привело к образованию монопродукта восстановления.

Наиболее удачной оказалась классическая реакция восстановления 5-нитро-оксиндола с помощью цинка в соляной кислоте. С её помощью был получен 5-амино-3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндол с относительно высоким выходом (62%) (Рисунок 3.16).

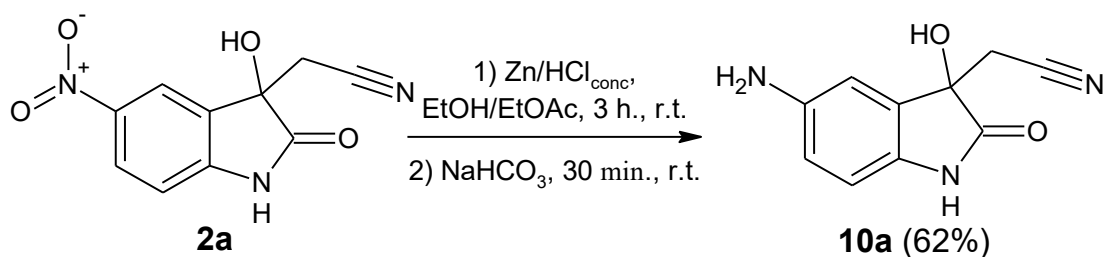


Рисунок 3.16. Восстановление 3-гидрокси-5-нитро-3-цианометил-2-оксиндола **2a** цинком в соляной кислоте.

Аналогичная методика, описанная ранее в работах нашей научной группы [257,259], была применена для получения 5-амино-3-цианометил-2-оксиндола **10b** (Рисунок 3.17).

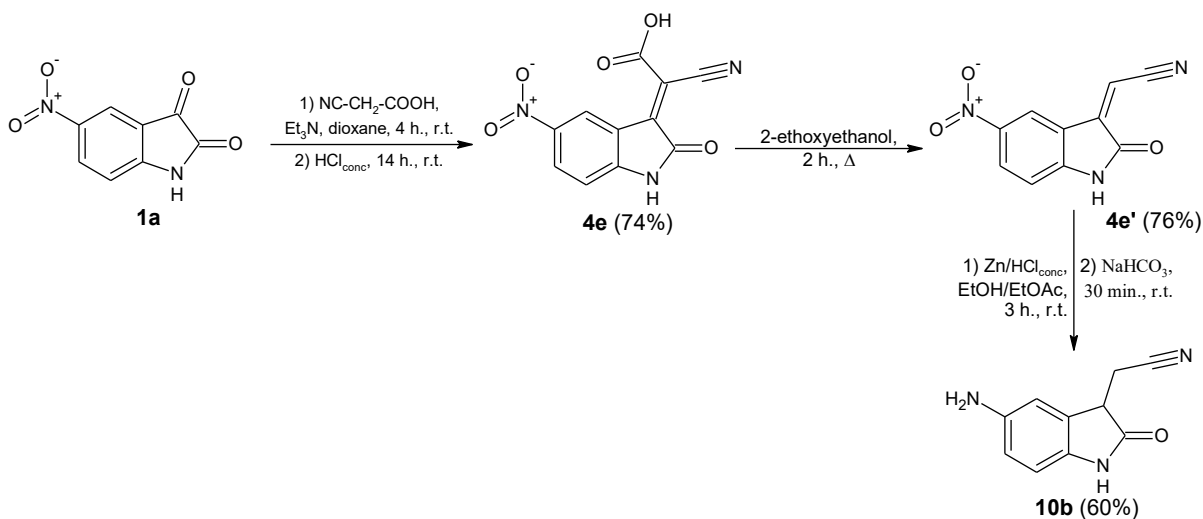


Рисунок 3.17. Конденсация 5-нитроизатина **1a** с циануксусной кислотой и восстановление продукта цинком в серной кислоте.

При попытке синтезировать по аналогичной методике 5-амино-3-карбоксиметил-2-оксиндол **10c** выяснилось, что продуктом конденсации 5-нитроизатина **1a** с малоновой кислотой в смеси пиридина и пиперидина является 3-гидрокси-3-карбоксиметил-5-нитро-2-оксиндол **3a** (Рисунок 3.18). Кипячения в течение 15 минут в концентрированной соляной кислоте недостаточно для полной дегидратации 3-гидрокси-2-оксиндола **3a**, поэтому время реакции было увеличено до 3 часов.

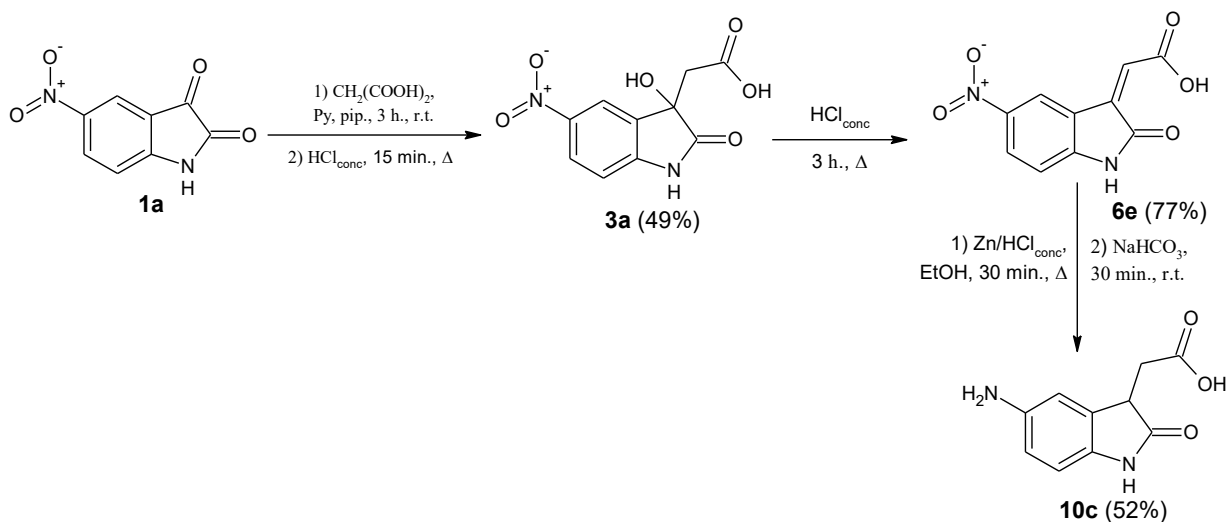


Рисунок 3.18. Конденсация 5-нитроизатина с малоновой кислотой и восстановление продукта цинком в серной кислоте.

В результате из 3-гидрокси-2-оксиндола **3a** получена оксиндол-3-илиденуксусная кислота **6e** с выходом 77%, которая была восстановлена в цинком в соляной кислоте с получением 5-амино-3-карбоксиметил-2-оксиндола **10c** с выходом 52%. Продукты реакции восстановления **10b** и **10c** получены с относительно невысокими выходами из-за сложностей в выделении, обусловленных высокой растворимостью соединений **10b** и **10c** в воде, а также их способностью образовывать комплексы с солями цинка.

3.7. Синтез 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов

Полученные соединения **10a-c** были введены в реакцию восстановительного аминирования вместе с замещенными ароматическими альдегидами с использованием цианоборгидрида натрия и безводного хлорида цинка (Рисунок 3.19, Таблица 3.9). Основные усилия были сосредоточены на получении 3-гидокси-3-цианометил производных **11a-i**, так как именно такое сочетание функциональных групп, судя по результатам предыдущих исследований, способствует наибольшему гипотензивному эффекту. Однако было получено и несколько 3-цианометил (**12a-e**) и 3-карбоксиметил (**13a,b**) производных без гидроксигруппы для сравнения их активности.

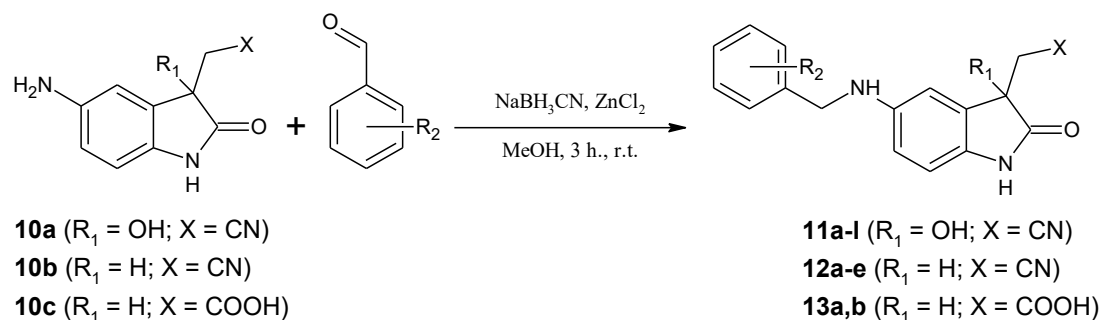


Рисунок 3.19. Реакция восстановительного аминирования 5-амино-оксиндолов **10a-c**.

Таблица 3.9. Выходы продуктов восстановительного аминирования 5-амино-оксиндолов **10a-c**.

| № | R ₂ | Выход, % | № | R ₂ | Выход, % |
|------------|----------------------|----------|------------|----------------|----------|
| 11a | 2-OMe | 81 | 11g | 4-OMe | 51 |
| 11b | 4-Cl | 72 | 11h | 2,4-OMe | 66 |
| 11c | 4-F | 58 | 11i | 2,5-OMe | 79 |
| 11d | 4-пиридинил | 66 | 11j | 2,3,4-OMe | 76 |
| 11e | 4-OH | 49 | 11k | 3,4,5-OMe | 64 |
| 11f | 4-N(Me) ₂ | 55 | 11l | 2,5-OMe, 4-OH | 46 |
| 12a | 2-OMe | 71 | 12d | 4-OH | 57 |
| 12b | 4-Cl | 69 | 12e | 4-OMe | 54 |
| 12c | 2,5-OMe | 48 | | | |
| 13a | 2-OMe | 41 | 13b | 4-Cl | 25 |

Полученные соединения были выделены в чистом виде и в виде гидрохлоридов для увеличения растворимости в воде. Свободное вращение арильной группы вокруг связи C-N и наличие амина в структуре соединений позволило надеяться на улучшение их биодоступности и аффинности по отношению к NQO2, а также на усиление их гипотензивного эффекта.

Для оценки связывания полученных соединений с NQO2 были проведены исследования *in silico*. Молекулярное моделирование⁵ связывания соединения **11h** с активным сайтом NQO2 (PDB ID: 4GR9) представлено на рисунке 3.20.

⁵ Молекулярное моделирование и молекулярная динамика осуществлены совместно с группой А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград).

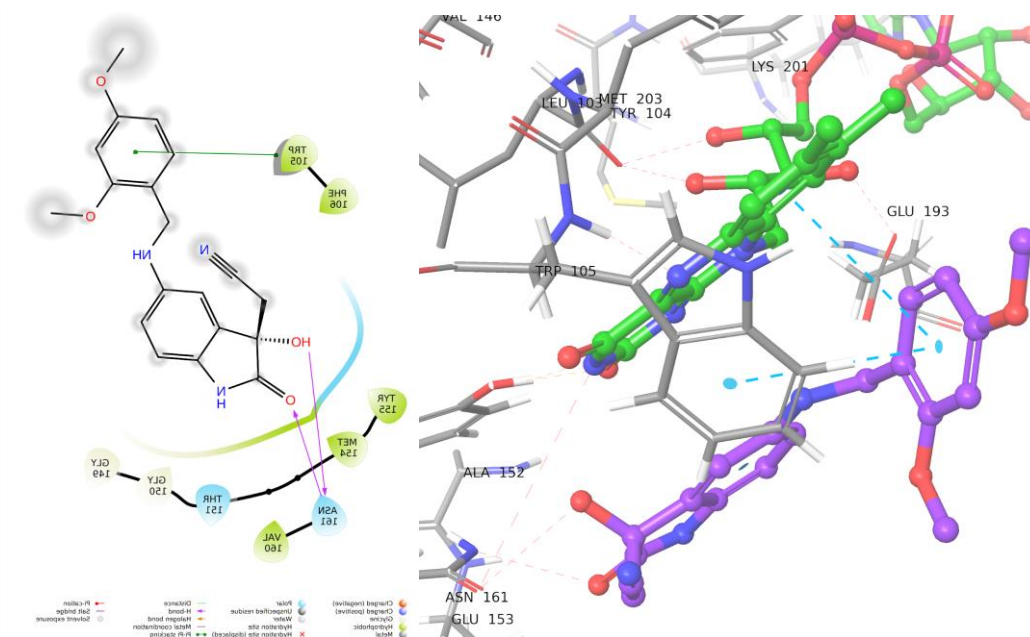


Рисунок 3.20. Молекулярное моделирование взаимодействия соединения **11h** с активным сайтом NQO2 (PDB ID: 4GR9). Фиолетовым изображена структура лиганда, зеленым – структура кофактора FAD.

Анализ данных молекулярного моделирования, показал, что соединение **11h** взаимодействует с NQO2 со значением энергии связывания $\Delta G_m = -6,27$ ккал/моль. Были обнаружены водородные связи между кислородом и гидроксильной группой оксиндольного фрагмента лиганда и остатком Asn161 фермента, с длинами связей 2,97 Å и 2,99 Å соответственно. Кроме того, бензольное кольцо соединения **11h** участвует в π - π -стекинг-взаимодействиях с остатком Trp105 и изоаллоксазиновым кольцом кофактора FAD, при расстояниях между центрами колец 4,77 Å и 4,59 Å соответственно.

Дополнительно было проведено молекулярно-динамическое моделирование, которое подтвердило стабильность комплекса NQO2–**11h** в течение 100 наносекунд. Это обусловлено взаимодействием лиганда с остатками Gly162 и Phe106, а также π - π -стекингом между **11h** и кофактором FAD (Рисунок 3.21).

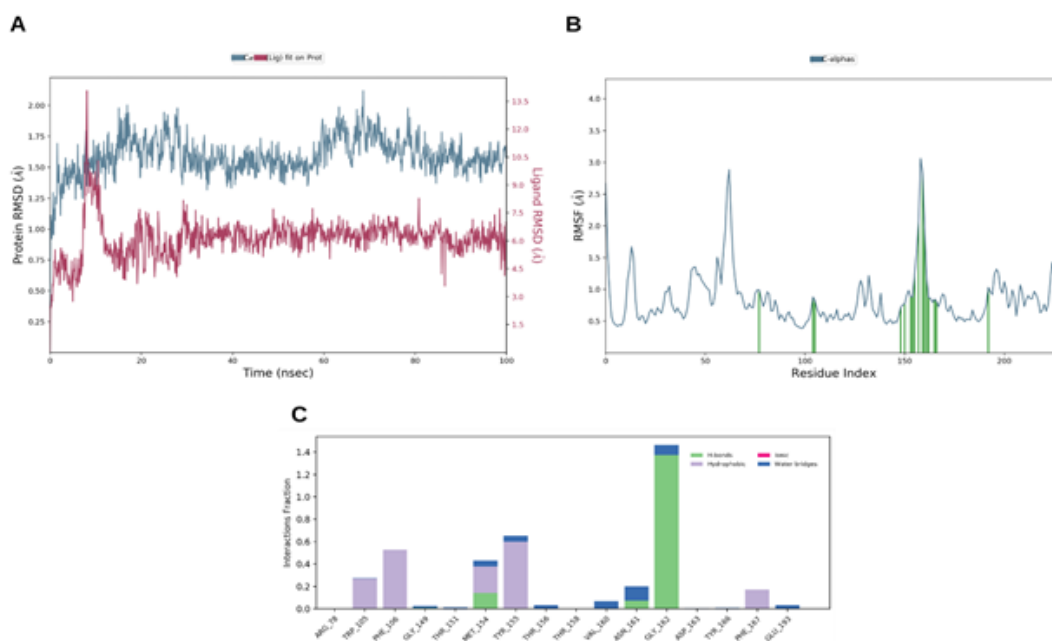


Рисунок 3.21. Результаты молекулярно-динамического (МД) моделирования комплекса NQO2–11h. (А) Среднеквадратичное отклонение (RMSD), (В) среднеквадратичная флуктуация (RMSF), (С) профиль межмолекулярных контактов.

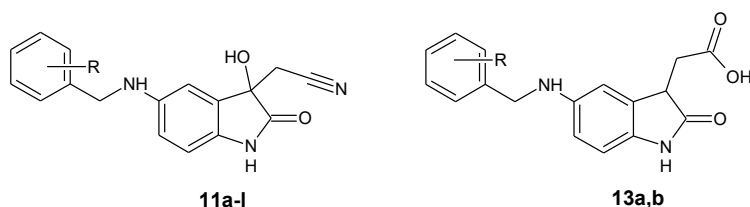
В течение 100 нс моделирования среднеквадратичное отклонение (RMSD) Ca -атомов белка варьировалось в диапазоне 0,92–2,12 Å, со средним значением ~1,53 Å, что указывает на стабильность белкового каркаса (Рисунок 3.21, А). Для лиганда **11h** RMSD изменялось от 2,40 до 14,06 Å (в среднем ~6,21 Å), стабилизировавшись после 12 нс. Также в первые несколько наносекунд наблюдался пик RMSD лиганда (14,06 Å), что, вероятно, связано с перестройкой его конформации из начального положения в более устойчивую внутри активного сайта. Анализ среднеквадратичной флуктуации (RMSF) показал, что флуктуации аминокислотных остатков находились в пределах 0,39–3,06 Å, с несколько повышенными значениями в области остатков 63 и 159, а также ближе к С-концу белка (Рисунок 3.21, В). В течение моделирования лиганд **11h** образовывал контакты с множеством аминокислотных остатков NQO2, включая Arg78, Trp105, Phe106, Gly149, Thr151, Met154, Tyr155, Thr156, Thr158, Val160, Asn161, Gly162, Asp163, Tyr166, Phe167 и Glu193, наиболее устойчивые взаимодействия поддерживались с Gly162 и Phe106, дополнительно были зафиксированы водородные связи и π - π -стекинг-взаимодействия между **11h** и кофактором FAD (Рисунок 3.21, С).

Полученные данные свидетельствуют о стабильности комплекса NQO2–11h на протяжении всего 100 нс МД-моделирования, что подтверждается умеренными значениями RMSD/RMSF и устойчивыми контактами лиганда с ключевыми остатками белка.

3.8. Исследование биологической активности 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов⁶

В исследованиях *in vivo* была оценена способность полученных соединений снижать ВГД нормотензивных кроликов, а в исследованиях *in vitro* – способность ингибировать NQO2 (Таблица 3.10, Рисунок 3.22).

Таблица 3.10. Биологическая активность 5-арилметиламин-замещенных производных 2-оксиндола.



| № | R | Ингибирование NQO2 в 100 мкМ, % | ΔВГД _{макс.} , мм.рт.ст. |
|------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 11a | 2-OMe | 48,89 | н/а* |
| 11b | 4-Cl | 69,62 | 3,67 |
| 11c | 4-F | 51,5 | н/а |
| 11d | 4-пиридинил | н/т† | 2,23 |
| 11e | 4-OH | н/т | н/а |
| 11f | 4-N(Me) ₂ | 26,35 | н/а |
| 11g | 4-OMe | н/т | н/а |
| 11h | 2,4-OMe | 87,21 (IC ₅₀ =39±8 мкМ) | 1,93 |
| 11i | 2,5-OMe | 34,12 | н/р‡ |
| 11j | 2,3,4-OMe | 51,15 | 2,80 |
| 11k | 3,4,5-OMe | 39,66 | 2,93 |
| 11l | 2,5-OMe, 4-OH | 32,07 | 3,33 |
| 13a | 2-OMe | н/т | 1,90 |
| 13b | 4-Cl | н/т | 1,13 |
| Кверцетин | | 98 (IC ₅₀ 0,08 мкМ) | н/т |
| Мелатонин | | 85,2 (IC ₅₀ 63,5±26,7 мкМ) | 2,71 |
| Тимолол | | н/т | 3,00 |

* н/а – неактивны; † н/т – не тестировались; ‡ н/р – нерастворимы в фосфатном буферном растворе

⁶ Изучение ингибирующей активности по отношению к NQO2 проводилось совместно с группой академика А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград), изучение гипотензивного эффекта проводилось совместно с лабораторией д.б.н. Чесноковой Н.Б. (НИИ Глазных Болезней им. Гельмгольца, Москва), изучение влияния полученных соединений на Fe²⁺-индуцированное перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс, а также изучение их способности к связыванию DPPH-радикалов проводилось совместно с группой д.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка).

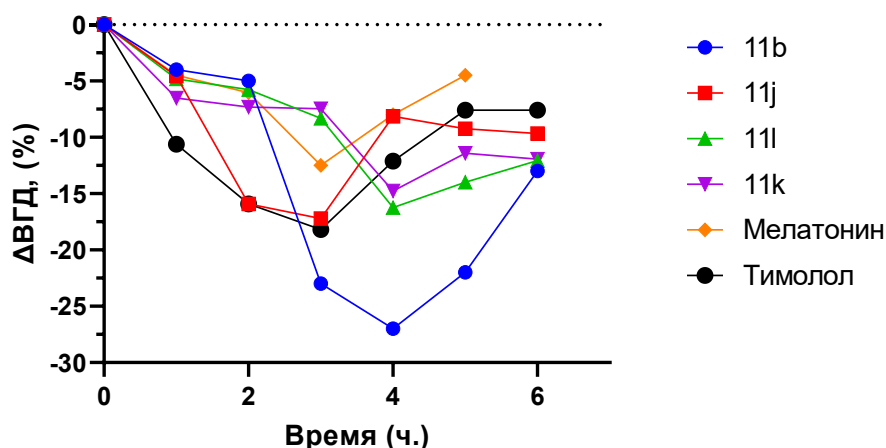


Рисунок 3.22. График изменения ВГД после введения 50 мкл 0,1% раствора соединений **11b,j-l**.

Все 3-цианометил-2-оксиндолы без гидроксигруппы (**12a-e**) оказались нерастворимы в фосфатном буферном растворе даже в солевой форме, тогда как для их 3-гидроксидных аналогов такой проблемы не наблюдалось, за исключением соединения **11i**.

Наибольший гипотензивный эффект продемонстрировало соединение **11b**, являясь в то же время весьма средним ингибитором NQO2, напротив, соединение **11h**, проявившее аффинность к NQO2 на уровне эндогенного гормона мелатонина, показало лишь незначительное снижение ВГД. Такое отсутствие корреляции между гипотензивным эффектом и взаимодействием с NQO2 свидетельствует о том, что полученные нами оксиндолы снижают ВГД, действуя, скорее всего, не через мелатониновый рецептор третьего подтипа, как предполагалось ранее, а через другую биологическую мишень.

Глаукома – многофакторное заболевание, связанное в том числе и с гибелью ганглиозных клеток сетчатки (ГКС). Следовательно, антиглаукомные препараты должны не только демонстрировать стабильный гипотензивный эффект, но также обладать нейропротекторными и антиоксидантными свойствами. Поэтому было исследовано влияние полученных соединений на Fe²⁺-индуцированное перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенате мозга крыс, а также была оценена их способность к связыванию DPPH-радикалов (Таблица 3.11).

Таблица 3.11. Влияние 5-арилметиламин-замещенных производных 2-оксиндола на перекисное окисление липидов и способность к связыванию DPPH-радикалов.

| № | Ингибирование Fe ²⁺ -индуцированного ПОЛ, IC ₅₀ , мкМ | Ингибирование активности связывания радикалов при 100 мкМ, % |
|-----|---|--|
| 11a | 4,794±0,564 | 56,4 ± 2,1 |
| 11b | 2,075±0,235 | 53,1 ± 1,5 |
| 11c | 5,129±0,592 | 54,3 ± 3,1 |
| 11f | 13,012±2,378 | н/т* |
| 11h | 2,750±0,534 | 51,3 ± 1,0 |
| 11i | 2,629±0,541 | 48,0 ± 1,6 |
| 11j | 4,111±0,766 | 50,6 ± 1,7 |
| 11k | 3,502±0,613 | 49,1 ± 0,5 |
| 11l | ≥ 100 | 54,9 ± 0,4 |

* н/т – не тестировались

Большинство исследованных соединений подавляют Fe²⁺-индуцированное перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс в микромолярном диапазоне, однако демонстрирую лишь небольшую антиоксидантную активность, снижая активность связывания радикалов на 50% в DPPH-тесте.

Из анализа результатов биологических исследований можно сделать вывод, что именно сочетание 3-гидрокси и 3-цианомельной группы позволяет получить наиболее активные ангиокомные соединения. Введение амино-группы положительно сказалось на растворимости соединений в воде, а арильный фрагмент в 5 положении цикла, по всей видимости, не способствует значительному улучшению биологического отклика. Таким образом, было принято решение заменить арилметиламинный фрагмент в 5 положении на сульфонамидный, что потенциально увеличит как водорастворимость соединений, так и их антиоксидантную активность.

3.9. Синтез 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов

Сульфонамидный фрагмент присутствует во многих соединениях и модулирует два важных для терапии глаукомы и сопутствующих ей заболеваний эффекта: антиоксидантный и антибактериальный. Кроме того, сульфонамидная группа обеспечивает связывание

соединения с металлоферментами, в частности, с карбоангидразами, поэтому большинство антиглаукомных ингибиторов карбоангидраз содержат в своей структуре этот фрагмент.

Мы предположили, что введение в пятое положение оксиндольного цикла сульфонамидной фармакофорной группы может заметно увеличить аффинность конечной структуры к карбоангидразам. Поэтому мы полагаем, что 3-гидрокси-5-сульфонамид-2-оксиндолы могут стать основой для создания мультитаргетных антиглаукомных препаратов.

В научной литературе описано несколько методик введения сульфонамидной группы в пятое положение изатинового scafolds [300–302]. Наиболее распространенным подходом является сульфохлорирование, осуществляемое с применением хлорсульфоновой кислоты, однако иногда сульфируют при помощи олеума, а сульфохлорид получают благодаря обработке хлорирующими реагентами, такими как трихлорид фосфора (POCl_3) (Рисунок 3.23).

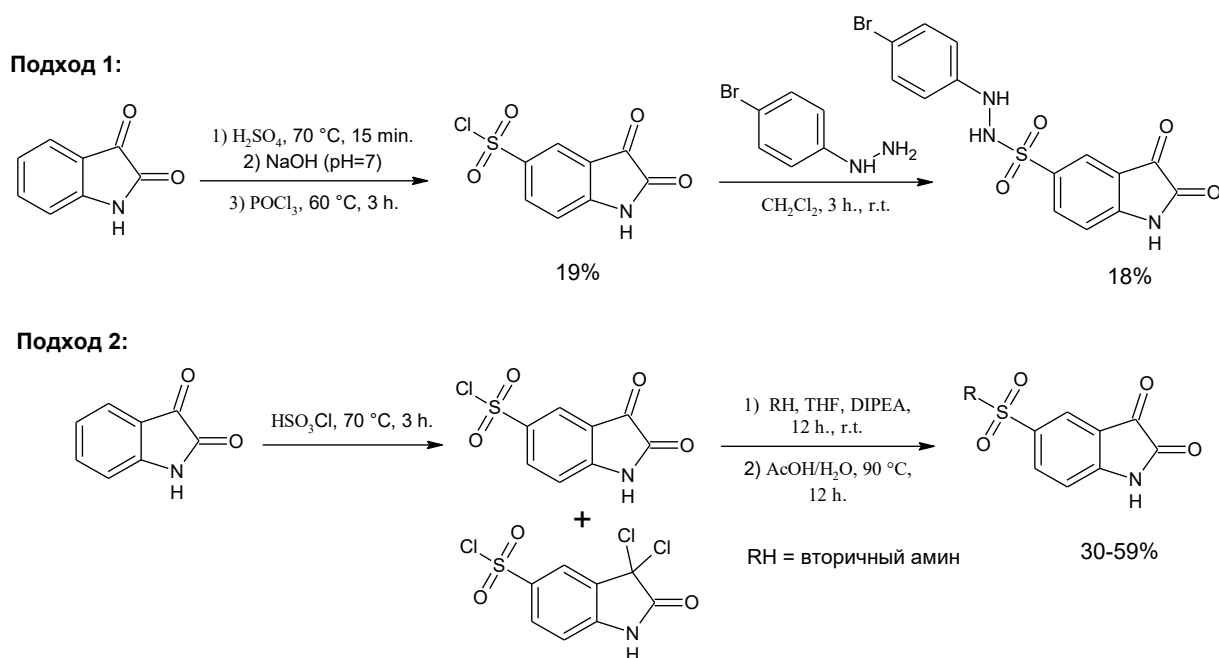


Рисунок 3.23. Существующие подходы (подход 1 [301] и подход 2 [302]) к синтезу 5-сульфонамидизатинов.

Преимуществом подхода 1 является отсутствие смеси продуктов, однако, 5-сульфохлоридизатин получается с низким выходом. С другой стороны, подход 2 предполагает получение на первой стадии неразделимой смеси 5-сульфохлоридизатина с гем-3,3-дихлор-2-оксиндолом, однако гидролиз продуктов после аминирования приводит к получению чистого 5-сульфонамидизатина. Было решено взять за основу подход 2, так как теоретически он способствует получению 5-сульфонамидизатинов с большим выходом, чем подход 1.

Сульфохлорирование изатинов **1h** и **1q** в пятое положение цикла проводилось под действием свежеперегнанной хлорсульфоновой кислоты по известным методикам (Рисунок 3.24) [302].

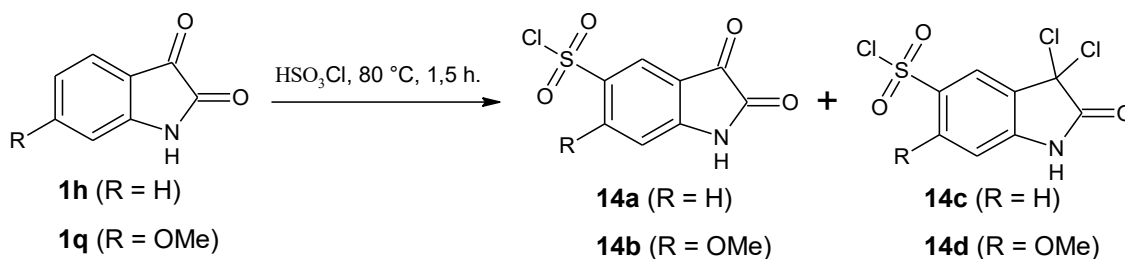


Рисунок 3.24. Сульфохлорирование изатинов **1h** и **1q**.

Реакция проходила с полной конверсией в два раза быстрее, чем было указано в оригинальной методике при незначительном увеличении температуры (с 70°C до 80°C). Продукты были выделены в виде смеси изатина **14a** или **14b** и соответствующего дихлорпроизводного **14c** или **14d** в соотношении примерно 1 к 5 соответственно (по данным ЯМР). Однако, выделение продуктов значительно осложнялось их нестабильностью. Смесь продуктов в обоих случаях представляет собой желтый осадок, который можно отфильтровать, однако постепенно он впитывает влагу воздуха и превращается в черную маслянистую массу. Из-за низкой стабильности продуктов реакции при хранении в твердом виде на открытом воздухе, далее они хранились после выделения в виде раствора в этилацетате над осушителем (Na_2SO_4) или в эксикаторе (над P_2O_5). В нейтральной среде при контакте с водой сульфонилхлориды **14a-d** вступали с ней в реакцию с образованием сульфокислот (Рисунок 3.25). Попытка провести обратную реакцию в условиях перемешивания получившегося соединения в SOCl_2 при комнатной температуре не увенчалась успехом.

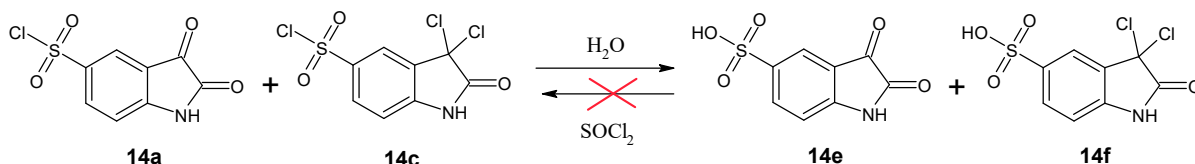


Рисунок 3.25. Гидролиз 5-сульфохлоридизатина **14a** и 5-сульфохлорид-гем-3,3-дихлор-2-оксидола **14c**.

Согласно литературным данным, смесь **14a+14c** может быть успешно использована в синтезе сульфонамид-замещенных изатинов [303]. Поэтому в данной работе полученная смесь далее вводилась в реакцию с аминами без дополнительного разделения, так как невозможно провести гидролиз дихлорпроизводного до изатина, не затронув при этом более активную сульфохлоридную группу (Рисунок 3.26, Таблица 3.12).

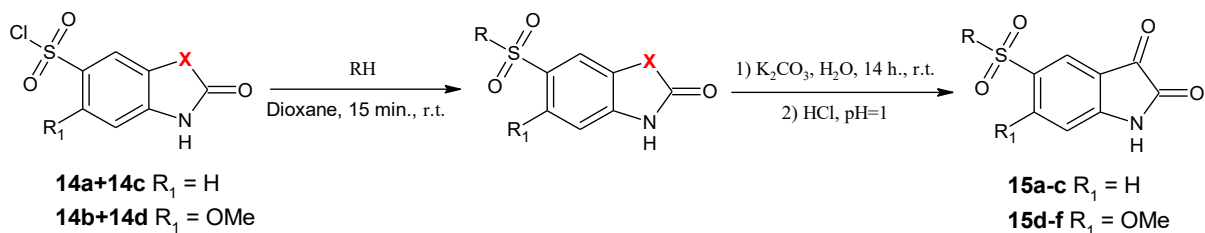


Рисунок 3.26. Синтез 5-сульфонамидизатинов **15a-f**.

Таблица 3.12. Выходы 5-сульфонамидизатинов **15a-f** по трем стадиям.

| № | R ₁ | R | Выход*, % | № | R ₁ | R | Выход*, % |
|------------|----------------|--------------------|-----------|------------|----------------|--------------------|-----------|
| 15a | H | Et ₂ N- | 36 | 15d | 6-OMe | Et ₂ N- | 39 |
| 15b | H | | 33 | 15e | 6-OMe | | 33 |
| 15c | H | | 32 | 15f | 6-OMe | | 33 |

*выход приведен по 3-м стадиям, начиная с сульфохлорирования изатинов **1h,q**.

Реакция первичных и вторичных аминов с сульфохлоридами обычно проводится при двойном избытке амина [300] либо в присутствии дополнительного основания (Et₃N, DIPEA) [300,302,304]. В нашем случае наилучшие результаты были достигнуты при проведении реакции смесей **14a+14c** или **14b+14d** с двукратным избытком соответствующего вторичного амина. В результате гидролиза, проведенного в режиме *one-pot* без выделения промежуточных продуктов, образуются целевые сульфонамид-замещенные изатины **15a-c** (из смеси **14a+14c**) или **15d-f** (из смеси **14b+14d**) с умеренными суммарными выходами.

К сожалению, попытки выделить продукты замещения с первичными аминами (бензиламин, анилином, *para*- и *meta*-анизидином, и 4-хлоранилином) не увенчались успехом из-за высокой реакционной способности положения 3 в полученных оксиндолах, приводящей к побочным продуктам.

Согласно работам [305,306] наиболее удобным методом получения *N*-незамещенного 5-аминосульфонилизатина **15g** является взаимодействие 5-сульфохлоридизатина **14a** с газообразным аммиаком в ТГФ. При этом используется заранее насыщенный аммиаком раствор либо газообразный аммиак пропускается непосредственно через реакционную смесь с выходом целевого изатина на этой стадии 22% [306] и 47% [305] соответственно. Низкий выход обусловлен, вероятно, сравнительно высокой растворимостью аммиака в ТГФ, что

приводит к появлению нежелательных побочных продуктов. Решением этой проблемы стала замена растворителя на дихлорметан и проведение реакции согласно рисунку 3.27.

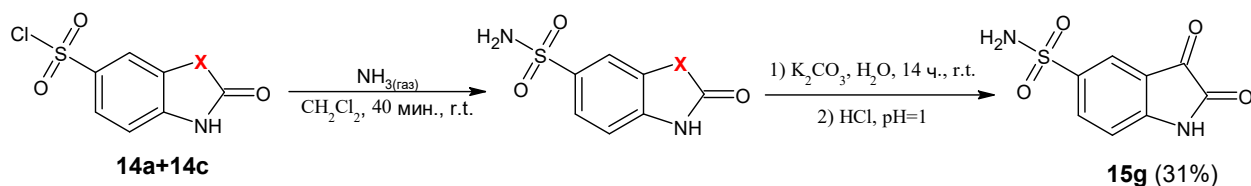


Рисунок 3.27. Синтез *N*-незамещенного 5-сульфонамидизатина.

Благодаря проведенной оптимизации нами был получен продукт **15g** с суммарным выходом 31% по трем стадиям, начиная с незамещенного изатина **1h**, что превышает суммарный выход литературных методик. К сожалению, в случае 6-метоксипроизводного выделить целевой продукт не удалось, вероятно, из-за его высокой растворимости в воде.

На заключительной стадии проводили конденсацию полученных 5-сульфонмидизатинов **15a-g** с циануксусной и малоновой кислотами (Рисунок 3.28, Таблица 3.13), по рассмотренным выше методикам (раздел 3.1).

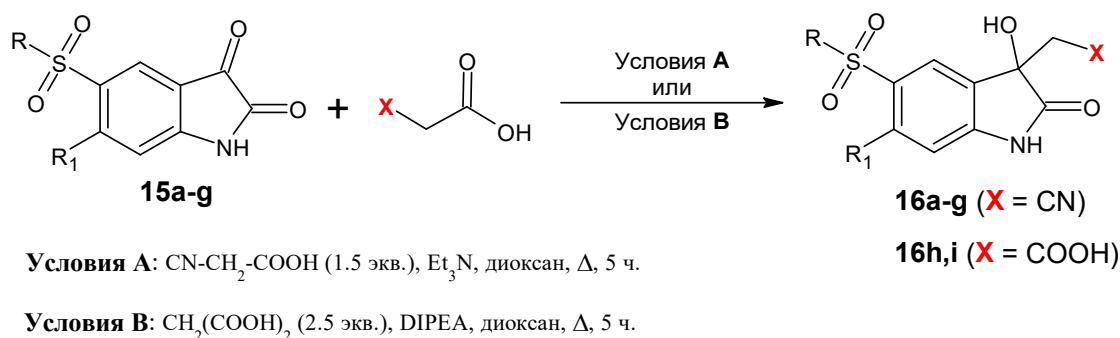


Рисунок 3.28. Конденсация 5-сульфонамидизатинов **15a-g** с циануксусной и малоновой кислотами.

Таблица 3.13. Выходы 3-замещенных 3-гидрокси-5-сульфонамид-2-оксиндолов **16a-i**.

| № | R ₁ | R | X | Выход, % | № | R ₁ | R | X | Выход, % |
|------------|----------------|--------------------|------|----------|------------|----------------|--------------------|------|----------|
| 16a | H | Et ₂ N- | CN | 74 | 16d | OMe | Et ₂ N- | CN | 70 |
| 16b | H | | CN | 76 | 16e | OMe | | CN | 66 |
| 16c | H | | CN | 77 | 16f | OMe | | CN | 69 |
| 16g | H | NH ₂ | CN | 55 | | | | | |
| 16h | H | Et ₂ N- | COOH | 61 | 16i | H | | COOH | 64 |

В случае конденсации изатинов с малоновой кислотой (условия В) для достижения 100% конверсии требовалось использование более сильного основания (DIPEA вместо Et₃N). Замещенные 3-цианометил- и 3-карбоксиметил-3-гидрокси-5-аминосульфонилксиндолы **16a-i** были получены с хорошими выходами, а их биологическая активность изучена в тестах *in vivo* и *in vitro*.

3.10. Исследование биологической активности 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов

Как и другие производные 2-оксиндола, изученные ранее, 5-сульфонамид-2-оксиндолы **16a-i** были протестированы *in vivo* с целью оценки их воздействия на ВГД нормотензивных кроликов и крыс. При этом учитывались суточные колебания давления и возможные резорбтивные эффекты. Введение сульфонамидной группы в структуру оксиндолов потенциально позволяет получить соединения мультитаргетного действия, гипотензивный эффект которых может быть связан с дополнительным взаимодействием с карбоангидразами. В связи с этим были проведены исследования *in vitro*, направленные на изучение их ингибирующей активности в отношении СА II. Кроме того, учитывая, что сульфонамиды и оксиндолы часто проявляют антиоксидантные и нейропротекторные свойства, было изучено влияние полученных соединений на процессы перекисного окисления липидов. Для комплексной оценки безопасности 5-сульфонамид-2-оксиндолов **16a-i** дополнительно проанализировали их митохондриальную и клеточную токсичность.

3.10.1. Изучение влияния на внутриглазное давление *in vivo*⁷

Исследование гипотензивного действия проводилось на серии 5-аминосульфонил-3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндолов **16a-c,g**, что дало возможность проанализировать влияние заместителя в 5-м положении оксиндольного цикла как на снижение внутриглазного давления, так и на резорбтивный эффект (Рисунок 3.29, Таблица 3.14). Для оценки активности 30 мкл 0,4%-ного раствора тестируемого соединения в дистиллированной воде инстиллировали в правый глаз подопытных крыс, тогда как левый глаз служил контролем. Продолжительность каждого экспериментального наблюдения составляла 3 часа.

⁷ Изучение гипотензивного эффекта соединений на крысах проводилось совместно с группой академика А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград), изучение гипотензивного эффекта соединений на кроликах проводилось совместно с лабораторией д.б.н. Чесноковой Н.Б. (НИИ Глазных Болезней им. Гельмгольца, Москва).

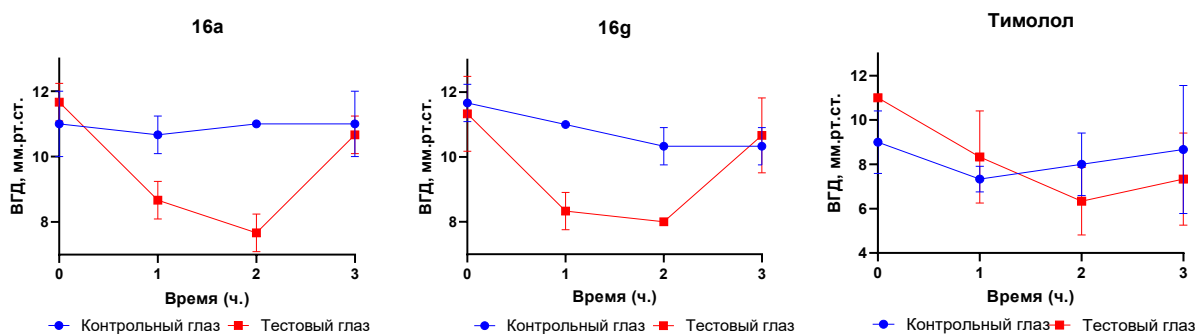
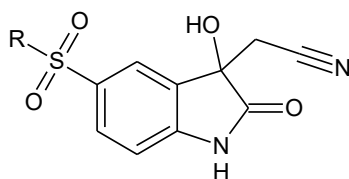


Рисунок 3.29. Зависимость снижения ВГД у крыс от времени и изучение резорбтивного эффекта.

Таблица 3.14. Максимальное снижение ВГД у крыс после инстилляцией 0,4% раствора соединений **16a-c,g**.



| № | R | Δ ВГД _{макс.} , % | Δ ВГД _{макс.} , мм. рт. ст. |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|---|
| 16a | Et ₂ N- | 34,10 | 4,00 |
| 16b | | <10 | 0,66 |
| 16c | | <10 | 0,67 |
| 16g | NH ₂ | 28,87 | 3,33 |
| Тимолол (0,5%) | | 30,76 | 4,67 |

Среди исследованных соединений вещество **16a** продемонстрировало статистически значимую гипотензивную активность, снижая показатели офтальмотонуса на 34,10% ко второму часу эксперимента ($p < 0,05$; t-критерий). Этот результат превышает эффект референсного препарата тимолола (30,76%). Соединение **16g** также проявило сопоставимую с тимололом гипотензивную активность, однако аналогичное снижение внутриглазного давления наблюдалось и в контралатеральном глазу, что указывает на наличие системного резорбтивного действия, характерного и для тимолола. В отличие от них, соединения **16c** и **16b** не продемонстрировали значимого гипотензивного эффекта у крыс (снижение ВГД менее 10% или 1,00 мм рт. ст.).

Ранее нами было установлено, что для мелатонина и его структурных аналогов, включая производные оксиндола, характерен парадоксальный эффект ослабления гипотензивного действия при повышении концентрации вещества [259]. В связи с этим была

изучена концентрационная зависимость гипотензивного эффекта на примере соединений **16g** и **16c** (Рисунок 3.30). Исследование проводилось на нормотензивных кроликах породы русская шиншилла. Испытуемые соединения в форме 1%, 0,5% и 0,1% растворов в фосфатном буфере (рН=7,4) инстиллировали в оба глаза животных в объеме 50 мкл.

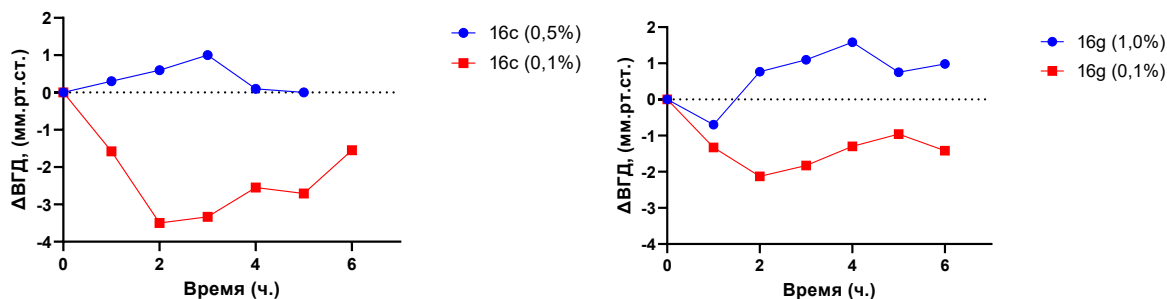


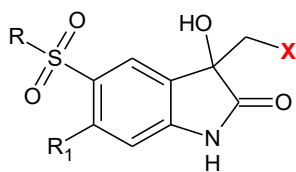
Рисунок 3.30. Зависимости снижения ВГД от времени у кроликов после инстиляции 0,1% и 0,5% растворов соединения **16c**, а также 0,1% и 1,0% растворов соединения **16g**.

Анализ полученных данных демонстрирует, что повышение концентрации активного вещества до 0,5% приводит не только к уменьшению терапевтической эффективности, но и провоцирует обратный биологический ответ - развитие гипертензивного эффекта вместо ожидаемого снижения внутриглазного давления.

В рамках продолжения исследования была выполнена оценка гипотензивной активности соединений **16a-i** на модели кроликов при использовании 0,1% растворов в фосфатном буфере (рН=7,4). Препараты вводились билатерально в объеме 50 мкл на глаз. Соединение **16d** было исключено из экспериментальной серии вследствие его нерастворимости в буферной среде, проявляющейся образованием мелкодисперсного осадка.

Мониторинг ВГД осуществлялся непосредственно перед инстилляцией и в течение последующих 6 часов с часовыми интервалами (Рисунок 3.31). Полученные данные о процентном снижении ВГД относительно исходных значений систематизированы в Таблице 3.15. Для минимизации влияния физиологических колебаний офтальмотонуса и внешних факторов была проведена нормализация данных с учетом контрольной группы, получавшей фосфатный буфер с 5% ДМСО. Коррекция результатов осуществлялась посредством расчета ΔВГД - разницы между значениями ВГД у опытных и интактных животных.

Таблица 3.15. Максимальное снижение ВГД у кроликов после инстилляций 0,1%-ного раствора соединений **16a-i**.



| № | R ₁ | R | X | ΔВГД _{макс.} , % | ΔВГД _{макс.} , мм. рт. ст. |
|------------------------|----------------|--------------------|------|---------------------------|-------------------------------------|
| 16a | H | Et ₂ N- | CN | 16,79 | 2,05 |
| 16b | H | | CN | 14,62 | 1,20 |
| 16c | H | | CN | 16,20 | 3,50 |
| 16d | OMe | Et ₂ N- | CN | н/р* | н/р |
| 16e | OMe | | CN | 18,75 | 0,60 |
| 16f | OMe | | CN | 17,20 | 3,70 |
| 16g | H | NH ₂ | CN | 6,82 | 2,13 |
| 16h | H | Et ₂ N- | COOH | 14,36 | 1,90 |
| 16i | H | | COOH | 21,93 | 2,50 |
| Тимолол (0,5%) | | | | 18,18 | 2,63 |
| Дорзоламид (2%) | | | | 16,07 | 2,25 |

* н/р – нерастворимы в фосфатном буферном растворе

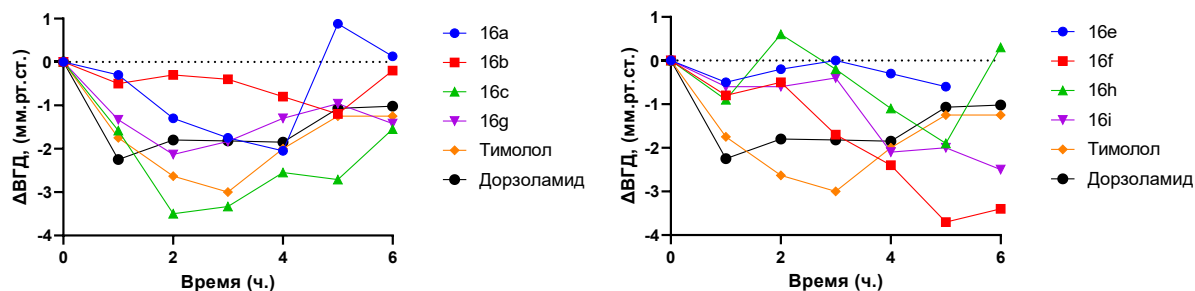


Рисунок 3.31. Зависимости снижения ВГД от времени у кроликов после инстилляций 0,1% растворов соединений **16a-c, e-i**.

В ходе эксперимента было установлено, что показатели ВГД у подопытных кроликов могли подвергаться естественным колебаниям под влиянием различных факторов, включая изменения атмосферного давления. В связи с этим для объективной оценки гипотензивного эффекта при анализе результатов использовались данные из третьего столбца Таблицы, предварительно скорректированные относительно показателей контрольной группы интактных животных.

Наибольшую гипотензивную активность продемонстрировали соединения **16с** и **16f**. Через 2 часа после инстилляции соединение **16с** вызывало снижение ВГД на 3,50 мм.рт.ст., тогда как **16f** через 5 часов после введения обеспечивал уменьшение давления на 3,70 мм.рт.ст. Эти показатели существенно превышают гипотензивный эффект референсных препаратов - тимолола (2,63 мм.рт.ст.) и дорзоламида (2,25 мм.рт.ст.). Особого внимания заслуживает тот факт, что исследуемые соединения применялись в значительно меньшей концентрации (0,1%) по сравнению со стандартными терапевтическими концентрациями тимолола (0,5%) и дорзоламида (2%).

Важно отметить, что гипотензивное действие соединений **16с**, **16f**, **16g** и **16i** сохранялось на протяжении всего 6-часового периода наблюдения, что свидетельствует о выраженном пролонгированном эффекте данных веществ. Это свойство может представлять особый интерес для разработки новых антиглаукомных препаратов с длительным терапевтическим действием.

3.10.2. Изучение биологической активности *in vitro*⁸

Исследование биологической активности соединений *in vitro* включало комплексную оценку их потенциальных нейропротекторных свойств и токсикологического профиля. В рамках работы изучалось влияние на митохондриальный потенциал в изолированных митохондриях печени крыс, воздействие на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах головного мозга крыс, а также цитотоксические эффекты на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Параллельно проводилась оценка способности соединений ингибировать карбоангидразу II человека (hCA II), что представляет интерес как с точки зрения механизма снижения ВГД при глаукоме, так и в контексте потенциального нейропротекторного действия (Таблица 3.16).

⁸ Изучение влияния соединений на митохондриальный потенциал в изолированных митохондриях печени крыс, воздействие на процессы перекисного окисления липидов в гомогенатах головного мозга крыс, цитотоксические эффекты на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y, а также оценка способности соединений ингибировать карбоангидразу II человека проводились совместно с группой д.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка).

Известно, что многие сульфонамидные соединения проявляют ингибирующую активность в отношении hCA II. Карбоангидразы характеризуются отсутствием строгой функциональной специфичности - помимо основной гидратазной активности, они способны также катализировать и гидролитические реакции. Поскольку обе каталитические активности связаны с единым активным центром фермента, в исследованиях ингибиторов карбоангидраз допустимо использование тестов по определению подавления их эстеразной активности. Соединения **16b**, **16d** и **16h** были исключены из биологического тестирования из-за недостаточной растворимости в буферных растворах, что проявлялось образованием осадка при кратковременном хранении.

Таблица 3.16. Влияние 3-гидрокси-5-сульфонамид-2-оксиндолов на активность hCA II, жизнеспособность клеток SH-SY5Y и Fe²⁺-индуцированное ПОЛ.

| № | Ингибирование эстеразной активности hCA II (%) [*] | Выживаемость клеток SH-SY5Y (МТТ-тест) (%) [†] | Ингибирование Fe ²⁺ -иницированного ПОЛ (%) [†] |
|------------|---|---|---|
| 16a | 29 ± 10 | 102 ± 2 | 22,4 ± 5,2 |
| 16c | 9 ± 8 | 84 ± 6 | 17,9 ± 7,9 |
| 16e | 99 ± 12 | 92 ± 17 | 16,0 ± 6,6 |
| 16f | 22 ± 11 | 102 ± 18 | 13,7 ± 15,4 |
| 16g | 53 ± 13 | 90 ± 15 | 19,9 ± 4,4 |
| 16i | 32 ± 8 | 126 ± 10 | 21,7 ± 5,5 |

Тестируемые соединения вводили в концентрации: ^{*}10 мкМ и [†]100 мкМ,

Результаты биологических исследований позволили идентифицировать соединение **16e** как наиболее активный ингибитор эстеразной активности карбоангидразы II, демонстрирующее ингибирование фермента на 99% при концентрации 10 мкМ. Остальные соединения проявляли умеренную ингибирующую активность в отношении hCA II, за исключением соединения **16c**, которое практически не взаимодействовало с данным ферментом. К сожалению, нам не удалось установить четкой зависимости структура-активность, объясняющей наблюдаемые различия в ингибирующей способности соединений. Более того, отсутствует корреляция между способностью соединений взаимодействовать с hCA II и их гипотензивным действием: соединение **16c**, не проявляющее активности в отношении hCA II, продемонстрировало выраженный гипотензивный эффект, тогда как наиболее активный ингибитор карбоангидразы II - соединение **16e** - оказалось наименее эффективным в снижении ВГД.

Для оценки цитотоксического потенциала новых 5-сульфонамид-2-оксиндолов были проведены исследования на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y с

использованием МТТ-теста. Данный метод основан на способности дегидрогеназ жизнеспособных клеток восстанавливать желтый тетразолиевый краситель (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до пурпурного формазана, растворимого в ДМСО. Результаты исследований продемонстрировали отсутствие статистически значимой цитотоксичности у большинства соединений даже при максимальной тестируемой концентрации 100 мкМ. Исключение составило соединение **16с**, которое в данной концентрации вызывало достоверное снижение дегидрогеназной активности клеток на 16%, что может указывать на его умеренное цитотоксическое действие.

Для оценки нейропротекторного потенциала исследовали влияние соединений на процессы ПОЛ в гомогенате головного мозга крыс. Антиоксидантную активность определяли по способности соединений подавлять Fe^{2+} -индуцированное накопление продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Все тестируемые соединения проявили слабую, но статистически значимую антиоксидантную активность, не превышающую 25% ингибирования при концентрации 100 мкМ.

Нейропротекторные свойства исследуемых соединений могут быть связаны с их способностью ингибировать открытие пор митохондриальной проницаемости - процесса, сопровождающегося деполяризацией митохондриальной мембраны при воздействии ионов кальция и играющего важную роль в механизмах клеточной гибели. Параллельно оценка влияния на митохондриальный потенциал позволяет прогнозировать потенциальную гепато- и кардиотоксичность соединений. Экспериментальные данные показали, что ни одно из изученных соединений не вызывает спонтанной деполяризации митохондрий, что свидетельствует об отсутствии выраженной митохондриальной токсичности. Однако при этом они также не проявляют способности подавлять кальций-индуцированную деполяризацию митохондриальной мембраны.

4. Экспериментальная часть⁹

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AC 400 с рабочей частотой 400,13 МГц (¹H) и 100,6 МГц (¹³C) или DPX 300 с рабочей частотой 300,13 МГц (¹H) и 75,5 МГц (¹³C) при 303 К или 318 К. Химические сдвиги ЯМР ¹H приведены относительно остаточного сигнала протонов в дейтерированном ДМСО (C₂HD₅OS) (δ_H 2,50 м.д.) для растворов в ДМСО-d₆ и остаточного сигнала CHD₂OD (δ_H 3,35 м.д.) для растворов в CD₃OD. Химические сдвиги ЯМР ¹³C приведены относительно центрального сигнала растворителя (δ_C 39,5 м.д. для растворов в ДМСО-d₆ и δ_C 49,9 м.д. для растворов в CD₃OD). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе Orbitrap LTQ XL с источником ионизации ESI, напряжение на игле 3,5 кВ/5 кВ (-/+ ионы), температура капилляра 275°C, диапазон масс 100-2000 Да. Образцы вводили через хроматограф Agilent 1100 без колонки, элюент - вода/ацетонитрил (1/1 о/о) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты, скорость потока 0,35 мл/мин, объем инъекции 1-10 мкл. ИК-спектры были записаны на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье Nicolet iS5 (Thermo Scientific). Спектры были записаны с разрешением 4 см⁻¹ за 20 сканирований. Образцы помещали на рабочую поверхность алмазного элемента внутреннего отражения под углом падения 45°. Реакции под действием микроволнового излучения проводили в бытовой микроволновой печи Bosch HMT72M420

⁹ При работе над данным разделом диссертации использованы материалы следующих публикаций автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1) **Efremov A.M.**, Beznos O.V., Ereemeev R.O., Chesnokova N.B., Milaeva E.R., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Microwave-Assisted Synthesis of 3-Hydroxy-2-oxindoles and Pilot Evaluation of Their Antiglaucomic Activity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 6. – P. 5101. – EDN SSEDQQ. Импакт-фактор 4.9 (JIF). Объем 1,50 п.л. Личный вклад автора 50%.

2) **Efremov A.M.**, Babkov D.A., Beznos O.V., Sokolova E.V., Spasov A.A., Ivanov V.N., Kurkin A.V., Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. Microwave-assisted synthesis of 5-aryl-3-hydroxy-2-oxindole derivatives and evaluation of their antiglaucomic activity // *Mendeleev Communications*. – 2023. – Vol. 33, No. 4. – P. 550-552. – EDN QLRUEC. Импакт-фактор 1.7 (JIF). Объем 0,81 п.л. Личный вклад автора 50%.

3) Ereemeev R.O., Beznos O.V., **Efremov A.M.**, Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. The rational design of novel 5-amino-2-oxindole derivatives with antiglaucomic activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2023. – Vol. 90. – P. 129334. – EDN PLWVHR. Импакт-фактор 2.2 (JIF). Объем 0,69 п.л. Личный вклад автора 40%.

4) Ereemeev R.O., **Efremov A.M.**, Zakharova D.V., Beznos O.V., Sokolova E.V., Kalitin K.Y., Mukha O.Y., Vinogradova D.V., Veselov I.M., Shevtsov P.N., Dubova L.G., Babkov D.A., Spasov A.A., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Discovery of Novel 2-Oxindoles as Compounds with Antiglaucoma Activity // *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. – 2025. – Vol. 20, No. 8. – P. e202400977. – EDN ORVXRF. Импакт-фактор 3.4 (JIF). Объем 1,16 п.л. Личный вклад автора 50%.

5) Лозинская Н.А., Бухаловский Ф.Г., Виноградова Д.В., **Ефремов А.М.**, Безнос О.В., Павленко Т.А., Науменко Л.В., Таран А.С., Чебанько А.М., Веселов И.М., Спасов А.А., Шевцова Е.Ф. Синтез и биологическая активность 5-сульфонамидзамещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов с 3-цианометильными и 3-карбоксиметильными заместителями // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2025. – Т. 74, № 8. – С. 2413-2426. – EDN MLANYH. Импакт-фактор 1,035 (РИНЦ). Объем 1,62 п.л. Личный вклад автора 30%.

[перевод: Lozinskaya N.A., Bukhalovsky F.G., Vinogradova D.V., **Efremov A.M.**, Beznos O.V., Pavlenko T.A., Naumenko L.V., Taran A.S., Tchaban'ko A.M., Veselov I.M., Spasov A.A., Shevtsova E.F. Synthesis and biological activity of 5-sulfonamide-substituted 3-hydroxyoxindoles with 3-cyanomethyl and 3-carboxymethyl groups // *Russian Chemical Bulletin*. – 2025. – Vol. 74, No. 8. – P. 2413-2426. – EDN HVIWCN. Импакт-фактор 0.305 (SJR). Объем 1,02 п.л. Личный вклад автора 30%]

объемом 17 л. Реактивы фирм «Merck», «Sigma-Aldrich», «Macklin» использовали без предварительной очистки. Контроль за ходом реакций и чистотой химических веществ осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (Macherey-Nagel, ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254) (EtOAc/ПЭ(40-70) 3/1) с УФ-детектированием. Колоночную хроматографию выполняли с использованием силикагеля марки Macherey-Nagel Silica 60 (размер частиц 0,04-0,063 мм), в качестве элюента использовалась смесь EtOAc/ПЭ (40-70) в соотношении 3/1, Используемые растворители и реагенты очищали в соответствии со стандартным протоколом [307].

Исходные изатины **1b,c,e** были получены с использованием реакции Зандмейера из соответствующих анилинов по известным методикам. Нитроизатины **1a,d,f** были получены нитрованием изатина (**1h**) и 5-метоксиизатина (**1c**) по описанным методикам [308]. Исходный 1-бензил-5-метоксиизатин (**1g**) получен бензилированием 5-метоксиизатина (**1c**) по описанным методикам [309]. Исходные изатины **1j-p** были любезно предоставлены к.х.н. доцентом Куркиным А.В. и к.х.н. Ивановым В.Н. Исходный 6-метоксиизатин **1q** получали по литературной методике [310].

4.1. Синтез замещенных 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов

Общая методика синтеза 3-гидрокси-2-оксиндолов 2a-i и 3a-i [1,2]

В реакционный сосуд поместили замещенный изатин (1 эквивалент), циануксусную (1 эквивалент) или малоновую (2,2 эквивалента) кислоту, 2 мл диоксана, перегнанного над натрием, и триэтиламин (1,5 эквивалента для малоновой или 0,25 эквивалентов для циануксусной кислоты).

Метод А:

Реакционный сосуд – химическая пробирка, снабженная завинчивающейся крышкой, объемом 10 мл. Пробирку поместили в бытовую микроволновую печь Bosch НМТ72М420 объемом 17 л. Мощность излучения установили на 360W, время облучения на 2 минуты. По прошествии 2-х минут пробирку охладили на воздухе до комнатной температуры и снова поместили в бытовую микроволновую печь на 2 минуты при той же мощности. Цикл охлаждения и облучения повторили еще дважды.

Метод В:

Реакционный сосуд – одnogорлая круглодонная колба, снабженная магнитным перемешивающим элементом и обратным холодильником, объемом 50 мл. Реакционную смесь кипятили в течение 3 часов.

Выделение (общее для вышеуказанных методов):

Реакционную смесь горячей перелили в одnogорлую круглодонную колбу и удалили органический растворитель на роторном испарителе. Полученное соединение промывали

небольшими порциями 10% HCl. Продукт растворяли в 5 мл EtOAc, сушили над Na₂SO₄безв и удаляли органический растворитель в вакууме.

2-(3-Гидрокси-5-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2a)

Получен из 227 мг (1,18 ммоль) 5-нитроизатина (**1a**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 77% (211 мг) и 98% (269 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 3,14 (д, J = 16,6, 1H); 3,21 (д, J = 16,7, 1H); 7,08 (д, J = 8,6, 1H); 8,26 (дд, J = 2,4, J = 8,7, 1H); 8,33 (д, J = 2,3, 1H); 10,72 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-7-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2b)

Получен из 227 мг (1,18 ммоль) 7-нитроизатина (**1b**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 67% (184 мг) и 76% (209 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 3,08-3,19 (м, 2H); 7,23-7,31 (м, 1H); 7,85 (д, J = 7,2, 1H); 8,09 (д, J = 8,6, 1H); 11,34 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-5-метокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2c)

Получен из 209 мг (1,18 ммоль) 5-метоксиизатина (**1c**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 60% (154 мг) и 70% (180 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 2,94 (д, J = 16,6, 1H); 3,05 (д, J = 16,5, 1H); 3,71 (с, 3H); 6,78 (д, J = 8,4, 1H); 6,85 (дд, J = 2,6, J = 8,4, 1H); 7,09 (д, J = 2,6, 1H); 10,38 (с, 1H).

ЯМР ¹³C (DMCO-d₆, δ, м.д.): 26,54; 55,97; 72,85; 110,97; 111,63; 114,97; 117,49; 131,37; 135,11; 155,51; 177,02,

2-(3-Гидрокси-5-метокси-4-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2d)

Получен из 262 мг (1,18 ммоль) 5-метокси-4-нитроизатина (**1d**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 43% (133 мг) и 55% (170 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 3,05-3,13 (м, 2H); 3,83 (с, 3H); 7,03 (уш.с, 1H); 7,07 (д, J = 8,6, 1H); 7,28 (д, J = 8,6, 1H); 10,89 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-5-метокси-7-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2e)

Получен из 262 мг (1,18 ммоль) 5-метокси-7-нитроизатина (**1e**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 80% (248 мг) и 73% (226 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны. Т.пл. (эксп.) = 137°C (с разл.) (Т.пл. (лит.) = 125-130°C [311]).

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 3,10-3,20 (м, 2H); 3,84 (с, 3H); 6,98 (уш.с, 1H); 7,51 (д, J = 2,5, 1H); 7,54 (д, J = 2,5, 1H); 11,23 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,08; 56,62; 71,17; 106,58; 117,11; 120,48; 131,33; 132,41; 135,24; 154,87; 177,24,

2-(3-Гидрокси-5,7-динитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2f)

Получен из 280 мг (1,18 ммоль) 5,7-динитроизатина (**1f**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 81% (266 мг) и 77% (253 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,32-3,34 (м, 2H); 8,62 (уш.с, 1H); 8,83 (д, $J = 2,2$, 1H); 12,03 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2g)

Получен из 173 мг (1,18 ммоль) изатина (**1g**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 66% (146 мг) и 61% (135 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,94 (д, $J = 16,6$, 1H); 3,04 (д, $J = 16,8$, 1H); 6,83-6,92 (м, 1H); 6,99-7,06 (м, 1H); 7,24-7,31 (м, 1H); 7,42-7,50 (м, 1H); 10,55 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-5-бром-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2h)

Получен из 267 мг (1,18 ммоль) 5-бромизатина (**1h**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 72% (227 мг) и 79% (249 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,01 (д, $J = 16,6$, 1H); 3,10 (д, $J = 16,6$, 1H); 6,83 (д, $J = 8,3$, 1H); 7,47 (дд, $J = 2,0$, $J = 8,3$, 1H); 7,59 (д, $J = 1,8$, 1H); 10,71 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,18; 72,49; 112,59; 114,05; 117,38; 127,53; 132,57; 133,14; 141,42; 176,64,

2-(1-Бензил-3-гидрокси-5-метокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (2i)

Получен из 315 мг (1,18 ммоль) 1-бензил-5-метоксиизатина (**1i**) и 0,1 г. (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 60% (218 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,07 (д, $J = 16,5$, 1H); 3,19 (д, $J = 16,6$, 1H); 3,71 (с, 3H); 4,86 (с, 2H); 6,78 (д, $J = 8,6$, 1H); 6,85 (дд, $J = 2,6$, $J = 8,6$, 1H); 7,18 (д, $J = 2,6$, 1H); 7,22-7,36 (м, 5H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,64; 43,26; 56,05; 72,66; 110,66; 111,79; 114,69; 117,43; 127,64; 127,86; 129,02; 130,86; 135,67; 136,34; 145,04; 156,16; 173,38; 176,77,

2-(3-Гидрокси-5-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3a)

Получена из 168 мг (0,88 ммоль) 5-нитроизатина (**1a**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 86% (191 мг) и 87% (193 мг) соответственно.

Спектры ЯМР идентичны. Т. пл. (эксп.) = 212-216°C (Т.пл. (лит.) = 215-216°C [311]).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,05 (д, $J = 16,5$, 1H); 3,15 (д, $J = 16,5$, 1H); 6,40 (уш.с, 1H); 7,00 (д, $J = 8,7$, 1H); 8,20 (дд, $J = 2,4$, $J = 8,6$, 1H); 8,27 (д, $J = 2,3$, 1H); 10,99 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-7-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3b)

Получена из 168 мг (0,88 ммоль) 7-нитроизатина (**1b**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 97% (215 мг) и 93% (206 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны. Т.пл. (эксп.) = 241°C (Т.пл. (лит.) = 242-243°C [311]).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,02 (д, $J = 16,5$, 1H); 3,12 (д, $J = 16,5$, 1H); 7,15 (дд, $J = 7,1$, $J = 8,6$, 1H); 7,75 (д, $J = 7,0$, 1H); 8,00 (дд, $J = 1,1$, $J = 8,6$, 1H); 11,06 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-5-метокси-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3c)

Получена из 155 мг (0,88 ммоль) 5-метоксиизатина (**1c**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 61% (127 мг) и 50% (104 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,87 (д, $J = 15,7$, 1H); 2,93 (д, $J = 15,8$, 1H); 3,69 (с, 3H); 6,68 (д, $J = 8,5$, 1H); 6,75 (дд, $J = 2,5$, $J = 8,3$, 1H); 6,97 (д, $J = 2,5$, 1H); 10,05 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 46,17; 55,88; 73,42; 110,18; 111,60; 113,94; 132,95; 134,34; 155,12; 169,48; 178,45,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ (M+H) найдено: 238,0710; рассчитано: 238,0710; (M+Na) найдено: 260,0529; рассчитано: 260,0529; (M+K) найдено: 276,0269; рассчитано: 276,0269,

2-(3-Гидрокси-5-метокси-4-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3d)

Получена из 194 мг (0,88 ммоль) 5-метокси-4-нитроизатина (**1d**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 71% (176 мг) и 73% (181 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны. Т.пл. (эксп.) = 242°C (Т.пл. (лит.) = 240-245°C [311]).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,83 (д, $J = 16,6$, 1H); 2,99 (д, $J = 16,6$, 1H); 3,80 (с, 3H); 6,48 (уш.с, 1H); 6,94 (д, $J = 8,6$, 1H); 7,16 (д, $J = 8,6$, 1H); 10,54 (с, 1H), 12,28 (уш.с, 1H).

2-(3-Гидрокси-5-метокси-7-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3e)

Получена из 194 мг (0,88 ммоль) 5-метокси-7-нитроизатина (**1e**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 79% (196 мг) и 84% (208 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,99 (д, $J = 16,7$, 1H); 3,18 (д, $J = 16,6$, 1H); 3,82 (с, 3H); 6,98 (уш.с, 1H); 7,42 (д, $J = 2,5$, 1H); 7,51 (д, $J = 2,3$, 1H); 10,95 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 46,04; 56,48; 71,54; 105,35; 120,55; 130,66; 134,05; 137,29; 154,57; 170,74; 178,75,

HRMS (ESI) для $C_{11}H_{10}N_2O_7$ (M+H) найдено: 283,0570; рассчитано: 283,0570; (M+Na) найдено: 305,0380; рассчитано: 305,0380,

2-(3-Гидрокси-5,7-динитро-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3f)

Получена из 207 мг (0,88 ммоль) 5,7-динитроизатина (**1f**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 78% (204 мг) и 71% (186 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны. Т.пл. (эксп.) = 239°C (Т.пл. (лит.) = 235-240°C [311]).

ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 3,06 (д, $J = 17,0$, 1H); 3,45 (д, $J = 17,0$, 1H); 6,72 (уш.с, 1H); 8,63 (д, $J = 2,3$, 1H); 8,78 (д, $J = 2,3$, 1H); 11,78 (с, 1H).

2-(3-Гидрокси-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3g)

Получена из 129 мг (0,88 ммоль) изатина (**1g**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 76% (138 мг) и 70% (127 мг) соответственно.

ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,51 (д, $J = 15,4$, 1H); 2,61 (д, $J = 15,4$, 1H); 6,75 (д, $J = 7,7$, 1H); 6,86-6,92 (м, 1H); 7,10-7,18 (м, 1H); 7,25 (д, $J = 7,2$, 1H); 10,17 (уш.с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 42,37; 66,80; 73,00; 109,88; 121,73; 124,34; 129,57; 143,19; 168,88; 170,71,

2-(3-Гидрокси-5-бром-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3h)

Получена из 198 мг (0,88 ммоль) 5-бромизатина (**1h**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методикам **A** и **B**. Выход составил 77% (194 мг) и 80% (202 мг) соответственно. Спектры ЯМР идентичны.

ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,89 (д, $J = 16,0$, 1H); 3,02 (д, $J = 16,0$, 1H); 6,74 (д, $J = 8,2$, 1H); 7,37 (дд, $J = 1,5$, $J = 8,2$, 1H); 7,51 (с, 1H); 10,37 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 41,80; 73,04; 111,88; 113,43; 127,36; 132,17; 134,30; 142,57; 170,74; 178,10,

HRMS (ESI) для $C_{10}H_9BrNO_4$ (M+H) найдено: 285,9709; рассчитано: 285,9709; (M+Na) найдено: 307,9529; рассчитано: 307,9529,

2-(1-Бензил-3-гидрокси-5-метокси-2-оксоиндолин-3-ил)уксусная кислота (3i)

Получена из 237 мг (0,88 ммоль) 1-бензил-5-метоксиизатина (**1i**) и 0,2 г. (1,92 ммоль) малоновой кислоты согласно методике **A**. Выход составил 56% (161 мг).

ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,98-3,10 (м, 2H); 3,67 (с, 3H); 4,74 (д, $J = 16,0$, 1H); 4,89 (д, $J = 16,0$, 1H); 6,59 (д, $J = 8,4$, 1H); 6,73 (дд, $J = 2,7$, $J = 8,4$, 1H); 7,05 (д, $J = 2,6$, 1H); 7,20-7,32 (м, 3H); 7,38 (д, $J = 7,1$, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 42,04; 43,22; 55,95; 66,81; 71,76; 73,15; 109,81; 111,62; 113,66; 127,59; 128,85; 132,38; 136,81; 136,98; 153,76; 168,85; 170,80; 176,80,

4.2. Синтез замещенных 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов без гидроксигруппы

Общая методика синтеза циан(2-оксоиндолин-3-илиден)уксусных кислот 4a-d [3,5]

В одnogорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, снабженную магнитным перемешивающим элементом и обратным холодильником поместили замещенный изатин (1 эквивалент), циануксусную кислоту (1 эквивалент), 30 мл диоксана, перегнанного над натрием, и триэтиламин (1 эквивалент). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После окончания реакции к смеси добавляли 30 мл концентрированной HCl и кипятили в течение 15 минут. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывая небольшими количествами холодной воды и эфиром, и высушивали на воздухе.

Циан(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)уксусная кислота (4a)

По **общей методике** из 10 г (0,068 моль) изатина (**1g**) и 5,78 г (0,068 моль) циануксусной кислоты получено 12,3 г (85%) продукта **4a**. Т. пл. (эксп.) = 203°C. Т. пл. (лит.) = 204°C.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 6,85* (д., J = 7,8, 1H), 6,93** (д., J = 7,8, 1H), 6,97* (д.д., J₁=1,1, J₂ = 7,8, 1H), 7,07** (д.д., J = 1,0, 7,8, 1H), 7,41* (т., J = 7,8, 1H), 7,45** (т., J = 7,8, 1H), 7,77** (д., J = 7,8, 1H), 8,03* (д., J = 7,8, 1H), 10,08* (с., 1H), 11,08** (с., 1H) ** - основной диастереомер, * - минорный диастереомер. Соотношение основного и минорного стереоизомеров 5:2,

Циан(2-оксо-5-бром-индолин-3-илиден)уксусная кислота (4b)

По **общей методике** из 5 г (0,0221 моль) изатина (**1h**) и 1,89 г (0,0221 моль) циануксусной кислоты получено 5,24 г (81%) продукта **4b**. Т. пл. (эксп.) = 243-244°C. Т. пл. (лит.) = 240°C [237].

ЯМР ¹H, (CDCl₃, δ, м.д., J, Гц): 6,82* (д, J=8,3, 1H), 6,87** (д, J=8,3, 1H), 7,58** (д, J=8,4, 1H), 7,59* (д, J=8,4, 1H), 7,86** (с, 1H), 8,26* (с, 1H), 11,00** (с, 1H), 11,15* (с, 1H). ** - основной продукт, * - минорный продукт. Соотношение основного и минорного стереоизомеров 5:4,

Циан(2-оксо-5-метокси-индолин-3-илиден)уксусная кислота (4c)

По **общей методике** из 10,3 г (0,058 моль) изатина (**1c**) и 4,94 г (0,058 моль) циануксусной кислоты получено 7,8 г (53%) продукта **4c**. Т. пл. (эксп) = 195-197°C. Т. пл. (лит) = 193-210°C.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J, Гц): 3,69** (с, 3H); 3,74* (с, 3H); 6,78 (д., J = 8,6, 2H); 7,00-7,09 (м, 1H); 7,36-7,43 (м, 2H); 7,69 (д., J = 2,5, 1H); 10,66 (с, 1H), 10,83 (с, 1H). ** - основной продукт, * - минорный продукт. Соотношение основного и минорного стереоизомеров 3:2,

*Циан(*N*-бензил-2-оксо-5-метокси-индолин-3-илиден)уксусная кислота (**4d**)*

По **общей методике** из 7,422 г (0,028 моль) изатина (**1i**) и 2,465 г (0,029 моль) циануксусной кислоты получено 6,42 г (68%) продукта **4d**. Т. пл. (эксп) = 155°C. Т. пл. (лит) = 152-153°C.

ЯМР ^1H (DMFSO-d_6 , δ , м.д., J, Гц): 3,69** (с., 3H); 3,65* (с., 3H); 4,79** (с., 2H); 4,81* (с., 2H); 6,63** (д., J = 8,59, 1H); 6,6* (д., J = 8,59, 1H); 6,85** (дд, J = 2,53; J = 8,59, 1H); 6,84* (дд, J = 2,53; J = 8,59, 1H); 7,21 (м., 5H); 7,54** (д., J = 2,52, 1H); 7,81* (д., J = 2,52, 1H). ** - основной продукт, * - минорный продукт. Соотношение основного и минорного стереоизомеров 4:1,

ЯМР ^{13}C (DMFSO-d_6 , δ , м.д.): 43,71, 55,83, 108,75, 111,10 114,61, 115,33, 119,72, 120,63, 127,35, 128,45, 129,97, 135,02, 138,53, 139,15, 156,06, 161,73, 164,08,

Общая методика синтеза оксиндолов 5a-d [3,5]

В круглодонной колбе растворяли 0,024 моль циано(2-оксоиндолин-3-илиден)уксусной кислоты (**4a-d**) в смеси этанола (20 мл) и 3N соляной кислоты (20 мл). Затем порциями добавляли цинковый порошок (2,500 г, 0,038 моль). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем органическую фазу отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель упаривали в вакууме. К полученному остатку добавляли 20 мл 2-этоксиэтанола и кипятили с обратным холодильником 2,5 ч. Очистку проводили методом колоночной хроматографии (элюент — MeOH/EtOAc 1/1).

*(2-Оксиндол-3-ил)ацетонитрил (**5a**)*

По **общей методике** из 5,140 г. соединения **4a** получено 2,851 г. (69%) продукта **5a**, коричневого порошок.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J, Гц): 2,61 (дд, J=16,8; J=8,2, 1H); 2,88 (дд, J=16,8; J=8,1, 1H); 3,44 (м, 1H); 6,74 (д, J=6,5, 1H); 6,84 (т, J=5,8, 1H); 7,05 (т, J=6,1, 1H); 7,22 (д, J=6,3, 1H); 10,03 (с, 1H, NH).

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$: найдено: 173,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 214,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$.

Элементный анализ (%): $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}\cdot\text{HCl}\cdot 0,2\text{MeOH}\cdot 0,2\text{EtOAc}$ рассчитано: С 56,78; Н 4,94; N 12,04; найдено: С 56,74; Н 4,94; N 11,86,

*(5-Бром-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил (**5b**)*

По **общей методике** из 7,033 г. соединения **4b** получено 2,712 г. (45%) продукта **5b**, бежевый порошок.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 3,09 (дд, $J=5,7$; $J=17,1$, 1H); 3,26 (дд, $J=6,0$; $J=17,1$, 1H); 3,88 (т, $J=5,7$, 1H); 6,82 (д, $J=8,2$, 1H); 7,41 (дд, $J=2,1$; $J=8,3$, 1H); 7,60 (д, $J=1,9$, 1H); 10,73 (с, 1H, $-\text{NH}$).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 17,87; 41,90; 111,94; 113,83; 118,50; 127,67; 130,09; 131,70; 142,63; 176,52,

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}$: найдено: 248,9 $[\text{M}-\text{H}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) найдено: 250,9814; рассчитано: 250,9820,

Элементный анализ (%): $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}\cdot 0,6\text{HCl}\cdot 0,3\text{MeOH}\cdot 0,3\text{EtOAc}$ рассчитано: С 44,42; Н 3,73; N 8,88; найдено: С 44,42; Н 3,07; N 8,87,

(5-Метокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил (5c)

По **общей методике** из 5,861 г. соединения **4c** получено 2,523 г. (52%) продукта **5c**, коричневатый порошок.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 3,04 (дд, $J=5,7$; $J=17,0$, 1H); 3,21 (дд, $J=5,8$; $J=17,1$, 1H); 3,70 (с, 3H); 3,77 (т, $J=5,7$, 1H); 6,75–6,81 (м, 2H); 7,06 (д, $J=2,2$, 1H); 10,43 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 18,03; 42,17; 55,88; 110,35; 111,88; 113,55; 118,65; 128,82; 136,44; 155,30; 176,69,

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$: найдено: 203,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 244,2 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; 266,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) найдено: 203,0817; рассчитано: 203,0816,

(N-Бензил-5-метокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил (5d)

По **общей методике** из 8,023 г. соединения **4d** получено 4,841 г. (69%) продукта **5d**, бежевый порошок.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 3,19 (дд, $J=5,6$; $J=17,1$, 1H); 3,28–3,38 (м, 1H); 3,70 (с, 3H); 4,02 (д, $J=2,3$, 1H); 4,84 (д, $J=15,8$, 1H); 4,94 (д, $J=15,9$, 1H); 6,74–6,82 (м, 2H); 7,16 (д, $J=2,3$, 1H); 7,20–7,33 (м, 5H).

ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 19,08; 41,72; 44,03; 55,59; 109,99; 111,48; 113,71; 116,88; 124,93; 127,21; 127,75; 128,83; 135,29; 136,69; 156,27; 173,86,

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: найдено: 293,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 334,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; 356,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) найдено: 293,1289; рассчитано: 293,1285,

Элементный анализ (%): $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\cdot 0,5\text{HCl}\cdot 0,5\text{MeOH}$ рассчитано: С 68,04; Н 5,71; N 8,58; найдено: С 68,07; Н 5,37; N 8,49,

Синтез оксиндолов 6a,b

(2-Оксиндол-3-илиден)уксусная кислота (6a)

В круглодонную колбу внесли раствор 7,25 г (0,049 моль) изатина (**1g**) в 13 мл пиридина, 5,10 г (0,049 моль) малоновой кислоты и 75 мкл (0,8 ммоль) пиперидина. Реакционную смесь кипятили 30 часов с обратным холодильником. Выпавший коричневый осадок отфильтровывали, промывали сперва 20 мл концентрированной HCl, а затем водой до нейтральной реакции. Высушивали на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Продукт выделен в виде единственного стереоизомера. Выход составил 58 % (5,46 г).

ЯМР ^1H (DMCO- d_6 , δ м.д., J, Гц): 7,69 (с, 1H); 8,03 (т, J = 7,6, 1H); 8,18 (д, J = 8,2, 1H); 8,33 (т, J = 7,6, 1H); 8,94 (д, J = 8,1, 1H); 12,88 (уш.с, 1H).

(5-Бром-2-оксиндол-3-илиден)уксусная кислота (6b)

В реакцию ввели 2,57 г (0,011 моль) 5-бром-изатина (**1h**), 1,19 г (0,011 моль) малоновой кислоты, 5 мл пиридина, 75 мкл (0,8 ммоль) пиперидина. Реакционную смесь кипятили 30 часов с обратным холодильником. Выпавший коричневый осадок отфильтровывали, промывали сперва 20 мл концентрированной HCl, а затем водой до нейтральной реакции. Высушивали на воздухе. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Продукт выделен в виде единственного стереоизомера. Выход составил 20 % (0,62 г).

ЯМР ^1H (DMCO- d_6 , δ м.д., J, Гц): 6,98 (с, 1H); 7,31 (д, J = 8,8, 1H); 7,69 (д, J = 8,8, 1H); 8,42 (с, 1H); 12,21 (с, 1H).

Синтез оксиндолов 7a–d

(2-Оксиндол-3-ил)уксусная кислота (7a)

В круглодонную колбу растворяли 1,000 г (0,005 моль) (2-оксоиндол-3-илиден)уксусной кислоты **6a** в этаноле (30 мл). Затем добавляли цинковый порошок (2,000 г, 0,031 моль) и по каплям добавляли 4,5 мл (0,054 моль) концентрированной соляной кислоты. Реакционную смесь перемешивали 3 часа. После добавляли 10 мл воды и гидрокарбонат натрия до pH=8, Растворители удаляли в вакууме роторного испарителя. Остаток растворяли в 5 мл смеси MeOH/EtOAc 1/1 и проводили колоночную хроматографию (элюент — MeOH/EtOAc 1/1, $R_f \sim 0,7$). Получено 0,782 г (77%) продукта **7a** в виде оранжево-коричневого масла.

ЯМР ^1H (DMCO- d_6 , δ м.д., J, Гц): 2,48 (дд, J=6,8, J=16,1, 1H), 2,64 (дд, J=4,8, J=16,1, 1H), 3,43 (т, J=5,8, 1H), 6,70 (д, J=8,4, 1H), 7,21 (дд, J=2,3, J=8,4, 1H), 7,38 (д, J=2,3, 1H), 9,89 (с, 1H, -NH).

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$: найдено: 233,2 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; 356,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$ (M+H) найдено: 192,0659, рассчитано: 192,0656,

(5-Бром-2-оксиндол-3-ил)уксусная кислота (7b)

Аналогично из 0,500 г (0,002 моль) **6b** получено 0,340 г (68%) **7b** в виде бежевого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,48–2,54 (м, 1H), 2,61 (дд, $J=4,9$, $J=16,2$, 1H), 3,42–3,46 (м, 1H), 6,87 (д, $J=7,4$, 1H), 7,09 (дд, $J=2,5$, $J=8,3$, 1H), 7,23 (д, $J=7,5$, 1H), 9,89 (с, 1H, –NH).

HPLC-МС (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrNO}_3$: найдено: 395,95 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{HCOOH}+\text{K}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrNO}_3$ (M+H) найдено: 269,9761, рассчитано: 269,9760,

(5-Метокси-2-оксиндол-3-ил)уксусная кислота (7c)

(5-Метокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил **5c** (0,100 г, 0,409 ммоль) суспендировали в 10 мл (0,114 моль) концентрированной HCl, кипятили 3 часа. Затем в реакционную смесь добавляли 10 мл воды и NaHCO_3 до pH=7, Растворители удаляли на роторном испарителе. Остаток растворяли в 5 мл смеси MeOH/EtOAc 1/1 и проводили колоночную хроматографию (элюент — MeOH/EtOAc 1/1, $R_f \sim 0,7$). Получено 0,072 г (66%) **7c** в виде коричнево-бежевого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,42–2,50 (м, 2H); 2,59 (дд, $J=4,5$; $J=16,1$, 1H); 3,66 (с, 3H); 3,46–3,76 (м, 1H); 6,66–6,74 (м, 2H); 6,86 (д, $J=2,5$, 1H); 9,75 (с, 1H, –NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 33,57; 43,95; 55,23; 112,44; 114,40; 115,61; 124,48; 131,50; 154,21; 169,09; 174,76,

(N-Бензил-5-метокси-2-оксиндол-3-ил)уксусная кислота (7d)

Аналогично из 0,070 г (0,209 ммоль) (N-бензил-5-метокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрила **5d** получено 0,038 г (51%) **7d** в виде бежевого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J , Гц): 2,62–2,72 (м, 1H); 2,94 (дд, $J=4,4$; $J=16,9$, 1H); 3,64 (с, 3H); 3,74–3,79 (м, 1H); 4,79 (д, $J=15,8$, 1H); 4,89 (д, $J=15,9$, 1H); 6,61–6,71 (м, 2H); 6,97–7,01 (м, 1H); 7,19–7,35 (м, 5H).

HRMS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ (M+H) найдено: 312,1236, рассчитано: 312,1232,

4.3. Синтез замещенных 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов

Общая методика синтеза 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов 8a–g и 9a–g [2]

Полностью аналогична Методу А синтеза 3-гидрокси-2-оксиндолов **2a–i** и **3a–i**.

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-[3-(трифторметил)фенил]-2-оксиндол (8a)

Получен из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[3-(трифторметил)фенил]-изатина (**1j**) и 6 мг (0,07 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике А. Выход составил 43% (10 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,08 (д, $J = 16,5$, 1H, CH_2), 3,18 (д, $J = 16,5$, 1H, CH_2), 6,73 (ушир. с, 1H, OH), 6,98 (д, $J = 8,1$, 1H, CH_7), 7,67–7,73 (м, 3H, CH_{Ar}), 7,85 (д, $J = 1,8$, 1H, CH_4), 7,90–7,96 (м, 2H, CH_{Ar}), 10,72 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 25,95 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 72,19 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$); 110,62; 115,76; 117,11; 120,03 (кв, $J=270,35$, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$); 122,45; 123,63; 125,64; 128,88; 130,03; 130,20; 130,77, 132,48; 140,99; 141,91; 176,79 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-[4-(трифторметил)фенил]-2-оксиндол (8b)

Получен из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(трифторметил)фенил]-изатина (**1k**) и 6 мг (0,07 ммоль) цианоксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 88% (20 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,07 (д, $J = 16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3,15 (д, $J = 16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 6,77 (ушир. с, 1H, $\underline{\text{O}}\text{H}$), 7,00 (д, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{C}7}$), 7,69 (дд, $J = 2,0$, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{C}6}$), 7,78-7,86 (м, 5H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 10,77 (с, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,00 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 72,13 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$); 110,68; 117,14; 122,97; 124,80 (кв, $J=284,72$, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$); 125,80; 125,96; 126,84; 127,23; 127,54; 129,01; 130,80, 132,51; 142,13; 143,97; 176,82 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-(3-метоксифенил)-2-оксиндол (8c)

Получен из 20 мг (0,08 ммоль) 5-(3-метоксифенил)-изатина (**1l**) и 7 мг (0,08 ммоль) цианоксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 65% (15 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,04 (д, $J = 16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3,14 (д, $J = 16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3,81 (с, 1H, $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 6,71 (ушир. с, 1H, $\underline{\text{O}}\text{H}$), 6,90 (дд, $J = 2,1$, $J = 8,2$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 6,95 (д, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 7,12-7,13 (м, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 7,17 (д, $J = 7,8$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 7,34-7,38 (м, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 7,60 (дд, $J = 1,8$, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 7,77 (д, $J = 1,8$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$), 10,68 (с, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,06 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 55,14 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 72,15 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$); 110,42; 111,76; 112,54; 117,21; 118,53; 122,78; 128,53; 130,12; 130,51; 134,12, 141,26; 141,52; 159,83 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 176,82 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-(1,3-тиазол-5-ил)-2-оксиндол (8d)

Получен из 20 мг (0,09 ммоль) 5-(1,3-тиазол-5-ил)-изатина (**1m**) и 7 мг (0,09 ммоль) цианоксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 43% (10 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,06 (д, $J=16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3,14 (д, $J=16,6$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 6,22 (ушир. с, 1H, $\underline{\text{O}}\text{H}$), 6,96 (д, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{C}7}$), 6,63 (дд, $J = 1,7$, $J = 8,1$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{C}6}$), 7,77 (д, $J = 1,7$, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{C}4}$), 8,18 (с, 1H, $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{N}$), 9,03 (с, 1H, $\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}$), 10,86 (с, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 25,91 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 72,08 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$); 110,81; 113,00; 117,01; 122,32; 122,84; 124,57; 128,67; 130,91; 136,31; 142,09 ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}$); 176,56 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-[4-(метилсульфанил)фенил]-2-оксиндол (8e)

Получен из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(метилсульфанил)фенил]-изатина (**1n**) и 6 мг (0,07 ммоль) цианоксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 76% (16 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,49 (с, 3H, CH_3S), 3,03 (д, $J=16,6$, 1H, CH_2), 3,13 (д, 1H, $J=16,6$, CH_2), 6,72 (ушир. с, 1H, OH), 6,95 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,34 (д, $J=8,4$, 2H, CH_{Ar}), 7,53-7,60 (м, 3H, CH_{Ar}), 7,75 (д, $J=1,6$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 10,69 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 14,75 (SCH_3); 26,08 (CH_2); 72,14 (CH-OH); 110,53; 117,22; 122,33; 126,58; 126,59; 128,07; 130,62; 133,61; 136,54; 136,97; 141,03; 176,79 (C=O)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-оксиндол (8f)

Получен из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(метилсульфонил)фенил]-изатина (**1o**) и 6 мг (0,07 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике А. Выход составил 64% (15 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,07 (д, $J=16,5$, 1H, CH_2), 3,15 (д, 1H, $J=16,5$, CH_2), 3,24 (с, 3H, CH_3SO_2), 6,76 (ушир. с, 1H, OH), 7,01 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,71 (дд, $J=1,9$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,86 (д, $J=1,9$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,88 (д, $J=8,5$, 2H, CH_{Ar}), 7,99 (д, $J=8,5$, 2H, CH_{Ar}), 10,79 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,00 (CH_2); 43,66 (CH_3SO_2); 72,12 (CH-OH); 110,72; 117,12; 123,11; 126,90; 127,82; 129,21; 130,84; 132,30; 139,09; 142,34; 144,92; 176,78 (C=O)

3-Гидрокси-3-(цианометил)-5-(4-цианофенил)-2-оксиндол (8g)

Получен из 20 мг (0,08 ммоль) 5-(4-цианофенил)-изатина (**1p**) и 7 мг (0,16 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике А. Выход составил 82% (19 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 3,07 (д, $J=16,6$, 1H, CH_2), 3,15 (д, 1H, $J=16,6$, CH_2), 6,75 (ушир. с, 1H, OH), 7,00 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,71 (дд, $J=1,8$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,82 (д, $J=8,4$, 1H, CH_{Ar}), 7,85 (д, $J=1,8$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,91 (д, $J=8,4$, 1H, CH_{Ar}), 10,78 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 25,97 (CH_2); 72,12 (CH-OH); 109,47; 110,71; 117,10; 118,98; 123,00; 126,88; 129,12; 130,84; 132,14; 133,01; 142,42; 144,43; 176,79 (C=O).

{3-Гидрокси-2-оксо-5-[3-(трифторметил)фенил]-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил}уксусная кислота (9a)

Получена из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[3-(трифторметил)фенил]-изатина (**1j**) и 14 мг (0,14 ммоль) малоновой кислоты согласно методике В.

Выход составил 49% (12 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,93 (д, $J=15,9$, 1H, CH_2), 3,11 (д, $J=15,9$, 1H, CH_2), 6,89 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,61 (дд, $J=2,0$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,65-7,67 (м, 2H, CH_{Ar}), 7,77 (д, $J=2,0$, 2H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,89-7,94 (м, 2H, CH_{Ar}), 10,39 (с, 1H, NH).

{3-Гидрокси-2-оксо-5-[4-(трифторметил)фенил]-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил}уксусная кислота (9b)

Получена из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(трифторметил)фенил]-изатина (**1k**) и 14 мг (0,14 ммоль) малоновой кислоты согласно методике А. Выход составил 73% (18 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,94 (д, $J=16,0$, 1H, CH_2), 3,07 (д, 1H, $J=16,0$, CH_2), 6,15 (ушир. с, 1H, OH), 6,90 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,60 (дд, $J=2,0$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,74 (д, $J=1,8$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,77 (д, $J=8,4$, 1H, CH_{Ar}), 7,83 (д, $J=8,4$, 1H, CH_{Ar}), 10,40 (с, 1H, NH), 12,13 (с, 1H, COOH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 41,61 (CH_2); 72,63 (CH-OH); 110,00; 122,70; 125,04 (кв, $J=289,51$, CF_3); 125,78; 126,74; 128,11; 131,74; 132,39; 143,40; 144,20; 170,42 (NH-C=O); 178,25 (COOH).

[3-Гидрокси-2-оксо-5-(3-метоксифенил)-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил]уксусная кислота (9c)

Получена из 20 мг (0,08 ммоль) 5-(3-метоксифенил)-изатина (**1l**) и 16 мг (0,16 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 77% (19 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,92 (д, $J=15,8$, 1H, CH_2), 3,06 (д, $J=15,8$, 1H, CH_2), 3,81 (с, 1H, OCH_3), 6,84 (д, $J=8,1$, 1H, CH_{Ar}), 6,90 (дд, $J=2,4$, $J=7,7$, 1H, CH_{Ar}), 7,09-7,11 (м, 1H, CH_{Ar}), 7,15 (д, $J=7,9$, 1H, CH_{Ar}), 7,30-7,36 (м, 1H, CH_{Ar}), 7,51 (дд, $J=2,0$, $J=8,1$, 1H, CH_{Ar}), 7,65 (д, $J=1,8$, 1H, CH_{Ar}), 10,32 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 55,12; 72,68; 109,75; 111,58; 112,37; 118,49; 122,53; 127,63; 129,97; 132,05; 133,36; 141,76; 142,51; 159,78; 170,45; 178,25,

[3-Гидрокси-2-оксо-5-(1,3-тиазол-5-ил)-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил]уксусная кислота (9d)

Получена из 20 мг (0,09 ммоль) 5-(1,3-тиазол-5-ил)-изатина (**1m**) и 18 мг (0,17 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 40% (10 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,93 (д, $J=16,1$, 1H, CH_2), 3,06 (д, $J=16,1$, 1H, CH_2), 6,83 (д, $J=8,0$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,51 (дд, $J=2,0$, $J=8,0$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,67 (д, $J=1,8$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 8,18 (с, 1H, C=CH-N), 9,00 (с, 1H, N=CH-S), 10,41 (с, 1H, NH).

{3-Гидрокси-2-оксо-5-[4-(метилсульфанил)фенил]-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил}уксусная кислота (9e)

Получена из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(метилсульфанил)фенил]-изатина (**1n**) и 16 мг (0,15 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 71% (16 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,49 (с, 3H, CH_3S), 2,92 (д, $J=15,8$, 1H, CH_2), 3,05 (д, 1H, $J=15,8$, CH_2), 6,84 (д, $J=8,0$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,31 (д, $J=8,5$, 2H, CH_{Ar}), 7,49 (дд, $J=2,0$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,55 (д, $J=8,4$, 2H, CH_{Ar}), 7,63 (д, $J=1,8$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 10,33 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 14,80; 41,64; 72,69; 109,87; 122,06; 126,51; 126,56; 127,18; 132,13; 132,85; 136,54; 136,81; 142,27; 170,42; 178,21,

{3-Гидрокси-2-оксо-5-[4-(метилсульфонил)фенил]-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил}уксусная кислота (9f)

Получена из 20 мг (0,07 ммоль) 5-[4-(метилсульфонил)фенил]-изатина (**1o**) и 14 мг (0,13 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 75% (18 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,94 (д, $J=15,9$, 1H, CH_2), 3,08 (д, 1H, $J=16,0$, CH_2), 3,23 (с, 3H, CH_3SO_2), 6,16 (ушир. с, 1H, OH), 6,90 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,63 (дд, $J=2,0$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,76 (д, $J=1,7$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,87 (д, $J=8,6$, 2H, CH_{Ar}), 7,96 (д, $J=8,5$, 2H, CH_{Ar}), 10,42 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 41,59; 41,98; 43,68; 72,61; 110,05; 122,83; 126,77; 127,69; 128,33; 131,51; 132,44; 138,78; 143,63; 145,13; 168,47; 170,42; 178,26,

[3-Гидрокси-2-оксо-5-(4-цианофенил)-2,3-дигидро-1H-индол-3-ил]уксусная кислота (**9g**)

Получена из 20 мг (0,08 ммоль) 5-(4-цианофенил)-изатина (**1p**) и 17 мг (0,16 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A**. Выход составил 74% (18 мг).

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , м.д., J , Гц): 2,95 (д, $J=16,0$, 1H, CH_2), 3,10 (д, 1H, $J=16,0$, CH_2), 6,16 (ушир. с, 1H, OH), 6,90 (д, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}7}$), 7,62 (дд, $J=1,8$, $J=8,1$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}6}$), 7,77 (д, $J=1,7$, 1H, $\text{CH}_{\text{C}4}$), 7,82 (д, $J=8,5$, 1H, CH_{Ar}), 7,88 (д, $J=8,4$, 1H, CH_{Ar}), 10,43 (с, 1H, NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 41,54; 41,99; 72,58; 109,12; 110,04; 119,06; 112,72; 126,77; 128,23; 131,34; 132,46; 132,88; 143,72; 144,64; 168,48; 170,45; 178,28,

4.4. Синтез замещенных амин-замещенных 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов

Подход к синтезу 2-(5-амино-3-гидрокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрила (10a)

2-(3-Гидрокси-5-нитро-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (**2a**) получили из 227 мг (1,18 ммоль) изатина (**1a**) и 0,1 г (1,18 ммоль) цианоуксусной кислоты согласно методике **A** (раздел 4.1) без выделения. Реакционную смесь горячей перелили в двугорлую круглодонную колбу емкостью 50 мл, снабженную обратным холодильником и термометром. К раствору добавили 5 мл смеси диоксан/вода в соотношении 3/1 и 0,5 г (2,87 ммоль) дитионита натрия. Реакционную смесь кипятили при перемешивании в течение 1 часа. Далее колбу охладили до комнатной температуры. Выпавший осадок отделили на фильтре Шотта и промыли небольшими порциями холодной воды. Осадок высушили, его масса составила 198 мг.

На спектрах ЯМР продукта наблюдались сигналы двух основных соединений. В сравнении спектром исходного соединения (**2a**) сигналы были заметно сдвинуты в сторону сильного поля, что свидетельствует о том, что произошло восстановление нитро-группы. Предположительно продукт является смесью 2-(5-амино-3-гидрокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрила (**10a**) и 2-(3-гидрокси-5-гидроксиамино-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрила (**10a'**).

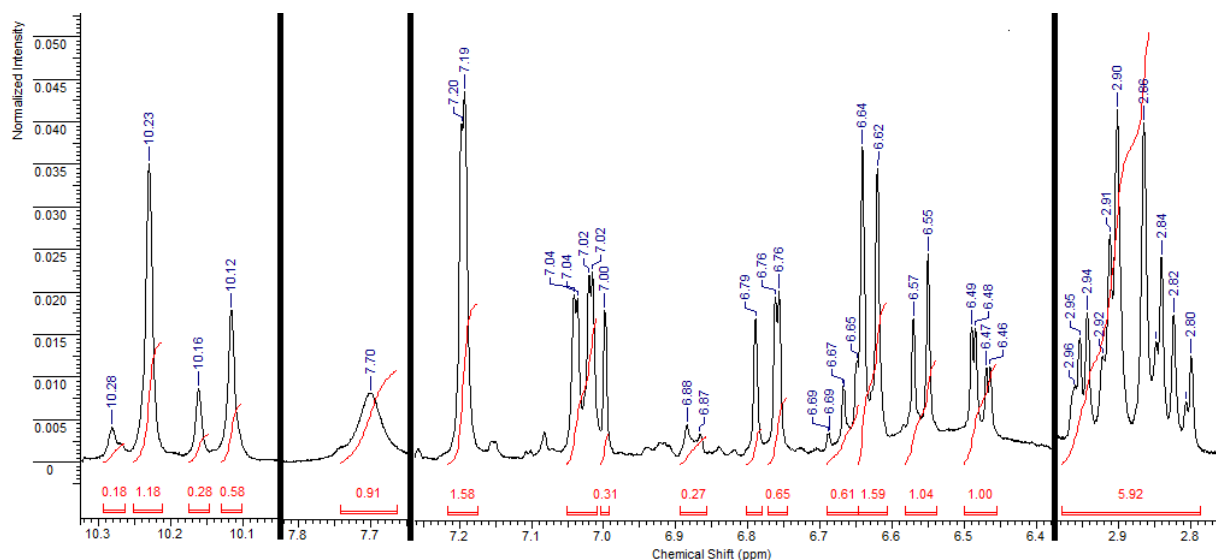


Рисунок 4.1. Спектр ЯМР ^1H смеси продуктов восстановления 2-оксиндола **2a** с помощью дитионита натрия.

2-(5-Амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил (**10a**)

В круглодонную колбу внесли 1 г (5-нитро-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрила (**2a**). Затем прилили 15 мл этанола, 15 мл этилацетата и добавили 1,8 г металлического цинка. Медленно при интенсивном перемешивании добавляли в реакционную смесь 4,6 мл концентрированной соляной кислоты, перемешивали при комнатной температуре 3 часа и остановили реакцию добавлением 4,5 мл воды. Полученный раствор отфильтровали на стеклянном фильтре, затем в фильтрат добавляли воду и твердый гидрокарбонат натрия до pH = 8, Смесь упарили на роторном испарителе и добавили в колбу, содержащую сухой остаток, этилацетат. Полученный раствор отфильтровали, упарили в вакууме. Получено 542 мг (62%) желто-зеленого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,82 (д, J = 16,6, 1H); 2,94 (д, J = 16,6, 1H); 4,85 (с, 2H); 6,44 – 6,50 (м, 1H); 6,55 (д, J = 8,2, 1H); 6,76 (д, J = 2,3, 1H); 10,11 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,45; 72,42; 110,39; 110,97; 114,48; 117,22; 130,53; 130,74; 144,19; 176,36,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H) найдено: 204,0771; рассчитано: 204,0769,

Циан(2-оксо-5-нитро-индолин-3-илиден)уксусная кислота (**4e**) [3]

В круглодонную колбу поместили 2 г (0,01 моль) 5-нитроизатина (**1a**), 7,1 мл диоксана, 0,9 г (0,01 моль) цианоуксусной кислоты и прилили 1,71 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали на протяжении 4 часов. Затем добавили 6,6 мл концентрированной соляной кислоты, плотно закрыли колбу и оставили на ночь. На следующий день наблюдалось выпадение оранжево-красного осадка, который отфильтровали на стеклянном фильтре, промыли небольшим количеством холодной воды и сушили на воздухе. Получили 2 г (74%) продукта в виде оранжевого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 7,01 (д, J = 8,8, 1H); 8,29 (дд, J = 2,4, J = 8,7, 1H); 9,05 (д, J = 2,4, 1H); 11,72 (с, 1H).

(5-Нитро-2-оксиндол-3-илиден)ацетонитрил (**4e'**) [3]

В круглодонную колбу поместили 1 г (0,004 моль) циан(2-оксо-5-нитро-индолин-3-илиден)уксусной кислоты (**4e**) и добавили 40 мл 2-этоксипропанола. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником на протяжении 2 часов, затем растворитель упарили в вакууме, сухой остаток растворили в этилацетате и пропустили через слой силикагеля. Растворитель удалили в вакууме роторного испарителя. Получили 0,63 г (76%) продукта в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 6,74* (с, 1H); 6,98** (д, J = 8,8, 1H); 7,04* (д, J = 8,7, 1H); 7,28** (с, 1H); 8,23** (дд, J = 2,3, J = 8,7, 1H); 8,28* (дд, J = 2,3, J = 8,7, 1H); 8,51* (д, J = 2,1, 1H); 8,64** (д, J = 2,3, 1H); 11,52** (с, 1H); 11,57* (с, 1H). * - основной продукт, ** - минорный продукт. Соотношение основного и минорного продукта 6:5,

(5-Амино-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил (**10b**)

В круглодонную колбу внесли 0,4 г (0,002 моль) (5-нитро-2-оксиндол-3-илиден)ацетонитрила (**4e'**). Затем прилили 10 мл этанола, 10 мл этилацетата и добавили 1 г (0,015 моль) цинковой пыли. Медленно при интенсивном перемешивании добавляли в реакционную смесь 2 мл (0,021 моль) концентрированной соляной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 часа и, по истечению данного времени, остановили реакцию добавлением 3 мл воды. Полученный раствор отфильтровали на стеклянном фильтре, в фильтрат добавляли 10% водный раствор гидроксида натрия до pH=8, Смесь упарили на роторном испарителе и залили колбу, содержащую сухой остаток, смесью MeOH/EtOAc 1:1, отфильтровали, концентрировали. Провели колоночную хроматографию с элюентом MeOH/EtOAc 1:1 ($R_f \sim 0,35$). Получили 0,21 г (60%) продукта в виде темного серо-фиолетового порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,92 (дд, J = 6,5, J = 17,1, 1H); 3,09 (дд, J = 5,6, J = 17,1, 1H); 3,64 (т, J = 6,0, 1H); 4,77 (с, 2H); 6,44 (дд, J = 2,2, J = 8,1, 1H); 6,55 (д, J = 8,2, 1H); 6,64 – 6,68 (м, 1H); 10,15 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 18,30; 42,03; 110,34; 111,49; 113,83; 118,85; 128,36; 132,71; 144,31; 176,25,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ (M+H) найдено: 188,0821; рассчитано: 188,0820,

(5-Нитро-2-оксиндол-3-илиден)уксусная кислота (**6e**)

В круглодонную колбу поместили 2 г (0,008 моль) (5-нитро-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил)уксусной кислоты (**3a**). Добавили 10 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь

кипятили с обратным холодильником на протяжении 3 часов. Далее охладили до комнатной температуры, осадок отфильтровали на стеклянном фильтре, промыли небольшим количеством воды, сушили на воздухе. Получили 1,43 г (77%) продукта в виде порошка серо-бежевого цвета.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 7,02 (с, 1H); 7,39 (д, J = 9,2, 1H); 8,26 (дд, J = 2,6, J = 9,1, 1H); 9,14 (д, J = 2,5, 1H); 12,53 (с, 1H).

(5-Амино-2-оксиндол-3-ил)уксусная кислота (10с)

В круглодонную колбу внесли 1 г (0,004 моль) (5-нитро-2-оксиндол-3-илиден)уксусной кислоты (**6e**). Затем прилили 10 мл этилового спирта и добавили 2 г (0,031 моль) цинковой пыли. Медленно при интенсивном перемешивании добавляли в реакционную смесь 4,2 мл (0,044 моль) концентрированной соляной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 часа и, по истечению данного времени, остановили реакцию добавлением 6,5 мл воды. Полученный раствор отфильтровали на стеклянном фильтре, в фильтрат добавляли 10% водный раствор гидроксида натрия до pH=8, Смесь упарили на роторном испарителе и залили колбу, содержащую сухой остаток, смесью MeOH/EtOAc 1:1, отфильтровали, концентрировали. Провели колоночную хроматографию с элюентом MeOH/EtOAc 1:1 ($R_f \sim 0,2$). Получили 0,46 г (52%) продукта в виде бежевого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,42 (дд, J = 6,5, J = 16,0, 1H); 2,46 – 2,56 (м, 1H); 3,49 – 3,55 (м, 1H); 6,34 (дд, J = 2,5, J = 8,3, 1H); 6,47 – 6,53 (м, 2H); 9,54 (с, 1H).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 33,37; 42,99; 113,29; 114,44; 115,85; 122,51; 127,81; 143,60; 168,28; 174,11,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ (M+H) найдено: 207,0766; рассчитано: 207,0765,

4.5. Синтез 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов

Общая методика синтеза оксиндолов 11a-l, 12a-e и 13a,b [5]

(5-Амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил **10a** (0,070 г, 0,344 ммоль), или (5-амино-2-оксиндол-3-ил)ацетонитрил **10b** (0,064 г, 0,344 ммоль), или (5-амино-2-оксиндол-3-ил)уксусная кислота **10c** (0,071 г, 0,344 ммоль), цианоборогидрид натрия (0,022 г, 0,350 ммоль), безводный хлорид цинка (0,048 г, 0,352 ммоль) и 2 мл метанола помещали в круглодонную колбу. Затем по каплям добавляли раствор альдегида (0,344 ммоль) в 0,3 мл метанола при интенсивном перемешивании в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре, после чего добавляли 2 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, этилацетат (15 мл) и насыщенный раствор NaCl в воде (15 мл), после чего проводили экстракцию. Органическую фракцию несколько раз промывали

насыщенный раствор NaCl, сушили над безводным сульфатом натрия. Очистку проводили методом колоночной хроматографии (элюент — MeOH/EtOAc 1:1).

[5-(2-Метоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11a)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,047 г 2-метоксибензальдегида было получено 0,090 г (81%) продукта **11b** в виде ярко-желтого порошка.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,6, 1H); 2,95 (д, J = 16,5, 1H); 3,83 (с, 3H); 4,15 (д, J = 5,3, 2H); 5,90 (т, J = 6,2, 1H, NH); 6,40 (дд, J = 8,3, J = 2,4, 1H); 6,45 (с, 1H, -OH); 6,59 (д, J = 8,3, 1H); 6,83-6,93 (м, 2H); 6,98 (д, J = 8,2, 1H); 7,16-7,30 (м, 2H); 10,13 (с, 1H, -NH).

ЯМР ¹³C (DMCO-d₆, δ, м.д.): 26,41; 41,85; 55,30; 72,44; 109,71; 110,37; 110,47; 112,12; 117,18; 120,11; 127,44; 127,82; 127,85; 130,71; 130,82; 144,77; 156,89; 176,31,

HPLC-MS (ESI) для C₁₈H₁₇N₃O₃: найдено: 324,2 [M+H]⁺; 365,1 [M+MeCN+H]⁺.

HRMS (ESI) для C₁₈H₁₇N₃O₃ (M+H) найдено: 324,1348; рассчитано: 324,1344,

ИК (ATR): 3378,67 (сл); 3222,47 (ш); 3079,28 (сл); 3044,09 (сл); 3008,41 (сл); 2956,82 (сл); 2929,34 (ш); 2833,88 (сл); 2255,82 (сл, C≡N); 1706,21 (оч.с, C=O); 1655,59 (с); 1605,93 (ср) см⁻¹.

[5-(4-Хлорбензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11b)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,048 г 4-хлорбензальдегида было получено 0,081 г (72%) продукта **11a** в виде бледно-желтого порошка.

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 2,84 (д, J = 16,6, 1H); 2,94 (д, J = 16,6, 1H); 4,19 (д, J = 7,0, 2H); 6,15 (т, J = 6,1, 1H, NH); 6,40 (дд, J = 8,3, J = 2,4, 1H); 6,42 (с, 1H, -OH); 6,57 (д, J = 8,3, 1H); 6,84 (д, J = 2,3, 1H); 7,32–7,42 (м, 4H); 10,12 (с, 1H, -NH).

ЯМР ¹³C (DMCO-d₆, δ, м.д.): 26,38; 46,37; 72,37; 109,98; 110,33; 112,28; 117,18; 128,21; 129,06; 130,74; 131,05; 131,07; 139,47; 144,32; 176,28,

HPLC-MS (ESI) для C₁₇H₁₄N₃O₂Cl: найдено: 370,1 [M+MeCN+H]⁺.

HRMS (ESI) для C₁₇H₁₄N₃O₂Cl (M+H) найдено: 328,0849; рассчитано: 328,0854,

ИК (ATR): 3408,57 (сл); 3219,09 (ш); 3052,76 (сл); 2928,38 (сл); 2846,90 (сл); 2825,20 (сл); 2257,27 (сл, C≡N); 1707,66 (с, C=O); 1658,00 (оч.с); 1607,38 (ср) см⁻¹.

Из-за низкой растворимости соединение было переведено в солевую форму для биологических испытаний. К раствору соединения **11a** (0,01 г, 0,031 ммоль) в метаноле (1 мл) в атмосфере аргона добавили смесь воды (5 мл) и концентрированной соляной кислоты (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и упаривали в вакууме. Продукт получен в виде желтого порошка с выходом 100% (0,011 г).

ЯМР ¹H (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц): 2,94 (д, J = 16,6, 1H); 3,04 (д, J = 16,6, 1H); 4,43 (с, 2H); 6,85 (д, J = 8,3, 1H); 7,10–7,22 (м, 1H); 7,38–7,50 (м, 5H); 10,69 (с, 1H, -NH).

[5-(4-Фторбензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11c)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,043 г 4-фторбензальдегида было получено 0,062 г (58%) продукта **11c** в виде серо-желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,6, 1H); 2,95 (д, J = 16,6, 1H); 4,19 (д, J = 5,4, 2H); 6,12 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,43 (дд, J = 8,3, J = 2,4, 1H); 6,45 (с, 1H, -OH); 6,58 (д, J = 8,4, 1H); 6,84 (д, J = 2,3, 1H); 7,09-7,18 (м, 2H); 7,34-7,42 (м, 2H); 10,13 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,38; 46,35; 72,38; 109,94; 110,31; 112,31; 117,17; 129,06; 129,14; 130,71; 130,99; 136,43; 144,42; 176,28,

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}$: найдено: 312,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 353,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}$ (M+H) найдено: 312,1148; рассчитано: 312,1144,

ИК (ATR): 3371,92 (сл); 3225,36 (ш); 2961,16 (сл); 2923,07 (сл); 2850,27 (сл); 2257,27 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1707,66 (оч.с, $\text{C}=\text{O}$); 1660,41 (оч.с); 1606,41 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-Пиридинилметил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11d)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,037 г 4-пиридинкарбоксальдегида было получено 0,067 г (66%) продукта **11d** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,5, 1H); 2,94 (д, J = 16,5, 1H); 4,25 (д, J = 4,6, 2H); 6,20-6,30 (м, 1H, NH); 6,34-6,44 (м, 1H); 6,46 (с, 1H, -OH); 6,59 (д, J = 8,3, 1H); 6,79-6,92 (м, 1H); 7,24-7,42 (м, 2H); 8,43-8,55 (м, 2H); 10,13 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,35; 46,01; 72,33; 109,98; 110,35; 112,25; 117,12; 128,08; 122,32; 131,21; 144,11; 149,46; 149,71; 176,24,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ (M+H) найдено: 295,1193; рассчитано: 295,3154,

[5-(4-Гидроксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11e)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,042 г 4-гидроксибензальдегида было получено 0,052 г (49%) продукта **11e** в виде ярко-желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,6, 1H); 2,95 (д, J = 16,6, 1H); 4,06 (д, J = 5,8, 2H); 5,92 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,41-6,47 (м, 1H); 6,44 (с, 1H, -OH); 6,57 (д, J = 8,2, 1H); 6,66-6,72 (м, 2H); 6,85 (д, J = 2,3, 1H); 7,12-7,18 (м, 2H); 9,24 (с, 1H); 10,12 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,40; 46,82; 72,42; 109,83; 110,27; 112,35; 115,00; 117,18; 128,58; 130,18; 130,61; 130,77; 144,78; 156,12; 176,30,

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$: найдено: 351,1 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ (M+H) найдено: 310,1189; рассчитано: 310,1187,

ИК (ATR): 3357,46 (ср); 3288,52 (ш); 3248,02 (ср); 3036,85 (сл); 3011,30 (сл); 2953,93 (сл); 2919,22 (сл); 2860,88 (сл); 2838,22 (ш); 2264,02 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1682,59 (оч.с, $\text{C}=\text{O}$); 1607,86 (ср); 1597,25 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-(Диметиламино)бензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11f)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,051 г 4-(диметиламино)бензальдегида было получено 0,064 г (55%) продукта **11f** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,82-2,88 (м, 7H); 2,95 (д, J = 16,5, 1H); 4,06 (д, J = 5,3, 2H); 5,90 (т, J = 5,9, 1H, NH); 6,42-6,47 (м, 2H); 6,57 (д, J = 8,3, 1H); 6,65-6,70 (м, 2H); 6,86 (д, J = 2,3, 1H); 7,15-7,20 (м, 2H); 10,11 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,41; 40,34; 46,80; 72,41; 109,82; 110,22; 112,32; 112,43; 117,78; 127,52; 128,18; 130,56; 130,69; 144,81; 149,50; 176,24,

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: найдено: 337,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ (M+H) найдено: 337,1650; рассчитано: 337,1660,

ИК (ATR): 3364,21 (сл); 3273,57 (ш); 3045,05 (сл); 3016,60 (сл); 2987,20 (сл); 2953,45 (сл); 2890,77 (ш); 2828,10 (сл); 2258,23 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1711,51 (оч.с, $\text{C}=\text{O}$); 1605,45 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-Метоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11g)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,047 г 4-метоксибензальдегида было получено 0,057 г (51%) продукта **11g** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,74-2,86 (м, 4H); 2,92 (д, J = 16,7, 1H); 4,04 (д, J = 4,3, 2H); 5,82-5,88 (м, 1H, NH); 6,37-6,46 (м, 2H); 6,54 (д, J = 8,1, 1H); 6,61-6,69 (м, 2H); 6,80-6,84 (м, 1H); 7,11-7,18 (м, 2H); 10,07 (с, 1H, -NH).

HRMS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ (M+H) найдено: 324,1349; рассчитано: 324,1344,

[5-(2,4-Диметоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11h)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,057 г 2,4-диметоксибензальдегида было получено 0,080 г (66%) продукта **11h** в виде коричнево-желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,86 (д, J = 16,5, 1H); 2,96 (д, J = 16,6, 1H); 3,73 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,09 (д, J = 5,7, 2H); 5,78 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,38-6,48 (м, 3H); 6,53-6,60 (м, 2H); 6,84 (д, J = 2,3, 1H); 7,15 (д, J = 8,3, 1H); 10,12 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,40; 41,57; 55,14; 55,37; 72,43; 98,21; 104,28; 109,66; 110,31; 112,20; 117,15; 119,51; 128,74; 130,63; 130,73; 144,79; 157,83; 159,48; 176,27,

ИК (ATR, cm^{-1}): 3464,97 (ш); 3297,68 (ш); 3003,11 (сл); 2956,82 (сл); 2935,13 (ш); 2836,78 (сл); 2257,75 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1704,28 (с, $\text{C}=\text{O}$); 1698,98 (с); 1606,41 (с); 1589,06 (с).

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$: найдено: 354,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 395,2 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; 417,2 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{Na}]^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ (M+H) найдено: 354,1448; рассчитано: 354,1454,

Элементный анализ (%): $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot \text{HCl} \cdot \text{MeOH}$ рассчитано: С 56,94, Н 5,73, N 9,96; найдено: С 57,07, Н 5,64, N 9,79,

[5-(2,5-Диметоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11i)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,057 г 2,5-диметоксибензальдегида было получено 0,096 г (79%) продукта **11i** в виде темно-желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,5, 1H); 2,95 (д, J = 16,6, 1H); 3,64 (с, 3H); 3,77 (с, 3H); 4,15 (д, J = 5,5, 2H); 5,90 (т, J = 6,1, 1H, NH); 6,40 (дд, J = 8,3, J = 2,4, 1H); 6,46 (с, 1H, -OH); 6,58 (д, J = 8,3, 1H); 6,75 (дд, J = 8,8, J = 3,2, 1H); 6,83-6,93 (м, 3H); 10,12 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,39; 41,76; 55,25; 55,76; 72,40; 109,75; 110,35; 111,28; 111,32; 112,18; 114,54; 117,12; 128,84; 130,69; 130,89; 144,64; 150,95; 153,10; 176,27,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ (M+H) найдено: 354,1451; рассчитано: 354,1450,

ИК (ATR): 3271,16 (ш); 3035,89 (сл); 2999,25 (сл); 2956,82 (сл); 2924,52 (сл); 2851,24 (сл); 2833,88 (сл); 2256,31 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1711,51 (с, $\text{C}=\text{O}$); 1605,45 (ср) cm^{-1} .

[5-(2,3,4-Триметоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11j)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,067 г 2,3,4-триметоксибензальдегида было получено 0,100 г (76%) продукта **11j** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,5, 1H); 2,95 (д, J = 16,6, 1H); 3,75 (с, 6H); 3,82 (с, 3H); 4,13 (д, J = 5,8, 2H); 5,83 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,44 (дд, J = 8,3, J = 2,4, 1H); 6,47 (с, 1H, -OH); 6,59 (д, J = 8,2, 1H); 6,73 (д, J = 8,6, 1H); 6,86 (д, J = 2,3, 1H); 6,98 (д, J = 8,6, 1H); 10,13 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,41; 41,81; 55,81; 60,31; 60,81; 72,42; 107,60; 109,66; 110,33; 112,25; 117,15; 122,75; 125,21; 130,64; 130,81; 141,64; 144,69; 151,18; 152,37; 176,27,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ (M+H) найдено: 384,1559; рассчитано: 384,1555,

[5-(3,4,5-Триметоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (11k)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,067 г 3,4,5-триметоксибензальдегида было получено 0,084 г (64%) продукта **11k** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,86 (д, J = 16,6, 1H); 2,96 (д, J = 16,6, 1H); 3,62 (с, 3H); 3,74 (с, 6H); 4,14 (д, J = 5,9, 2H); 6,01 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,46-6,52 (м, 2H); 6,60 (д, J = 8,2, 1H); 6,70 (с, 2H); 6,88 (д, J = 2,3, 1H); 10,15 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,39; 47,74; 55,79; 59,95; 72,44; 104,56; 109,97; 110,34; 112,72; 117,18; 130,61; 131,05; 136,05; 136,09; 144,77; 152,82; 176,32,

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$: найдено: 384,1 [M+H] $^+$; 425,2 [M+MeCN+H] $^+$; 447,1 [M+MeCN+Na] $^+$; 767,3 [2M+H] $^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ (M+H) найдено: 384,1552; рассчитано: 384,1555,

ИК (ATR): 3412,90 (сл); 3202,70 (ш); 2994,43 (сл); 2967,43 (сл); 2939,95 (сл); 2879,68 (сл); 2836,29 (сл); 2254,38 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1713,44 (с, $\text{C}=\text{O}$); 1656,07 (ср); 1588,57 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-Гидрокси-3,5-диметоксибензил)амино-3-гидрокси-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил
(11)

Согласно **общей методике**, из соединения **10a** и 0,063 г 4-гидрокси-3,5-диметоксибензальдегида было получено 0,058 г (46%) продукта **11** в виде желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,85 (д, J = 16,7, 1H); 2,95 (д, J = 16,5, 1H); 3,72 (с, 6H); 4,09 (д, J = 5,3, 2H); 5,92 (т, J = 5,9, 1H, NH); 6,44-6,52 (м, 2H); 6,59 (д, J = 8,3, 1H); 6,64 (с, 2H); 6,88 (д, J = 2,4, 1H); 8,16 (с, 1H); 10,13 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 26,40; 47,72; 55,93; 71,69; 72,44; 104,94; 109,92; 110,31; 112,74; 117,19; 130,56; 130,93; 134,19; 144,87; 147,91; 176,32,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$ (M+H) найдено: 370,1397; рассчитано: 370,1399,

ИК (ATR): 3301,54 (ш); 3001,66 (сл); 2961,16 (сл); 2936,09 (ш); 2841,11 (сл); 2256,79 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1708,14 (с, $\text{C}=\text{O}$); 1607,38 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-Хлорбензил)амино-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (**12a**)

Согласно **общей методике**, из соединения **10b** и 0,048 г 4-хлорбензальдегида было получено 0,074 г (69%) продукта **12a** в виде коричневого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,95 (дд, J = 17,1, J = 5,7, 1H); 3,11 (дд, J = 5,1, J = 16,6, 1H); 3,67 (т, J = 6,1, 1H); 4,22 (д, J = 5,0, 2H); 6,07 (т, J = 6,2, 1H, NH); 6,35-6,43 (м, 1H); 6,58 (д, J = 8,2, 1H); 6,70-6,80 (м, 1H); 7,29-7,52 (м, 4H); 10,19 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 17,82; 41,60; 46,38; 109,85; 109,89; 111,51; 118,40; 128,12; 128,16; 129,06; 131,03; 132,58; 139,50; 144,09; 175,80,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{OCl}$ (M+H) найдено: 312,0902; рассчитано: 312,0899,

[5-(2-Метоксибензил)амино-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (**12b**)

Согласно **общей методике**, из соединения **10b** и 0,047 г 2-метоксибензальдегида было получено 0,075 г (71%) продукта **12b** в виде серо-коричневого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,95 (дд, J = 17,1, J = 6,3, 1H); 3,12 (дд, J = 17,0, J = 5,6, 1H); 3,67 (т, J = 6,0, 1H); 3,82 (с, 3H); 4,17 (д, J = 6,0, 2H); 5,77 (т, J = 6,1, 1H, NH); 6,37-6,43 (м, 1H); 6,59 (д, J = 8,2, 1H); 6,72-6,78 (м, 1H); 6,84-6,90 (м, 1H); 6,95-7,00 (м, 1H); 7,17-7,28 (м, 2H); 10,18 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 17,83; 41,65; 41,89; 55,27; 109,58; 109,93; 110,44; 111,35; 118,43; 120,09; 127,77; 127,87; 128,10; 131,46; 132,37; 144,55; 156,89; 175,83,

HPLC-MS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: найдено: 308,2 [M+H] $^+$; 349,2 [M+MeCN+H] $^+$.

HRMS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H) найдено: 308,1400; рассчитано: 308,1395,

ИК (ATR): 3356,01 (ш); 3250,91 (ш); 3068,67 (сл); 3033,00 (сл); 3006,96 (сл); 2953,93 (сл); 2932,23 (ш); 2836,29 (сл); 2250,52 (сл, $\text{C}\equiv\text{N}$); 1698,98 (с, $\text{C}=\text{O}$); 1600,63 (ср) cm^{-1} .

[5-(4-Гидроксибензил)амино-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (**12c**)

Согласно **общей методике**, из соединения **10b** и 0,042 г 4-гидроксibenзальдегида было получено 0,058 г (57%) продукта **12c** в виде светло-зеленого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,95 (дд, J = 16,9, J = 6,3, 1H); 3,10 (дд, J = 17,0, J = 5,7, 1H); 3,66 (т, J = 6,0, 1H); 4,06 (д, J = 5,7, 2H); 5,80 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,40-6,44 (м, 1H); 6,58 (д, J = 8,3, 1H); 6,67-6,71 (м, 2H); 6,74-6,76 (м, 1H); 7,12-7,17 (м, 2H); 9,22 (с, 1H); 10,16 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 17,86; 41,64; 46,84; 109,70; 109,84; 111,57; 114,97; 118,41; 128,00; 128,58; 130,21; 132,31; 144,55; 156,10; 175,81,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H) найдено: 294,1238; рассчитано: 294,1238,

[5-(4-Метоксибензил)амино-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (12d)

Согласно **общей методике**, из соединения **10b** и 0,047 г 4-метоксибензальдегида было получено 0,057 г (54%) продукта **12d** в виде серо-коричневого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,95 (дд, J = 17,0, J = 6,2, 1H); 3,10 (дд, J = 17,1, J = 5,7, 1H); 3,67 (т, J = 6,2, 1H); 3,71 (с, 3H); 4,13 (д, J = 5,7, 2H); 5,89 (т, J = 6,0, 1H, NH); 6,39-6,45 (м, 1H); 6,56-6,60 (м, 1H); 6,75-6,78 (м, 1H); 6,84-6,90 (м, 2H); 7,24-7,30 (м, 2H); 10,17 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 17,84; 41,63; 46,62; 55,01; 109,79; 109,85; 111,54; 113,65; 118,42; 128,03; 128,53; 132,08; 132,38; 144,44; 158,07; 175,82,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ (M+H) найдено: 308,1396; рассчитано: 308,1395,

[5-(2,5-Диметоксибензил)амино-2-оксиндол-3-ил]ацетонитрил (12e)

Согласно **общей методике**, из соединения **10b** и 0,057 г 2,5-диметоксибензальдегида было получено 0,056 г (48%) продукта **12e** в виде светло-серого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,95 (дд, J = 17,0, J = 6,2, 1H); 3,10 (дд, J = 17,0, J = 5,6, 1H); 3,63 (с, 3H); 3,67 (т, J = 6,2, 1H); 3,77 (с, 3H); 4,15 (д, J = 6,0, 2H); 5,79 (т, J = 6,1, 1H, NH); 6,37-6,41 (м, 1H); 6,59 (д, J = 8,3, 1H); 6,72-6,78 (м, 2H); 6,84-6,92 (м, 2H); 10,18 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 17,83; 41,65; 41,81; 55,23; 55,74; 109,63; 109,93; 111,29; 111,29; 112,31; 114,51; 117,08; 128,10; 128,88; 131,46; 144,43; 149,57; 153,09; 175,82,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ (M+H) найдено: 338,1502; рассчитано: 338,1500,

[5-(2-Метоксибензил)амино-2-оксиндол-3-ил]уксусная кислота (13a)

Согласно **общей методике**, из соединения **10c** и 0,047 г 2-метоксибензальдегида было получено 0,046 г (41%) продукта **13a** в виде темно-желтого порошка.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,37-2,57 (м, 2H); 3,42-3,52 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,15 (д, J = 6,0, 2H); 5,56-5,66 (м, 1H, NH); 6,23-6,29 (м, 1H); 6,51 (д, J = 8,5, 1H); 6,60 (с, 1H, -OH); 6,83-6,87 (м, 1H); 6,95 (д, J = 8,1, 1H); 7,16-7,25 (м, 2H); 9,50 (с, 1H, -NH).

HRMS (ESI) для $C_{18}H_{18}N_2O_4$ (M+H) найдено: 327,1344; рассчитано: 327,1341,

[5-(4-Хлорбензил)амино-2-оксиндол-3-ил]уксусная кислота (13b)

Согласно **общей методике**, из соединения **10c** и 0,048 г 4-хлорбензальдегида было получено 0,028 г (25%) продукта **13b** в виде желто-зеленого порошка.

ЯМР 1H (DMCO- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 2,45 (дд, J = 16,1, J = 6,6, 1H); 2,56 (дд, J = 16,1, J = 4,4, 1H); 3,53 (т, J = 5,5, 1H); 4,19 (д, J = 6,0, 2H); 5,93 (т, J = 6,2, 1H, NH); 6,31 (дд, J = 8,5, J = 2,5, 1H); 6,54 (д, J = 8,4, 1H); 6,56-6,62 (м, 1H); 7,32-7,40 (м, 4H); 9,56 (с, 1H, -NH).

ЯМР ^{13}C (DMCO- d_6 , δ , м.д.): 34,11; 43,70; 46,27; 110,91; 113,43; 115,64; 128,05; 128,21; 129,13; 131,04; 134,78; 139,69; 143,67; 168,61; 179,79,

HRMS (ESI) для $C_{17}H_{15}N_2O_3Cl$ (M+H) найдено: 331,0847; рассчитано: 331,0845,

4.6. Синтез 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов

Общая методика синтеза 5-хлорсульфонилизатинов [4]

В однокорную круглодонную колбу объемом 100 мл, снабженную магнитной мешалкой, внесли 9 мл (15,93 г, 0,137 моль) хлорсульфоновой кислоты, затем при перемешивании и охлаждении ледяной водой небольшими порциями добавили 2 г изатина (0,014 моль изатина **1h** или 0,011 моль 6-метоксиизатина **1q**). После добавления всего изатина реакционную смесь нагрели до 80°C и перемешивали 1 ч, охлаждали на воздухе до комнатной температуры и выливали при перемешивании в химический стакан, содержащий 200 мл воды и 100 г льда. Выпавший осадок коричнево-желтого (**14a,c**) [300] или ярко-желтого цвета (**14b,d**) отделили на воронке Шотта при пониженном давлении (20-30 мм.рт.ст), высушили и хранили в эксикаторе над P_2O_5 или в растворённом виде в EtOAc над осушителем (Na_2SO_4). Выход смеси **14a:14c** составил 2,7 г, а смеси **14b:14d** 2,5 г. Из-за высокой реакционной способности и неустойчивости на воздухе вещества использовались далее без дополнительного разделения и очистки.

Соотношение как продуктов **14a:14c**, так и **14b:14d** составило 1:5 по данным 1H ЯМР спектроскопии. Физико-химические характеристики полученных соединений совпали с описанными ранее.

Смесь продуктов 14a:14c

Изатин-5-сульфонилхлорид (14a)

ЯМР 1H (400,13 МГц, DMCO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,69 (уш. с, 1H, NH); 8,43 (д.д, 1H, J1 = 8,7, J2 = 2,5, C(6)H); 8,19 (д, 1H, J = 2,5, C(4)H); 7,09 (д, 1H, J = 8,7, C(7)H).

3,3-Дихлор-2-оксиндол-5-сульфонилхлорид (14c)

ЯМР 1H (400,13 МГц, DMCO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,11 (уш. с, 1H, NH); 8,46 (д, 1H, J = 2,3, C(4)H); 8,32 (д.д, 1H, J1 = 8,7, J2 = 2,3, C(6)H); 7,20 (д, 1H, J = 8,7, C(7)H).

Для дополнительной идентификации был осуществлен гидролиз небольших количеств смеси **14a,c** в водном ДМСО- d_6 , что привело к образованию вещества бежевого цвета, представляющей собой смесь изатин-5-сульфокислоты **14e** и 3,3-дихлор-2-оксоиндолин-5-сульфокислоты **14f** в соотношении 1:10 по данным ^1H ЯМР спектроскопии.

Изатин-5-сульфокислота (14e)

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,16 (уш. с, 1H, NH); 7,79 (д.д, 1H, J1 = 8,1, J2 = 1,8, C(6)H); 7,57 (д, 1H, J = 1,4, C(4)H); 6,87 (д, 1H, J = 8,1, C(7)H).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 112,06, 117,44, 121,74, 135,78, 143,07, 151,22, 160,05 (NHC=O), 184,57 (C=O).

3,3-Дихлор-2-оксоиндолин-5-сульфокислота (14f)

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,54 (уш. с, 1H, NH); 7,75 (д, 1H, J = 1,5, C(4)H); 7,65 (д.д, 1H, J1 = 8,1, J2 = 1,5, C(6)H); 6,95 (д, 1H, J = 8,1, C(7)H).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 75,30 (CCl₂), 111,11, 122,33, 128,49, 130,23, 139,85, 144,08, 169,57(NHC=O).

Смесь продуктов 14b:14d

6-Метоксиизатин-5-сульфонилхлорид (14b)

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц) 10,38 (с, 1H, NH); 7,93 (с, 1H, C(4)H); 6,42 (с, 1H, C(7)H); 3,91 (с, 3H, OCH₃).

6-Метокси-3,3-дихлор-2-оксиндол-5-сульфонилхлорид (14d)

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц) 10,87 (с, 1H, NH); 7,99 (с, 1H, C(4)H); 6,70 (с, 1H, C(7)H); 4,03 (с, 3H, OCH₃).

Общая методика синтеза 5-сульфонамидизатинов 15a-f [4]

В одnogорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, снабжённую магнитной мешалкой, внесли соответствующий амин в количестве 0,027 моль (для смеси **14a,c**) или 0,022 моль (в случае **14b,d**). Затем последовательно добавили 50 мл диоксана и 2 г смеси **14a,c** или **14b,d**. Реакционную смесь перемешивали 15 мин при комнатной температуре, упаривали досуха в вакууме роторного испарителя(10-20 мм.рт.ст.), добавляли 80 мл воды и 60 г карбоната калия и выдерживали при перемешивании около 14 ч. Далее к смеси при кипячении прикапывали HCl_{конц.} до pH=1, После охлаждения реакционной смеси раствор экстрагировали метиэтилкетонем (2x15 мл). Объединенную органическую фазу упаривали досуха в вакууме роторного испарителя (10-20 мм.рт.ст.). Полученное твердое вещество растворяли в EtOAc и очищали методом колоночной хроматографии. Физико-химические характеристики описанных веществ совпадают с описанными ранее.

Выходы указаны по трем стадиям, начиная от соответствующих изатинов.

5-(N,N-Диэтиламиносульфонил)изатин (15a)

Получен согласно **общей методике** из 2 г смеси веществ **14a,c** и 2,8 мл (1,988 г) диэтиламина. Получено вещество **15a** 2,2 г (36%) в виде остеклованной аморфной массы серо-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,45 (уш. с, 1H, NH); 7,98 (дд, 1H, J1 = 8,3, J2 = 1,9, C(6)H); 7,73 (д, 1H, J = 1,9, C(4)H); 7,08 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 3,16 (кв, 4H, J = 7,1, CH₂); 1,05 (т, 6H, J = 7,1, CH₃).

5-(Пиперидин-1-илсульфонил)изатин [304] (15b)

Получен согласно **общей методике** из 2 г смеси веществ **14a,c** и 2,7 мл пиперидина. Получено вещество **15b** 2,1 г (33%) в виде остеклованной аморфной массы серо-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,98 (уш. с, 1H, NH); 7,88 (д, 1H, J = 1,8, C(4)H); 7,79 (д.д, 1H, J1 = 8,3, J2 = 1,8, C(6)H); 7,22 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 2,75-3,02 (м, 4H, CH₂-N); 1,42-1,68 (м, 6H, N-CH₂-CH₂ и CH₂-CH₂).

5-(Морфолин-1-илсульфонил)изатин [304] (15c)

Получен согласно **общей методике** из смеси веществ **14a,c** и 2,4 мл морфолина. Получено вещество **15c** 2,1 г (32%) в виде остеклованной аморфной массы светло-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,20 (уш. с, 1H, NH); 7,81 (с, 1H, C(4)H); 7,69 (д, 1H, J = 8,2, C(6)H); 7,14 (д, J = 8,2, 1H, C(7)H); 3,55-3,69 (м, 4H, CH₂-O); 2,78-2,90 (м, 4H, N-CH₂).

6-Метокси-5-(N,N-диэтиламиносульфонил)изатин (15d)

Получен согласно **общей методике** из смеси веществ **14b,d** и 2,4 мл диэтиламина. Получено вещество **15d** 2,1 г (39%) в виде остеклованной аморфной массы темно-желтого цвета.

ЯМР ^1H (300,13 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц): 8,01 (с, 1H, C(4)H); 6,68 (с, 1H, C(7)H); 4,06 (с, 3H, OCH₃); 3,31 (кв, 4H, J = 7,3, CH₂-N, перекрывается с сигналом растворителя); 1,15 (т, 6H, J = 7,3, CH₃).

ЯМР ^{13}C (75,5 МГц, CD₃OD, δ , м.д.): 180,6, 165,3, 156,5, 139,0, 128,6, 120,9, 110,0, 96,3, 56,3, 42,0, 13,1,

6-Метокси-5-(пиперидин-1-илсульфонил)изатин (15e)

Получен согласно **общей методике** из смеси веществ **14b,d** и 2,2 мл пиперидина. Получено вещество **15e** 1,9 г (33%) в виде остеклованной аморфной массы желтого цвета.

ЯМР ^1H (300,13 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц) 7,99 (с, 1H, C(4)H); 6,70 (с, 1H, C(7)H); 4,06 (с, 3H, OCH₃); 3,04-3,23 (м, 4H, CH₂-N); 1,43-1,70 (м, 6H, N-CH₂-CH₂ и CH₂-CH₂-CH₂).

ЯМР ^{13}C (75,5 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 180,7, 165,7, 157,5, 138,0, 128,8, 122,0, 110,2, 96,6, 56,4, 46,6, 25,6, 23,4,

6-Метокси-5-(морфолин-1-илсульфонил)изатин (15f)

Получен согласно **общей методике** из смеси веществ **14b,d** и 2,0 мл морфолина. Получено вещество **15f** 2,0 г (33%) в виде остеклованной аморфной массы бледно-жёлтого цвета.

ЯМР ^1H (300,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 7,98 (с, 1H, C(4)H); 6,77 (с, 1H, C(7)H); 4,10 (с, 3H, OCH₃); 3,64-3,80 (м, 4H, CH₂-O); 3,06-3,27 (м, 4H, CH₂-N).

ЯМР ^{13}C (75,5 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 180,9, 165,6, 157,2, 137,8, 129,0, 120,9, 110,3, 96,8, 66,5, 56,6, 46,0

5-Аминосульфонизатин [306] (15g)

В одnogорлую круглодонную колбу объёмом 250 мл, снабжённую магнитной мешалкой, внесли 100 мл хлористого метилена и 2 г смеси (**14a:14c**), интенсивно перемешивали до полного растворения смеси (около 10 мин). После полного растворения вещества через раствор пропускали газообразный аммиак в течение 10 мин без перемешивания. Затем колбу закрывали и раствор перемешивали в течение еще 30 мин. Реакционную смесь высушили в вакууме (10-20 мм.рт.ст.) роторного испарителя, добавили 80 мл воды и 60 г карбоната калия. Полученный раствор выдерживали при перемешивании в течение около 14-16 ч, затем при кипячении приливали HCl (конц.) до pH 1, Смесь охлаждали и продукт экстрагировали метиэтилкетон (2x15 мл). Объединенную органическую фазу упаривали на роторном испарителе (10-20 мм.рт.ст.). Затем полученное твердое вещество растворяли в 20 мл EtOAc и очищали, пропуская через колонку-фильтр, наполненную силикагелем. Получено вещество **15g** 1,6 г (31%) в виде твердого вещества цвета охры.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, δ , м.д., J/Гц) 11,40 (уш. с, 1H, NH); 7,98 (дд, 1H, J₁ = 8,3, J₂ = 1,9, C(6)H); 7,85 (д, 1H, J = 1,9, C(4)H); 7,41 (уш. с, 2H, NH₂); 7,05 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H).

Общая методика синтеза 5-сульфонамид-замещенных 2-оксиндолов 16a-i:

В одnogорлую круглодонную колбу объёмом 100 мл снабженную обратным холодильником и магнитной мешалкой помещали 1 г (1 экв) 5-амидосульфонилизатина **15a-g**, 1,5 экв. циануксусной кислоты (в случае получения соединений **16a-g**) или 2,5 экв. малоновой кислоты (для соединений **16h,i**), 1,5 мл триэтиламина (в случае получения соединений **16a-g**) или диизопропилэтиламина (для соединений **16h,i**) и 30 мл диоксана. Смесь кипятили в течении 4 ч, затем выдерживали при перемешивании в течение 12-14 ч и упаривали в вакууме (10-20 мм.рт.ст.) роторного испарителя. Сухой остаток растворяли в смеси 35 мл

воды и 25 мл этилацетата, отделяли органическую фазу и упаривали досуха. Полученное твердое вещество растворяли в EtOAc и очищали методом колоночной хроматографии.

2-[3-Гидрокси-5-(N,N-диэтиламиносульфонил)-2-оксоиндолин-3-ил]ацетонитрил (16a)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0035 моль) соединения **15a** и 0,45 г (0,0053 моль) циануксусной кислоты. Выход 0,85 г (74%) в виде мелкодисперсного порошка бледно-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц) 11,02 (уш. с, 1H, NH); 7,87 (д, 1H, J = 1,5, C(4)H); 7,75 (д,д, 1H, J1 = 8,2, J2 = 1,5, C(6)H); 7,05 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 2,92-3,27 (м, 6H, H_A и H_B в CH₂-CN, перекрываются с -CH₂ в CH₂-CH₃); 1,05 (т, 6H, J = 7,1, CH₂-CH₃).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.) 176,8, 145,5, 133,1, 130,6, 129,8, 122,9, 116,9, 110,5, 71,8, 41,8, 25,7, 14,0,

HRMS (ESI) для C₁₄H₁₇N₃O₄S (M-H) найдено: 322,0855; рассчитано: 322,0867,

2-[3-Гидрокси-2-оксо-5-(пиперидин-1-илсульфонил)индолин-3-ил]ацетонитрил (16b)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0034 моль) вещества **15b** и 0,43 г (0,0051 моль) циануксусной кислоты. Выход 0,87 г (76%) в виде мелкодисперсного порошка желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц) 7,92 (д, 1H, J = 1,9, C(4)H); 7,77 (д,д, 1H, J1 = 8,3, J2 = 1,9, C(6)H); 7,12 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 3,16 (д, 1H, J = 16,7, H_A в CH₂-CN); 2,90-3,02 (м, 5H, N-CH₂ и H_B в CH₂-CN); 1,57-1,68 (м, 4H, N-CH₂-CH₂); 1,41-1,49 (м, 2H, CH₂-CH₂).

ЯМР ^{13}C (75,5 МГц, CD₃OD, δ , м.д.) 179,0, 162,8, 152,8, 132,1, 131,5, 125,0, 123,6, 111,8, 72,0, 48,2, 25,3, 24,6, 24,5,

HRMS (ESI) для C₁₅H₁₇N₃O₄S (M-H) найдено: 334,0855; рассчитано: 334,0867,

2-[3-Гидрокси-5-(морфолин-1-илсульфонил)-2-оксииндолин-3-ил]ацетонитрил (16c)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0034 моль) вещества **15c** и 0,43 г (0,0051 моль) циануксусной кислоты. Выход 0,88 г (77%) в виде мелкодисперсного порошка желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц) 11,10 (уш. с, 1H, NH); 7,80 (с, 1H, C(4)H); 7,70 (д, 1H, J = 8,2, C(6)H); 7,11 (д, 1H, J = 8,2, C(7)H); 6,86 (с, 1H, OH); 3,55-3,71 (м, 4H, CH₂-O); 3,19 (д, 1H, J = 16,7, H_A в CH₂-CN); 3,11 (д, 1H, J = 16,7, H_B в CH₂-CN); 2,77-2,91 (м, 4H, N-CH₂).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.) 176,9, 146,3, 130,9, 130,6, 127,4, 123,7, 117,0, 110,5, 71,7, 65,4, 45,9, 25,8,

HRMS (ESI) для C₁₄H₁₅N₃O₅S (M-H) найдено: 336,0648; рассчитано: 336,0659,

2-[3-Гидрокси-5-(N,N-диэтиламиносульфонил)-6-метокси-2-оксоиндолин-3-ил]ацетонитрил (16d)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0032 моль) вещества **15d** и 0,41 г (0,0048 моль) циануксусной кислоты. Выход 0,79 г (70%) в виде мелкодисперсного порошка серо-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 8,01 (с, 1H, C(4)H); 6,74 (с, 1H, C(7)H); 3,98 (с, 3H, OCH₃); 3,32 (кв, 4H, J = 7,3, CH₂-N, перекрывается с сигналом растворителя); 3,11 (д, 1H, J = 16,5, H_A в CH₂-CN); 2,93 (д, 1H, J = 16,5, H_B в CH₂-CN); 1,15 (т, 6H, J = 7,0, CH₃).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 177,9, 159,5, 145,0, 126,7, 121,8, 119,6, 115,3, 94,4, 71,6, 55,3, 41,4, 25,3, 13,0,

2-[3-Гидрокси-6-метокси-2-оксо-5-(пиперидин-1-илсульфонил)индолин-3-ил]ацетонитрил (16e)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0031 моль) вещества **15e** и 0,39 г (0,0046 моль) циануксусной кислоты. Выход 0,74 г (66%) в виде мелкодисперсного порошка ярко-желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 7,98 (с, 1H, C(4)H), 6,76 (с, 1H, C(7)H), 3,94 (с, 3H, OCH₃), 3,03-3,25 (м, 5H, H_A в CH₂-CN и CH₂-N), 2,92 (д, 1H, J = 17,1, H_B в CH₂-CN), 1,46-1,68 (м, 6H, N-CH₂-CH₂ и CH₂-CH₂-CH₂).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 177,6, 159,3, 147,2, 126,8, 119,9, 119,4, 115,4, 94,9, 71,6, 55,1, 25,3, 25,1, 23,0,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ (М-Н) найдено: 364,0959; рассчитано: 364,0972,

2-[3-Гидрокси-6-метокси-5-(морфолин-1-илсульфонил)-2-оксоиндолин-3-ил]ацетонитрил (16f)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0031 моль) вещества **15f** и 0,39 г (0,0046 моль) циануксусной кислоты. Продукт представляет собой мелкодисперсный порошок ярко-жёлтого цвета. Выход составил 0,78 г (69%).

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 7,99 (с, 1H, C(4)H), 6,78 (с, 1H, C(7)H), 3,97 (с, 3H, OCH₃), 3,64-3,80 (м, 4H, CH₂-O), 3,07-3,23 (м, 5H, H_A в CH₂-CN и CH₂-N), 2,93 (д, 1H, J = 16,7, H_B в CH₂-CN).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 177,7, 159,7, 147,8, 127,1, 119,8, 118,6, 115,4, 94,8, 71,3, 66,0, 55,2, 45,7, 25,1,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ (М-Н) найдено: 366,0751; рассчитано: 366,0765,

2-(5-Аминосульфонил-3-гидрокси-2-оксоиндолин-3-ил)ацетонитрил (16g)

Получен согласно **общей методике** из 1 г (0,0044 моль) вещества **15g** и 0,56 г (0,0066 моль) циануксусной кислоты с использованием триэтиламина. Продукт представляет собой мелкодисперсный порошок ярко-жёлтого цвета. Выход составил 0,65 г (55%).

ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц) 10,96 (уш. с, 1H, NH); 7,91 (д, 1H, J = 1,9, C(4)H); 7,79 (д,д, 1H, J1 = 8,2, J2 = 1,9, C(6)H); 7,33 (уш. с, 2H, NH₂); 7,03 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 6,87 (с, 1H, OH); 3,13 (д, 1H, J = 16,7, H_A в CH₂-CN); 3,04 (д, 1H, J = 16,7, H_B в CH₂-CN).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.) 177,0, 144,8, 138,0, 130,2, 128,6, 122,0, 116,9, 110,1, 72,0, 25,8,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (М-Н) найдено: 266,0233; рассчитано: 266,0241,

2-[3-Гидрокси-5-(N,N-диэтиламиносульфонил)-2-оксо-индолин-3-ил]уксусная кислота (16h)

Получена согласно **общей методике** из 1 г (0,0035 моль) вещества **15a** и 0,92 г (0,0089 моль) малоновой кислоты. Выход 0,74г (61%) в виде мелкодисперсного порошка желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 7,82 (д, 1H, J = 1,7, C(4)H); 7,75 (д,д, 1H, J1 = 8,2, J2 = 1,7, C(6)H); 7,05 (д, 1H, J = 8,3, C(7)H); 2,92-3,27 (м, 6H, H_A и H_B в CH₂-COOH, перекрываются с -CH₂ в CH₂-CH₃); 1,10 (т, 6H, J = 7,1, CH₂-CH₃).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 180,7, 172,2, 147,7, 135,0, 132,8, 130,7, 124,2, 111,3, 74,2, 43,3, 42,4, 14,5,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (М-Н) найдено: 341,0800; рассчитано: 341,0812,

[3-Гидрокси-2-оксо-5-(пиперидин-1-илсульфонил)индолин-3-ил]уксусная кислота (16i)

Получена согласно **общей методике** из 1 г (0,0034 моль) вещества **15b** и 0,88 г (0,0089 моль) малоновой кислоты. Выход 0,77 г (64%) в виде мелкодисперсного порошка желтого цвета.

ЯМР ^1H (400,13 МГц, CD_3OD , δ , м.д., J/Гц) 7,75 (д, 1H, J = 1,4, C(4)H); 7,69 (д,д, 1H, J = 8,2, J = 1,4, C(6)H); 7,06 (д, 1H, J = 8,2, C(7)H); 3,08 (д, 1H, J = 16,7, H_A в CH₂-COOH); 2,89-3,00 (м, 4H, N-CH₂); 2,85 (д, 1H, J = 16,7, H_B в CH₂-COOH); 1,55-1,70 (м, 4H, N-CH₂-CH₂); 1,37-1,49 (м, 2H, CH₂-CH₂).

ЯМР ^{13}C (100,6 МГц, CD_3OD , δ , м.д.) 177,0, 172,3, 133,0, 131,5, 130,8, 129,4, 124,8, 111,2, 74,3, 42,5, 26,3, 24,5,

HRMS (ESI) для $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (М-Н) найдено: 353,0799; рассчитано: 353,0812,

4.7. Методы тестирования биологической активности¹⁰

Исследование влияния соединений на ВГД in vivo на кроликах

Способность оксиндолов снижать ВГД оценивалась на нормотензивных кроликах-самцах породы шиншилла массой около 2 кг. Все исследуемые вещества применяли местно в виде инстилляций 0,1% растворов (w/v). Первоначально вещества растворяли в ДМСО и разбавляли 0,05М фосфатном буферном растворе (рН 7,4) так, чтобы содержание ДМСО не превышало 5%. Измерение ВГД проводили перед закапыванием растворов в оба глаза в фиксированном объеме 50 мкл и далее в течение 6 ч с интервалом в 1 ч с помощью автоматического тонометра для ветеринарии Tonovet (Icare, Финляндия). Оценку гипотензивного эффекта каждого соединения проводили в группе из 5 особей (10 глаз). Результаты корректировали с учетом нормальных суточных колебаний ВГД путем одновременного измерения ВГД у трех особей интактных животных (6 глаз) с закапыванием фосфатного буферного раствора, содержащего 5% ДМСО, без тестируемых соединений. Животных использовали в следующих экспериментах не ранее, чем через 7 суток. Поскольку скорость снижения ВГД у разных животных в ходе исследования различалась, учитывали не только среднее снижение в группе в определенную временную точку, но и максимальное снижение ВГД в каждом глазу.

Исследование влияния соединений на ВГД in vivo на крысах

Способность оксиндолов снижать ВГД оценивалась на взрослых беспородных интактных крысах обоего пола. Для исключения влияния суточных колебаний ВГД инстилляцию тестируемых соединений в концентрации 0,4% (по массе) в объеме 30 мкл проводили однократно (в 9:00) и измеряли ВГД с помощью офтальмологического ветеринарного тонометра Tonovet (Финляндия), не требующего предварительной анестезии роговицы [312]. Гипотензивную активность соединений оценивали по максимальному снижению ВГД от исходного значения (0 ч). В начале эксперимента регистрировали исходный уровень офтальмотонуса, затем в опытный (правый) глаз животных закапывали по 30 мкл 0,4% раствора исследуемых веществ и препаратов сравнения, левый глаз каждого животного служил контролем, в него закапывали 30 мкл деионизированной воды. После инстилляций исследуемых веществ, препаратов сравнения и воды регистрировали уровень ВГД в трех

¹⁰ Изучение гипотензивного эффекта соединений на крысах, а также изучение ингибирующей активности по отношению к NQO2 проводились совместно с группой академика А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград), изучение гипотензивного эффекта соединений на кроликах проводилось совместно с лабораторией д.б.н. Чесноковой Н.Б. (НИИ Глазных Болезней им. Гельмгольца, Москва), изучение влияния полученных соединений на Fe²⁺-индуцированное перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс, влияния соединений на митохондриальный потенциал в изолированных митохондриях печени крыс, изучение способности соединений к связыванию DPPH-радикалов, цитотоксические эффекты на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y, а также оценка способности соединений ингибировать карбоангидразу II человека проводились совместно с группой д.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка).

временных точках – 60, 120 и 180 мин. Животных использовали в следующих экспериментах не ранее, чем через 7 суток.

Изучение ингибирования NQO2 in vitro

Активность рекомбинантной человеческой NQO2 (Sigma #Q0380, Сент-Луис, США) оценивали кинетически с использованием менадиона и N-бензил-дигидроникотинамида (BNAH) в качестве субстрата и ко-субстрата соответственно. Все реагенты и тестируемые соединения растворяли в 50 мМ HEPES-КОН (pH 7,4), содержащем 1 мМ β-октил-D-глюкопиранозида, 0,1 мг/мл БСА и 1 мкМ ФАД. В черный 96-луночный планшет с плоским дном вносили 50 мкл тестируемых соединений в конечной концентрации 10 мкМ для первичного скрининга, а для определения значений IC₅₀ использовали диапазон конечных концентраций от 10 нМ до 100 мкМ. В качестве положительного контроля применяли кверцетин. Растворы тестируемых соединений преинкубировали в течение 5 минут с 50 мкл рекомбинантной NQO2 человека (конечная концентрация 42 нг/мл). Затем добавляли 25 мкл менадиона до конечной концентрации 100 мкМ. Реакцию инициировали внесением 25 мкл 100 мкМ BNAH. Флуоресценцию ко-субстрата BNAH регистрировали при длинах волн 370/440 нм при 37 °С с использованием микропланшетного ридера Infinite M200 Pro (Tecan, Грэдиг, Австрия). Данные флуоресценции аппроксимировали с помощью нелинейной регрессии по однофазному затуханию для определения значений наклона с использованием программы Prism 8.0 (GraphPad Inc., Калифорния, США). Активность в опытных лунках нормировали по отрицательному контролю и образцам без фермента.

Изучение ингибирования hCA II in vitro

Влияние соединений на эстеразную активность рекомбинантной человеческой карбоангидразы II (hCA II) оценивали спектрофотометрически на многофункциональном планшетном ридере EnVision Multilabel (Perkin Elmer, США). В качестве субстрата использовали пара-нитрофенилацетат (p-NPA), который образует 4-нитрофенол и CO₂ в результате гидролиза.

Эксперименты проводили в 50 мМ Трис (pH 7,4) при 25°C. Фермент hCA II в конечной концентрации 160 нМ смешивали с соответствующим количеством (10 μМ) тестируемого соединения и оставляли в темноте на 10 мин для образования комплекса фермент-ингибитор, затем добавляли p-NPA (конечная концентрация 1 мМ), запуская реакцию образования 4-нитрофенола. Спектрофотометрически измеряли поглощение при 405 нм в течение 30 мин. Начальную скорость реакции рассчитывали в GraphPadPrism v. 6.05 для Windows (“GraphPadSoftware”, США) [313]. Полученные данные были нормированы на скорость неферментативного гидролиза p-NPA. Процент ингибирования рассчитывали по формуле: $(1 - v_1/v_2) * 100$, где v_1 - нормированная начальная скорость реакции в присутствии соединения, v_2

- нормированная начальная скорость реакции в контрольной пробе. Статистический анализ достоверности различий проб с новыми соединениями и контрольных проб проводили с использованием непараметрического теста Манна-Уитни с помощью программы GraphPad Prism v. 6.05 для Windows (“GraphPad Software”, США).

Исследование влияния соединений на митохондриальный потенциал

Эксперименты проводились на беспородных крысах-самцах массой 200–220 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария с нормальным циклом день/ночь и имели свободный доступ к воде и пище. Митохондрии печени крыс выделяли методом традиционного дифференциального центрифугирования [314]. Мембранный потенциал митохондрий, энергизированных добавлением субстратов комплексов 1 и 2 дыхательной цепи митохондрий (калиевых солей сукцината, глутамата и малата (10/5/2 мМ)), измеряли с помощью потенциалочувствительного флуоресцентного зонда Сафранин О на планшетном ридере EnVision Multilabel (Perkin Elmer, США). Флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{ex} = 485$ нм и $\lambda_{em} = 590$ нм [315].

Перекисное окисление липидов

Влияние соединений на перекисное окисление липидов (ПОЛ) определяли с использованием мембранной фракции гомогената головного мозга крысы, полученной стандартными методами в буфере (0,12 М раствор HEPES, 0,1 М раствор KCl) (pH 7,5). Степень ПОЛ измеряли с помощью тиобарбитурового реагента и оценивали по уровню накопления веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARs). Инкубационная среда для определения ПОЛ содержала суспензию мембран в буфере с конечной концентрацией 1–2 мг белка на мл и различные концентрации тестируемых соединений или растворителя (ДМСО) в контрольных образцах. Концентрацию белка в мембранной суспензии определяли биуретовым методом, используя в качестве стандарта БСА. Реакцию ПОЛ инициировали ионами Fe^{2+} ($Fe_2SO_4 \times 7H_2O$ с конечной концентрацией 0,5 мМ) с последующей инкубацией при 37°C в течение 30 мин. Для оценки спонтанного ПОЛ гомогенат инкубировали в течение 1 ч при 37°C в присутствии соединений или равного объема растворителя. Реакцию ПОЛ останавливали внесением в инкубационную среду реагента, содержащего 250 мМ HCl, 15% (w/v) трихлоруксусной кислоты и 3 мМ тиобарбитуровой кислоты. Образцы инкубировали при 90°C в течение 60 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g. Супернатанты переносили в 96-луночный планшет и определяли разницу в оптическом поглощении, измеренном при длинах волн 530 нм и 620 нм, на планшетном спектрофотометре Wallac Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, США). Результаты выражали в процентах оптического поглощения образцов в присутствии тестируемых соединений к оптическому поглощению контрольных образцов. Статистический

анализ достоверности различий проб с новыми соединениями и контрольных проб проводили с использованием непараметрического теста Манна-Уитни с помощью программы GraphPad Prism v. 6.05 для Windows (“GraphPad Software”, США).

Оценка цитотоксичности на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y

Исследования цитотоксичности проведены на клетках линии нейробластомы человека SH-SY5Y культивируемых в стандартных условиях в инкубаторе Binder CB-53 (Binder, Германия) при температуре 37°C, с содержанием 5% CO₂. Для проведения эксперимента клетки высевались на 96 луночные планшеты в количестве 10⁴ на 1 лунку. Вещества добавляли в клеточную среду в концентрации от 0,1 мМ. Время инкубации с веществом составляло 24 часа. Каждая концентрация раскапывалась в восьми повторах на одном планшете. Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

Для определения цитотоксичности использовали стандартный МТТ-тест. В основе метода МТТ лежит способность дегидрогеназ живых метаболически активных клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в ДМСО. Уменьшение оптической плотности при 570 нм опытных проб по сравнению с контрольными, регистрируемое на планшетном ридере Victor (Perkin Elmer, США), должно быть статистически значимым для заключения о цитотоксическом действии вещества на клетки. Статистический анализ достоверности различий проб с новыми соединениями и контрольных проб проводили с использованием непараметрического теста Манна-Уитни с помощью программы GraphPad Prism v. 6.05 для Windows (“GraphPad Software”, США).

В биологических исследованиях *in vitro* использовано оборудование и животные «Центра коллективного пользования ИФАВ РАН».

Соблюдение этических норм

Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН) имеет виварий со всем необходимым для работы и содержания животных, квалифицированный персонал и Центр Доклинических испытаний, имеющий свидетельство Росаккредитации №10 о соответствии принципам надлежащей лабораторной практики.

Для оценки антиоксидантных свойств соединений, их влияния на митохондриальные характеристики выделены митохондрии печени и гомогенат мозга нелинейных лабораторных крыс, для чего использован стандартный метод эвтаназии животных двуокисью углерода. Используемые в данном исследовании стандартные манипуляции для эвтаназии животных (мыши, крысы) одобрены Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН (протокол № 72 от 24.04.2023).

Все эксперименты с животными по изучению глазных патологий проведены в соответствии с рекомендациями “Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research” of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (“ARVO”). Для оценки гипотензивных свойств соединений *in vivo* в работе использованы кролики породы Шиншилла, для содержания животных в "НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца" имеется виварий, оснащенный всем необходимым для работы с животными. Протокол стандартного исследования влияния соединений на ВГД кроликов утвержден Этическим комитетом "НМИЦ глазных болезней имени Гельмгольца" Минздрава России (выписка 54/7 из протокола заседания Этического комитета ФГБУ "НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца" Минздрава России №54 от 13.05.2021, Протокол стандартного исследования влияния соединений на внутриглазное давление у крыс одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (выписка из заседания Локального этического комитета ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России № 43 от 02.12.2022).

4.8. Методы изучения соединений *in silico*¹¹

Молекулярное моделирование

Подготовка лигандов

Лиганды были подготовлены с использованием модуля LigPrep пакета Schrödinger. Трехмерные структуры вновь синтезированных соединений были оптимизированы для вычислительного анализа в условиях pH $7,0 \pm 2,0$, для минимизации геометрии лигандов применялся алгоритм силового поля OPLS4,

Подготовка белка и индуцированное соответствие при докинге (IFD)

Трехмерная структура хиноноксидоредуктазы 2 (PDB ID: 4GR9) с разрешением 2,29 Å была получена из базы данных RCSB Protein Data Bank. Белок был подготовлен с использованием мастера подготовки белка в пакете Schrödinger с применением силового поля OPLS4, Подготовленный белок использовался для генерации рецепторных сеток в процессе докинга. Модуль Induced Fit Docking в Schrödinger применялся для выполнения IFD. Рецепторная сетка была сгенерирована с использованием кокристаллизованного соединения Q27453589 в качестве центра сетки в активном сайте белка 4GR9, в качестве опции конформационного отбора был выбран отбор конформаций колец с энергетическим окном 2,5 ккал/моль. Масштабирование ван-дер-ваальсовых радиусов для рецептора и лиганда было установлено на 0,7 и 0,5 соответственно. Остатки в пределах 5 Å от поз лиганда были уточнены, а повторный докинг с помощью Glide был выполнен для структур в пределах 30 ккал/моль от наилучшей структуры.

¹¹ Молекулярное моделирование и молекулярная динамика осуществлены совместно с группой А.А. Спасова (ВолгГМУ, Волгоград).

Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое (MD) моделирование проводилось с использованием модуля Desmond пакета Schrödinger. Была построена орторомбическая ячейка моделирования с размерами $5,9 \times 5,4 \times 7,1$ нм. Система была параметризована с использованием силового поля OPLS-2005, а для сольватации системы применялась модель воды TIP3P. Для имитации физиологических условий было добавлено 0,15 М NaCl, а также 5 дополнительных ионов Na⁺ для нейтрализации системы. Модель была релаксирована перед моделированием, и траектории сохранялись каждые 100 пс. Молекулярно-динамическое моделирование проводилось в течение 100 нс с использованием ансамбля NpT и схемы перемасштабирования скоростей для имитации системы человеческого организма при 310 К и атмосферном давлении 1,013 бар. После моделирования был проведен анализ траекторий для определения среднеквадратичного флуктуационного отклонения (RMSF), среднеквадратичного отклонения (RMSD) и профиля взаимодействия белок-лиганд.

5. Заключение

Обобщая всё вышесказанное, в данной научно-квалификационной работе были разработаны и оптимизированы методы получения новых 2-оксиндолов с разнообразными заместителями и проведены биологические исследования синтезированных соединений. Исследованы биологические свойства двух серий 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов: с гидроксигруппой в 3 положении оксиндольного цикла и без неё. Было показано, что 3-гидрокси-2-оксиндолы, в среднем, проявляют более выраженные антиглаукомные свойства и снижают внутриглазное давление лучше, чем их аналоги без гидроксигруппы. Аналогично, 3-цианометил-2-оксиндолы более активны, чем 3-карбоксиметил-2-оксиндолы. Исключением из данной статистики является 3-карбоксиметил-2-оксиндол **7a**, ставший одним из трех наиболее активных 2-оксиндолов из серии и показавший большую эффективность, чем его аналоги с 3-гидрокси или 3-цианометилгруппой. В то же время корреляции между способностью соединения ингибировать активность хинон оксидоредуктазы 2 (NQO2) *in vitro* и проявляемым гипотензивным эффектом *in vivo* не выявлено.

Все поставленные задачи были выполнены в полном объеме. Из результатов исследования можно сделать следующие выводы:

1. Разработан экспресс-метод синтеза 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов, заключающийся в конденсации замещенных изатинов с циануксусной и малоновой кислотами под действием микроволнового облучения и позволяющий сократить время реакции с 3 ч до нескольких минут с сохранением высоких выходов продуктов реакции.
2. С помощью разработанного экспресс-метода получена серия новых 5-арил-3-гидрокси-2-оксиндолов с высокими выходами. Изучена их способность ингибировать фермент хинон оксидоредуктазу II и влиять на внутриглазное давление (ВГД). Показано, что данные соединения не проявляют выраженного биологического эффекта, вероятно, ввиду низкой растворимости.
3. Оптимизирована методика получения 3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов, не содержащих гидроксигруппу в положении 3 оксиндольного цикла, что позволило с высоким выходом получить серию производных для дальнейшего биотестирования и SAR анализа.
4. Показано, что 3-гидрокси-3-циано/карбоксиметил-2-оксиндолы статистически достоверно обладают более выраженной способностью снижать внутриглазное

- давление, чем их аналоги без гидроксигруппы. Аналогично, 3-цианометил-2-оксиндолы в основном более активны, чем 3-карбоксиметил-2-оксиндолы.
5. Разработана методика восстановительного аминирования 5-амино-оксиндолов и получена серия новых 5-арилметиламино-2-оксиндолов с высокими выходами.
 6. Впервые показано, что 5-арилметиламино-3-гидрокси-3-циано/карбоксиметил-2-оксиндолы обладают выраженной способностью снижать ВГД на 15–27% (12 и 18% снижения для препаратов сравнения мелатонина и тимолола соответственно) и проявляют нейропротекторные свойства, подавляя перекисное окисление липидов, не проявляя при этом митохондриальной токсичности и не влияя на полимеризацию тубулина.
 7. Получена серия новых 5-сульфонамид-замещенных 3-гидрокси-3-циано/карбоксиметил-2-оксиндолов и изучена их способность снижать ВГД на двух животных моделях. Найдено соединение **16f**, способные снижать ВГД вплоть до 3,7 мм.рт.ст. через 5 ч после инстилляций (для тимолола и дорзоламида через 3 ч 2.63 и 2.25 мм.рт.ст. соответственно).
 8. Изучено влияние 5-сульфонамид-замещенных 3-гидрокси-3-циано/карбоксиметил-2-оксиндолов на активность карбоангидразы II и их нейропротекторный потенциал. Найдено соединение **16e**, способное на 99% ингибировать активность карбоангидразы 2 в концентрации 10 мкМ. Все синтезированные соединения обладают низкой цитотоксичностью по отношению к клеткам нейробластомы человека SH-SY5Y, слабовыраженной способностью ингибировать перекисное окисление липидов и не влияют на митохондриальный потенциал.

Перспективы развития темы включают: определение мишени, благодаря которой полученные 2-оксиндолы проявляют гипотензивный эффект; дальнейшая модификация синтезированных 2-оксиндолов с целью увеличения их биодоступности; разработка методов стереоселективного синтеза 3-гидрокси-3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов; введение новых фармакофорных групп в 2-оксиндольный скаффолд для получения соединений мультитаргетного действия.

6. Список литературы

1. Efremov A.M., Beznos O. V., Ereemeev R.O., Chesnokova N.B., Milaeva E.R., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Microwave-Assisted Synthesis of 3-Hydroxy-2-oxindoles and Pilot Evaluation of Their Antiglaucomic Activity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 6– P. 5101.
2. Efremov A.M., Babkov D.A., Beznos O. V., Sokolova E. V., Spasov A.A., Ivanov V.N., Kurkin A. V., Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. Microwave-assisted synthesis of 5-aryl-3-hydroxy-2-oxindole derivatives and evaluation of their antiglaucomic activity // *Mendeleev Communications*. – 2023. – Vol. 33, № 4. – P. 550–552.
3. Ereemeev R.O., Beznos O. V., Efremov A.M., Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. The rational design of novel 5-amino-2-oxindole derivatives with antiglaucomic activity // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2023. – Vol. 90. – P. 129334.
4. Lozinskaya N.A., Bukhalovsky F.G., Vinogradova D. V., Efremov A.M., Beznos O. V., Pavlenko T.A., Naumenko L. V., Taran A.S., Tchegan'ko A.M., Veselov I.M., Spasov A.A., Shevtsova E.F. Synthesis and biological activity of 5-sulfonamide-substituted 3-hydroxyoxindoles with 3-cyanomethyl and 3-carboxymethyl groups // *Russian Chemical Bulletin*. – 2025. – Vol. 74, № 8. – P. 2413–2426.
5. Ereemeev R.O., Efremov A.M., Zakharova D. V., Beznos O. V., Sokolova E. V., Kalitin K.Y., Mukha O.Y., Vinogradova D. V., Veselov I.M., Shevtsov P.N., Dubova L.G., Babkov D.A., Spasov A.A., Shevtsova E.F., Lozinskaya N.A. Discovery of Novel 2-Oxindoles as Compounds with Antiglaucoma Activity // *ChemMedChem*. – 2025. – Vol. 20, № 10. – P. e202400977.
6. Jayaram H., Kolko M., Friedman D.S., Gazzard G. Glaucoma: now and beyond // *The Lancet*. – 2023. – Vol. 402, № 10414. – P. 1788–1801.
7. Storgaard L., Tran T.L., Freiberg J.C., Hauser A.S., Kolko M. Glaucoma Clinical Research: Trends in Treatment Strategies and Drug Development // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – Vol. 8. – P. 733080.
8. Michael V. Boland, Ann-Margret Ervin, David S. Friedman, Henry D. Jampel, Barbara S. Hawkins, Daniela Vollenweider, Yohalakshmi Chelladurai, Darcy Ward, Catalina Suarez-Cuervo, Karen A. Robinson. Comparative Effectiveness of Treatments for Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force // *Annals of Internal Medicine*. – 2013. – Vol. 158. – P. 271-279.
9. Vijaya L., George R., Baskaran M., Arvind H., Raju P., Ramesh S.V., Kumaramanickavel G., McCarty C. Prevalence of Primary Open-angle Glaucoma in an Urban South Indian Population

- and Comparison with a Rural Population // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 115, № 4. – P. 648-654.e1.
10. Khatib T.Z., Martin K.R. Neuroprotection in Glaucoma: Towards Clinical Trials and Precision Medicine // *Current Eye Research*. – 2020. – Vol. 45, № 3. – P. 327–338.
 11. Komáromy A.M., Koehl K.L., Park S.A. Looking into the future: Gene and cell therapies for glaucoma // *Veterinary Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 24, № S1. – P. 16–33.
 12. Anton N., Geamănu A., Iancu R., Pîrvulescu R.A., Popa-Cherecheanu A., Barac R.I., Bandol G., Bogdănici C.M. A Mini-Review on Gene Therapy in Glaucoma and Future Directions // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 20. – P. 11019.
 13. Tham Y.-C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.-Y. Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040 // *Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 121, № 11. – P. 2081–2090.
 14. Kolko M., Horwitz A., Thygesen J., Jeppesen J., Torp-Pedersen C. The Prevalence and Incidence of Glaucoma in Denmark in a Fifteen Year Period: A Nationwide Study // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 7. – P. e0132048.
 15. Amerasinghe N., Zhang J., Thalamuthu A., He M., Vithana E.N., Viswanathan A., Wong T.Y., Foster P.J., Aung T. The Heritability and Sibling Risk of Angle Closure in Asians // *Ophthalmology*. – 2011. – Vol. 118, № 3. – P. 480–485.
 16. Ko F., Papadopoulos M., Khaw P.T. Primary congenital glaucoma // *Progress in Brain Research*. – 2015. – Vol. 118. – P. 177–189.
 17. Bai H.-Q., Yao L., Wang D.-B., Jin R., Wang Y.-X. Causes and Treatments of Traumatic Secondary Glaucoma // *European Journal of Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 201–206.
 18. Fraunfelder F.W., Fraunfelder F.T., Keates E.U. Topiramate-associated acute, bilateral, secondary angle-closure glaucoma // *Ophthalmology*. – 2004. – Vol. 111, № 1. – P. 109–111.
 19. Merayo-Llodes J., Power W.J., Rodriguez A., Pedroza-Seres M., Foster C.S. Secondary Glaucoma in Patients with Uveitis // *Ophthalmologica*. – 1999. – Vol. 213, № 5. – P. 300–304.
 20. Ha A., Kim C.Y., Shim S.R., Chang I.B., Kim Y.K. Degree of Myopia and Glaucoma Risk: A Dose-Response Meta-analysis // *American Journal of Ophthalmology*. – 2022. – Vol. 236. – P. 107–119.
 21. Garudadri C., Senthil S., Khanna R.C., Sannapaneni K., Rao H.B.L. Prevalence and Risk Factors for Primary Glaucomas in Adult Urban and Rural Populations in the Andhra Pradesh Eye Disease Study // *Ophthalmology*. – 2010. – Vol. 117, № 7. – P. 1352–1359.
 22. Stamer W.D., Clark A.F. The many faces of the trabecular meshwork cell // *Experimental Eye Research*. – 2017. – Vol. 158. – P. 112–123.

23. Johnson M., McLaren J.W., Overby D.R. Unconventional aqueous humor outflow: A review // *Experimental Eye Research*. – 2017. – Vol. 158. – P. 94–111.
24. Potop V., Dragosloveanu C.D.M., Ciocâlțeu A.M., Burcel M.G., Marinescu M.C., Dăscălescu D.M.C. The Mirror Theory: Parallels between Open Angle and Angle Closure Glaucoma // *Life*. – 2024. – Vol. 14, № 9. – P. 1154.
25. Wright C., Tawfik M.A., Waisbourd M., Katz L.J. Primary angle-closure glaucoma: an update // *Acta Ophthalmologica*. – 2016. – Vol. 94, № 3. – P. 217–225.
26. Sun X., Dai Y., Chen Y., Yu D.-Y., Cringle S.J., Chen J., Kong X., Wang X., Jiang C. Primary angle closure glaucoma: What we know and what we don't know // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2017. – Vol. 57. – P. 26–45.
27. Sommer A. Relationship Between Intraocular Pressure and Primary Open Angle Glaucoma Among White and Black Americans // *Archives of Ophthalmology*. – 1991. – Vol. 109, № 8. – P. 1090.
28. Kass M.A., Heuer D.K., Higginbotham E.J., Parrish R.K., Khanna C.L., Brandt J.D., Soltau J.B., Johnson C.A., Keltner J.L., Huecker J.B., Wilson B.S., Liu L., Miller J.P., Quigley H.A., Gordon M.O., Gedee S.J., Esquiabro M.Y., Fabrizio M.J., Patorgis C.J., Long T., McManus P.E., Washington C., Chang P.T., Orenge-Nania S., Leger A., Mansberger S.L., Kinast R.M., Jones E.P., Goldman C., Beck A.D., Costarides A.P., Leef D., Imami N.R., Darnley-Fisch D.A., Crandall D.A., Gutkowski M., Hall J., Fantin A., Wells J., Jampel H.D., Quigley H.A., Miller R., Saeedi O.J., Kalarn S., Coleman A.L., Young J.W., Peterson C.A., Giaconi J., Law S.K., Duarte P.B., Wood S.K., Moroi S., Gilbert J.L., Hughes B.A., Shukairy A., Juzych M.S., Milanovic C.M., O'Grady J.M., Van Conett L.A., Soltau J.B., Mohay-Ambrus J., Bottorff M., Khanna C.L., Bennett J.R., Sultze J.L., Patel D.R., Cobb S.H., Bhattacharjee P., Liebmann J.M., Cioffi G.A., Blumberg D.M., Al-Aswad L.A., De Moraes C.G., Atakulova M., Weber P.A., Sawchyn A.K., Williams D., Bennett G.R., Bennett L.C., Miller-Ellis E.G., Sankar P.S., Grand-Drossner S., Piltz-Seymour J.R., Niemczyk J.L., Brandt J.D., Lim M.C., Balasubramaniam S.C., Baik A.K., Arnold M.S., Weinreb R.N., Slight J.R., Ou Y., Lamping K.A., Vitelli C., Ashburn F.S., Hardney K.S., Schwartz A.L., Weiss H.S., Clark C., Bhorade A.M., Lind J.T., Adcock E., Keltner J.L., Johnson C.A., Smith M.A., Plumb K., Leming L., Dillon B., Parrish R.K., Palmberg P., Hodapp E., Feuer W., Varner E.A., Savatovsky E., Vandenbroucke R., Zangwill L.M., Dirkes K., Vega S., Hunsicker M., Proudfoot J., Heuer D., Higginbotham E.J., Kass M.A., Dunn D.A., Everett D.F., Gordon M.O., Soltau J., Gutowski M., Fischbach E., Clark K., Morris P.A., Quinn M., Pistorius S., Wilson B.S., Huecker J.B., Haertter L.W., Miller J.P., Liu L. Assessment of Cumulative Incidence and Severity of Primary

- Open-Angle Glaucoma Among Participants in the Ocular Hypertension Treatment Study After 20 Years of Follow-up // *JAMA Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 139, № 5. – P. 558.
29. Esporcatte B.L.B., Tavares I.M. Normal-tension glaucoma: an update // *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. – 2016. – Vol. 79, № 4. – P. 270–276.
 30. Anderson D.R. Collaborative Normal Tension Glaucoma Study // *Current Opinion in Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 14, № 2. – P. 86–90.
 31. Konieczka K., Ritch R., Traverso C.E., Kim D.M., Kook M.S., Gallino A., Golubnitschaja O., Erb C., Reitsamer H.A., Kida T., Kurysheva N., Yao K. Flammer syndrome // *EPMA Journal*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 11.
 32. Sergi M., Salerno D.E., Rizzi M., Blini M., Andreoli A., Messenio D., Pecis M., Bertoni G. Prevalence of Normal Tension Glaucoma in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Patients // *Journal of Glaucoma*. – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 42–46.
 33. Sommer A. Intraocular Pressure and Glaucoma // *American Journal of Ophthalmology*. – 1989. – Vol. 107, № 2. – P. 186–188.
 34. Oster S.F., Deiner M., Birgbauer E., Sretavan D.W. Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2004. – Vol. 15, № 1. – P. 125–136.
 35. Morrison J.C., Johnson E.C., Cepurna W., Jia L. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2005. – Vol. 24, № 2. – P. 217–240.
 36. Keller K.E., Peters D.M. Pathogenesis of glaucoma: Extracellular matrix dysfunction in the trabecular meshwork-A review // *Clinical & Experimental Ophthalmology*. – 2022. – Vol. 50, № 2. – P. 163–182.
 37. Almasieh M., Wilson A.M., Morquette B., Cueva Vargas J.L., Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2012. – Vol. 31, № 2. – P. 152–181.
 38. Zhou Y., Pernet V., Hauswirth W.W., Di Polo A. Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway by AAV Gene Transfer Protects Retinal Ganglion Cells in Glaucoma // *Molecular Therapy*. – 2005. – Vol. 12, № 3. – P. 402–412.
 39. Sun H., Wang Y., Pang I.-H., Shen J., Tang X., Li Y., Liu C., Li B. Protective effect of a JNK inhibitor against retinal ganglion cell loss induced by acute moderate ocular hypertension. // *Molecular vision*. – 2011. – Vol. 17. – P. 864–875.
 40. Kikuchi M., Tenneti L., Lipton S.A. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Axotomy-Induced Apoptosis of Rat Retinal Ganglion Cells // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20, № 13. – P. 5037–5044.

41. Harada C., Namekata K., Guo X., Yoshida H., Mitamura Y., Matsumoto Y., Tanaka K., Ichijo H., Harada T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST-deficient mice, a model of normal tension glaucoma // *Cell Death & Differentiation*. – 2010. – Vol. 17, № 11. – P. 1751–1759.
42. Ko M.-L., Peng P.-H., Ma M.-C., Ritch R., Chen C.-F. Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – Vol. 39, № 3. – P. 365–373.
43. Kong G.Y.X., Van Bergen N.J., Trounce I.A., Crowston J.G. Mitochondrial Dysfunction and Glaucoma // *Journal of Glaucoma*. – 2009. – Vol. 18, № 2. – P. 93–100.
44. Chatoo W., Abdouh M., David J., Champagne M.-P., Ferreira J., Rodier F., Bernier G. The Polycomb Group Gene *Bmi1* Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing p53 Pro-Oxidant Activity // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29, № 2. – P. 529–542.
45. Levkovitch-Verbin H., Dardik R., Vander S., Melamed S. Mechanism of retinal ganglion cells death in secondary degeneration of the optic nerve // *Experimental Eye Research*. – 2010. – Vol. 91, № 2. – P. 127–134.
46. Kimura A., Noro T., Harada T. Role of animal models in glaucoma research // *Neural Regeneration Research*. – 2020. – Vol. 15, № 7. – P. 1257.
47. Ekici F., Waisbourd M., Katz L.J. Current and Future of Laser Therapy in the Management of Glaucoma // *The Open Ophthalmology Journal*. – 2016. – Vol. 10, № 1. – P. 56–67.
48. Bar-David L., Blumenthal E.Z. Evolution of Glaucoma Surgery in the Last 25 Years // *Rambam Maimonides Medical Journal*. – 2018. – Vol. 9, № 3. – P. e0024.
49. Conlon R., Saheb H., Ahmed I.I.K. Glaucoma treatment trends: a review // *Canadian Journal of Ophthalmology*. – 2017. – Vol. 52, № 1. – P. 114–124.
50. Prum B.E., Lim M.C., Mansberger S.L., Stein J.D., Moroi S.E., Gedde S.J., Herndon L.W., Rosenberg L.F., Williams R.D. Primary Open-Angle Glaucoma Suspect Preferred Practice Pattern® Guidelines // *Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 123, № 1. – P. P112–P151.
51. Korbecki J., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D. Cyclooxygenase pathways // *Acta Biochimica Polonica*. – 2014. – Vol. 61, № 4. – P. 639–649.
52. Aihara M. Prostanoid receptor agonists for glaucoma treatment // *Japanese Journal of Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 65, № 5. – P. 581–590.
53. Alexander C.L., Miller S.J., Abel S.R. Prostaglandin Analog Treatment of Glaucoma and Ocular Hypertension // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2002. – Vol. 36, № 3. – P. 504–511.
54. Bertrand J.A., Woodward D.F., Sherwood J.M., Wang J.W., Overby D.R. The role of EP 2 receptors in mediating the ultra-long-lasting intraocular pressure reduction by JV-GL1 // *British Journal of Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 105, № 11. – P. 1610–1616.

55. Zhang Z., Yin H. Detection of EP1 and FP receptor mRNAs in the iris-ciliary body using in situ hybridization. // Chinese medical journal. – 2002. – Vol. 115, № 8. – P. 1226–1228.
56. Zhou L., Zhan W., Wei X. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of prostaglandin analogues in glaucoma // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – P. 1015338.
57. Wang J.W., Woodward D.F., Stamer W.D. Differential Effects of Prostaglandin E2-Sensitive Receptors on Contractility of Human Ocular Cells That Regulate Conventional Outflow // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2013. – Vol. 54, № 7. – P. 4782.
58. Perry C.M., McGavin J.K., Culy C.R., Ibbotson T. Latanoprost // Drugs & Aging. – 2003. – Vol. 20, № 8. – P. 597–630.
59. Stolz J., Alm A. Latanoprost in the treatment of glaucoma // Clinical Ophthalmology. – 2014. – P. 1967.
60. Cai Z., Cao M., Liu K., Duan X. Analysis of the Responsiveness of Latanoprost, Travoprost, Bimatoprost, and Tafluprost in the Treatment of OAG/OHT Patients // Journal of Ophthalmology. – 2021. – Vol. 2021. – P. 5586719.
61. Easthope S.E., Perry C.M. Topical Bimatoprost // Drugs & Aging. – 2002. – Vol. 19, № 3. – P. 231–248.
62. Bhattacharjee P., Paterson C.A., Percicot C. Studies on Receptor Binding and Signal Transduction Pathways of Unoprostone Isopropyl // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 433–441.
63. Whitson J., Fung D. An evidence-based review of unoprostone isopropyl ophthalmic solution 0.15% for glaucoma: place in therapy // Clinical Ophthalmology. – 2014. – Vol. 8. – P. 543–544.
64. Yamagishi R., Aihara M., Araie M. Neuroprotective effects of prostaglandin analogues on retinal ganglion cell death independent of intraocular pressure reduction // Experimental Eye Research. – 2011. – Vol. 93, № 3. – P. 265–270.
65. Takano N., Tsuruma K., Ohno Y., Shimazawa M., Hara H. Bimatoprost protects retinal neuronal damage via Akt pathway // European Journal of Pharmacology. – 2013. – Vol. 702, № 1–3. – P. 56–61.
66. Alm A., Grierson I., Shields M.B. Side Effects Associated with Prostaglandin Analog Therapy // Survey of Ophthalmology. – 2008. – Vol. 53, № 6. – P. S93–S105.
67. Antonova M., Wienecke T., Olesen J., Ashina M. Prostaglandins in migraine // Current Opinion in Neurology. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 269–275.
68. Wester S.T., Lee W.W., Shi W. Eyelash Growth from Application of Bimatoprost in Gel Suspension to the Base of the Eyelashes // Ophthalmology. – 2010. – Vol. 117, № 5. – P. 1024–1031.

69. Mao C., Bruce S., Wirta D., Yoelin S., Lee S., Borchert M., VanDenburgh A. An evaluation of the safety and efficacy of bimatoprost for eyelash growth in pediatric subjects // *Clinical Ophthalmology*. – 2016. – P. 419.
70. Duggan S. Omidenepag Isopropyl Ophthalmic Solution 0.002%: First Global Approval // *Drugs*. – 2018. – Vol. 78, № 18. – P. 1925–1929.
71. Matsuo M., Matsuoka Y., Tanito M. Efficacy and Patient Tolerability of Omidenepag Isopropyl in the Treatment of Glaucoma and Ocular Hypertension // *Clinical Ophthalmology*. – 2022. – Vol. Volume 16. – P. 1261–1279.
72. Nakamura N., Honjo M., Yamagishi-Kimura R., Sakata R., Watanabe S., Aihara M. Neuroprotective effect of omidenepag on excitotoxic retinal ganglion cell death regulating COX-2–EP2–cAMP–PKA/Epac pathway via Neuron–Glia interaction // *Neuroscience*. – 2024. – Vol. 553. – P. 145–159.
73. Wirta D.L., El-Harazi S.M., Tepedino M.E., Bacharach J. Sepetaprost 0.002% Noninferiority vs. Timolol 0.5% in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension // *Ophthalmology Glaucoma*. – 2025. – Vol. 8, № 4. – P. 384–392.
74. Konstas A.-G., Garhöfer G., Lübke J., Voykov B., Ropo A. A Study of 24-h Efficacy and Safety of Sepetaprost vs. Latanoprost in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension // *Advances in Therapy*. – 2025. – Vol. 42, № 8. – P. 3810-3825.
75. Wirta D.L., Kuwayama Y., Lu F., Shao H., Odani-Kawabata N. Phase 2b, Randomized, 3-Month, Dose-Finding Study of Sepetaprost in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: The ANGEL Study // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2022. – Vol. 38, № 3. – P. 240–251.
76. Chiou G.C.Y., Chen Y.J. Effects of Antiglaucoma Drugs on Ocular Blood Flow in Ocular Hypertensive Rabbits // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 1993. – Vol. 9, № 1. – P. 13–24.
77. Gilsbach R., Röser C., Beetz N., Brede M., Hadamek K., Haubold M., Leemhuis J., Philipp M., Schneider J., Urbanski M., Szabo B., Weinshenker D., Hein L. Genetic Dissection of α 2-Adrenoceptor Functions in Adrenergic versus Nonadrenergic Cells // *Molecular Pharmacology*. – 2009. – Vol. 75, № 5. – P. 1160–1170.
78. Shim M.S., Kim K.-Y., Ju W.-K. Role of cyclic AMP in the eye with glaucoma // *BMB Reports*. – 2017. – Vol. 50, № 2. – P. 60–70.
79. Lee K.Y.C., Nakayama M., Aihara M., Chen Y.-N., Araie M. Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress, and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells. // *Molecular vision*. – 2010. – Vol. 16. – P. 246–251.

80. Dong C.-J., Guo Y., Agey P., Wheeler L., Hare W.A. α_2 Adrenergic Modulation of NMDA Receptor Function as a Major Mechanism of RGC Protection in Experimental Glaucoma and Retinal Excitotoxicity // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2008. – Vol. 49, № 10. – P. 4515.
81. Lai R.K., Chun T., Hassin D., Lee S., Mehrbod F., Wheeler L. Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat // *Visual Neuroscience*. – 2002. – Vol. 19, № 2. – P. 175–185.
82. Degos V., Charpentier T. Le, Chhor V., Brissaud O., Lebon S., Schwendimann L., Bednareck N., Passemard S., Mantz J., Gressens P. Neuroprotective Effects of Dexmedetomidine against Glutamate Agonist-induced Neuronal Cell Death Are Related to Increased Astrocyte Brain-derived Neurotrophic Factor Expression // *Anesthesiology*. – 2013. – Vol. 118, № 5. – P. 1123–1132.
83. Nizari S., Guo L., Davis B.M., Normando E.M., Galvao J., Turner L.A., Bizrah M., Dehabadi M., Tian K., Cordeiro M.F. Non-amyloidogenic effects of α_2 adrenergic agonists: implications for brimonidine-mediated neuroprotection // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7, № 12. – P. e2514–e2514.
84. Townsend D.J., Brubaker R.F. Immediate effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye as measured by fluorophotometry. // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1980. – Vol. 19, № 3. – P. 256–266.
85. Mandell A.I., Stentz F., Kitabchi A.E. Dipivalyl Epinephrine: A New Pro-Drug in the Treatment of Glaucoma // *Ophthalmology*. – 1978. – Vol. 85, № 3. – P. 268–275.
86. Schenker H.I., Yablonski M.E., Podos S.M., Linder L. Fluorophotometric Study of Epinephrine and Timolol in Human Subjects // *Archives of Ophthalmology*. – 1981. – Vol. 99, № 7. – P. 1212–1216.
87. Erickson-Lamy K.A., Nathanson J.A. Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1992. – Vol. 33, № 9. – P. 2672–2678.
88. Obstbaum S.A. Low-Dose Epinephrine // *Archives of Ophthalmology*. – 1974. – Vol. 92, № 2. – P. 118.
89. Harrison R. Clonidine. Effects of a Topically Administered Solution on Intraocular Pressure and Blood Pressure in Open-Angle Glaucoma // *Archives of Ophthalmology*. – 1977. – Vol. 95, № 8. – P. 1368.
90. Arbabi A., Bao X., Shalaby W.S., Razeghinejad R. Systemic side effects of glaucoma medications // *Clinical and Experimental Optometry*. – 2022. – Vol. 105, № 2. – P. 157–165.

91. Geyer O., Schmidt K.G., Pianka P., Neudorfer M., Lazar M. Clonidine provides an allergy-free alternative in glaucoma patients with proven allergy to apraclonidine // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2000. – Vol. 238, № 2. – P. 149–152.
92. Abrams D.A., Robin A.L., Pollack I.P., DeFaller J.M., DeSantis L. The Safety and Efficacy of Topical 1% ALO 2145 (p-Aminoclonidine Hydrochloride) in Normal Volunteers // *Archives of Ophthalmology*. – 1987. – Vol. 105, № 9. – P. 1205–1207.
93. Burke J., Schwartz M. Preclinical evaluation of brimonidine // *Survey of Ophthalmology*. – 1996. – Vol. 41. – P. S9–S18.
94. Toris C.B. Effects of Brimonidine on Aqueous Humor Dynamics in Human Eyes // *Archives of Ophthalmology*. – 1995. – Vol. 113, № 12. – P. 1514.
95. Schuman J.S. Clinical experience with brimonidine 0.2% and timolol 0.5% in glaucoma and ocular hypertension // *Survey of Ophthalmology*. – 1996. – Vol. 41. – P. S27–S37.
96. Arthur S., Cantor L.B. Update on the role of alpha-agonists in glaucoma management // *Experimental Eye Research*. – 2011. – Vol. 93, № 3. – P. 271–283.
97. Schuman J.S. A 1-Year Study of Brimonidine Twice Daily in Glaucoma and Ocular Hypertension // *Archives of Ophthalmology*. – 1997. – Vol. 115, № 7. – P. 847.
98. Butler P. Clinical Experience With the Long-term Use of 1% Apraclonidine // *Archives of Ophthalmology*. – 1995. – Vol. 113, № 3. – P. 293.
99. Trope G.E., Clark B. Beta adrenergic receptors in pigmented ciliary processes. // *British Journal of Ophthalmology*. – 1982. – Vol. 66, № 12. – P. 788–792.
100. Elena P.-P., Denis P., Kosina-Boix M., Saraux H., Lapalus P. Beta Adrenergic Binding Sites in the Human Eye: An Autoradiographic Study // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 1990. – Vol. 6, № 2. – P. 143–149.
101. Kazemi A., McLaren J.W., Trese M.G.J., Toris C.B., Gulati V., Fan S., Reed D.M., Kristoff T., Gilbert J., Moroi S.E., Sit A.J. Effect of Timolol on Aqueous Humor Outflow Facility in Healthy Human Eyes // *American Journal of Ophthalmology*. – 2019. – Vol. 202. – P. 126–132.
102. Sato T., Muto T., Ishibashi Y., Roy S. Short-term effect of β -adrenoreceptor blocking agents on ocular blood flow // *Current Eye Research*. – 2001. – Vol. 23, № 4. – P. 298–306.
103. Stewart W.C., Stewart J.A., Holmes K.T., Leech J.N. Differences in ocular surface irritation between timolol hemihydrate and timolol maleate // *American Journal of Ophthalmology*. – 2000. – Vol. 130, № 6. – P. 712–716.
104. Zimmerman T.J., Canale P. Timolol—Further Observations // *Ophthalmology*. – 1979. – Vol. 86, № 1. – P. 166–169.

105. Ritch R., Hargett N.A., Podos S.M. The Effect Of 1.5% Timolol Maleate On Intraocular Pressure // *Acta Ophthalmologica*. – 1978. – Vol. 56, № 1. – P. 6–10.
106. Berson F.G., Epstein D.L., Partamian L.G., Cinotti A., Cohen H., Fries P., David R., Gurion B., Duzman E., Novack G.D., Lue J.L., Foerster R.J., Galin M., Lass J., Ober M., Scharrer A., Shin D., Silverstone D.E. Levobunolol: A Beta-adrenoceptor Antagonist Effective in the Long-term Treatment of Glaucoma // *Ophthalmology*. – 1985. – Vol. 92, № 9. – P. 1271–1276.
107. Scoville B., Mueller B., White B.G., Krieglstein G.K. A Double-Masked Comparison of Carteolol and Timolol in Ocular Hypertension // *American Journal of Ophthalmology*. – 1988. – Vol. 105, № 2. – P. 150–154.
108. Battershill P.E., Sorkin E.M. Ocular Metipranolol // *Drugs*. – 1988. – Vol. 36, № 5. – P. 601–615.
109. Hirota A., Mishima H., Kiuchi Y., Nagata A., Kurokawa T., Ishibashi S. Effect of topical 8-hydroxy carteolol on intraocular pressure and melanin granules // *Nippon Ganka Gakkai zasshi*. – 1991. – Vol. 95, № 8. – P. 752–757.
110. Argikar U.A., Dumouchel J.L., Dunne C.E., Saran C., Cirello A.L., Gunduz M. Ocular Metabolism of Levobunolol: Historic and Emerging Metabolic Pathways // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2016. – Vol. 44, № 8. – P. 1304–1312.
111. Schoene R.B., Abuan R.N.T., Ward R.L., Beasley C.H. Effects of Topical Betaxolol, Timolol, and Placebo on Pulmonary Function in Asthmatic Bronchitis // *American Journal of Ophthalmology*. – 1984. – Vol. 97, № 1. – P. 86–92.
112. Goto W., Ota T., Morikawa N., Otori Y., Hara H., Kawazu K., Miyawaki N., Tano Y. Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina // *Brain Research*. – 2002. – Vol. 958, № 1. – P. 10–19.
113. Osborne N.N., Desantis L., Bae J.H., Ugarte M., Wood J.P.M., Nash M.S., Chidlow G. Topically Applied Betaxolol Attenuates NMDA-induced Toxicity to Ganglion Cells and the Effects of Ischaemia to the Retina // *Experimental Eye Research*. – 1999. – Vol. 69, № 3. – P. 331–342.
114. McMahon C.D., Shaffer R.N., Dunbar Hoskins H., Hetherington J. Adverse Effects Experienced by Patients Taking Timolol // *American Journal of Ophthalmology*. – 1979. – Vol. 88, № 4. – P. 736–738.
115. Stamper R.L. Primary Drug Treatment for Glaucoma // *Survey of Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 47, № 1. – P. 63–67.
116. Kumar S., Rulhania S., Jaswal S., Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 209. – P. 112923.

117. Sugrue M.F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2000. – Vol. 19, № 1. – P. 87–112.
118. Liao S.-Y. Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma // *Journal of Medical Genetics*. – 2003. – Vol. 40, № 4. – P. 257–261.
119. Hageman G.S., Zhu X.L., Waheed A., Sly W.S. Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88, № 7. – P. 2716–2720.
120. Wistrand P.J., Schenholm M., Lonnerholm G. Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human eye // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1986. – Vol. 27, № 3. – P. 419–428.
121. Wu Q., Delamere N.A., Pierce W. Membrane-associated carbonic anhydrase in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1997. – Vol. 38, № 10. – P. 2093–2102.
122. Maus T.L. Comparison of Dorzolamide and Acetazolamide as Suppressors of Aqueous Humor Flow in Humans // *Archives of Ophthalmology*. – 1997. – Vol. 115, № 1. – P. 45.
123. Schmickl C.N., Owens R.L., Orr J.E., Edwards B.A., Malhotra A. Side effects of acetazolamide: a systematic review and meta-analysis assessing overall risk and dose dependence // *BMJ Open Respiratory Research*. – 2020. – Vol. 7, № 1. – P. e000557.
124. Maren T.H., Jankowska L., Sanyal G., Edelhauser H.F. The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion // *Experimental Eye Research*. – 1983. – Vol. 36, № 4. – P. 457–479.
125. Kaur I.P., Smitha R., Aggarwal D., Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – Vol. 248, № 1–2. – P. 1–14.
126. Abdel-Rashid R.S., Helal D.A., Omar M.M., El Sisi A.M. Nanogel loaded with surfactant based nanovesicles for enhanced ocular delivery of acetazolamide // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 14. – P. 2973–2983.
127. Hathout R.M., Mansour S., Mortada N.D., Guinedi A.S. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: In vitro and in vivo studies // *AAPS PharmSciTech*. – 2007. – Vol. 8, № 1. – P. E1–E12.
128. Mora M.J., Petiti J.P., Longhi M.R., Torres A.I., Granero G.E. Intestinal uptake and toxicity evaluation of acetazolamide and its multicomponent complexes with hidroxypropyl- β -cyclodextrin in rats // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 478, № 1. – P. 258–267.

129. Granero G.E., Longhi M.R. Promising complexes of acetazolamide for topical ocular administration // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2010. – Vol. 7, № 8. – P. 943–953.
130. Maren T.H., Haywood J.R., Chapman S.K., Zimmerman T.J. The pharmacology of methazolamide in relation to the treatment of glaucoma // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1977. – Vol. 16, № 8. – P. 730–742.
131. Drance S.M. Ethoxzolamide (Cardrase) in the Management of Chronic Simple Glaucoma // *Archives of Ophthalmology*. – 1960. – Vol. 64, № 3. – P. 433–437.
132. Masini E., Carta F., Scozzafava A., Supuran C.T. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2013. – Vol. 23, № 6. – P. 705–716.
133. Pinard M.A., Boone C.D., Rife B.D., Supuran C.T., McKenna R. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 21, № 22. – P. 7210–7215.
134. Mincione F., Scozzafava A., Supuran C. The Development of Topically Acting Carbonic Anhydrase Inhibitors as Antiglaucoma Agents // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 7, № 9. – P. 849–854.
135. Scozzafava A., Menabuoni L., Mincione F., Briganti F., Mincione G., Supuran C.T. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Synthesis of Water-Soluble, Topically Effective, Intraocular Pressure-Lowering Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides Containing Cationic or Anionic Moieties: Is the Tail More Important than the Ring? // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 42, № 14. – P. 2641–2650.
136. Patrikainen M., Pan P., Kuleskaya N., Voikar V., Parkkila S. The role of carbonic anhydrase VI in bitter taste perception: evidence from the Car6^{-/-} mouse model // *Journal of Biomedical Science*. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 82.
137. Aalto-Korte K. Contact allergy to dorzolamide eyedrops // *Contact Dermatitis*. – 1998. – Vol. 39, № 4. – P. 206–206.
138. Carlsen J. Nephrolithiasis With Dorzolamide // *Archives of Ophthalmology*. – 1999. – Vol. 117, № 8. – P. 1087.
139. the Schwartzberg G.W., Trope G.E. Anorexia, depression and dementia induced by dorzolamide eyedrops (Trusopt). // *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*. – 1999. – Vol. 34, № 2. – P. 93–94.
140. Angeli A., Chelli I., Lucarini L., Sgambellone S., Marri S., Villano S., Ferraroni M., De Luca V., Capasso C., Carta F., Supuran C.T. Novel Carbonic Anhydrase Inhibitors with Dual-Tail Core Sulfonamide Show Potent and Lasting Effects for Glaucoma Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 67, № 4. – P. 3066–3089.

141. Tawfik H.O., Saleh M.M., Ammara A., Khaleel E.F., Badi R., Khater Y.T.T., Rasheed R.A., Attia A.A., Hefny S.M., Elkaeed E.B., Nocentini A., Supuran C.T., Eldehna W.M., Shaldam M.A. Discovery of Novel Pyridazine-Tethered Sulfonamides as Carbonic Anhydrase II Inhibitors for the Management of Glaucoma // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 67, № 2. – P. 1611–1623.
142. Hou Z., Li C., Liu Y., Zhang M., Wang Y., Fan Z., Guo C., Lin B., Liu Y. Design, synthesis and biological evaluation of carbohydrate-based sulphonamide derivatives as topical antiglaucoma agents through selective inhibition of carbonic anhydrase II // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 35, № 1. – P. 383–390.
143. Xie Y., Wang X., Jia H., Chu N. Discovery of water-soluble semicarbazide-containing sulfonamide derivatives possessing favorable anti-glaucoma effect in vivo and drug-like properties // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2024. – Vol. 32, № 3. – P. 101969.
144. Chiaramonte N., Angeli A., Sgambellone S., Bonardi A., Nocentini A., Bartolucci G., Braconi L., Dei S., Lucarini L., Teodori E., Gratteri P., Wünsch B., Supuran C.T., Romanelli M.N. 2-(2-Hydroxyethyl)piperazine derivatives as potent human carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, enzyme inhibition, computational studies and antiglaucoma activity // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 228. – P. 114026.
145. Kurban M.G., Çakmak R., Başaran E., Türkmenoğlu B., Şentürk M. Synthesis of new sulfonamide derivatives: Investigation of their interactions with carbonic anhydrase and cholinesterase enzymes by in vitro and in silico evaluations // *Journal of Molecular Structure*. – 2024. – Vol. 1314. – P. 138798.
146. Abul N., Tüzün B., Gülçin İ., Atmaca U. The synthesis of novel unnatural amino acid by intramolecular aza-Michael addition reaction as multitarget enzyme inhibitors // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2024. – Vol. 38, № 9. – P. e23837.
147. Atmaca U., Sağlamtas R., Sert Y., Çelik M., Gülçin İ. Metal-Free Synthesis via Intramolecular Cyclization, Enzyme Inhibition Properties and Molecular Docking of Novel Isoindolinones // *ChemistrySelect*. – 2023. – Vol. 8, № 9. – P. 1–14.
148. Tokalı F.S., Taslimi P., Tuzun B., Karakuş A., Sadeghian N., Gülçin İ. Novel Quinazolinone Derivatives: Potential Synthetic Analogs for the Treatment of Glaucoma, Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus // *Chemistry and Biodiversity*. – 2023. – Vol. 20, № 10. – P. e202301134.
149. Yakan H., Muğlu H., Türkeş C., Demir Y., Erdoğan M., Çavuş M.S., Beydemir Ş. A novel series of thiosemicarbazone hybrid scaffolds: Design, synthesis, DFT studies, metabolic enzyme inhibition properties, and molecular docking calculations // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1280. – P. 135077.

150. Tokalı F.S., Taslimi P., Tüzün B., Karakuş A., Sadeghian N., Gulçin İ. Synthesis of new carboxylates and sulfonates containing thiazolidin-4-one ring and evaluation of inhibitory properties against some metabolic enzymes // *Journal of the Iranian Chemical Society*. – 2023. – Vol. 20, № 10. – P. 2631–2642.
151. Yavari M.A., Adiloglu Y., Saglamtas R., Tutar A., Gulcin I., Menzek A. Synthesis and some enzyme inhibition effects of isoxazoline and pyrazoline derivatives including benzonorbornene unit // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2022. – Vol. 36, № 2. – P. 1–9.
152. Anil D.A., Polat M.F., Saglamtas R., Tarikogullari A.H., Alagoz M.A., Gulcin I., Algul O., Burmaoglu S. Exploring enzyme inhibition profiles of novel halogenated chalcone derivatives on some metabolic enzymes: Synthesis, characterization and molecular modeling studies // *Computational Biology and Chemistry*. – 2022. – Vol. 100. – P. 107748.
153. Oztaskin N., Goksu S., Demir Y., Maras A., Gulcin İ. Synthesis of Novel Bromophenol with Diaryl Methanes—Determination of Their Inhibition Effects on Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 21. – P. 7426.
154. El-Azab A.S., Abdel-Aziz A.A.-M., Ghabbour H.A., Bua S., Nocentini A., Alkahtani H.M., Alsaif N.A., Al-Agamy M.H.M., Supuran C.T. Carbonic Anhydrase Inhibition Activities of Schiff's Bases Based on Quinazoline-Linked Benzenesulfonamide // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 22. – P. 7703.
155. El-Azab A.S., A.-M. Abdel-Aziz A., Bua S., Nocentini A., Bakheit A.H., Alkahtani H.M., Hefnawy M.M., Supuran C.T. Design, synthesis, and carbonic anhydrase inhibition activities of Schiff bases incorporating benzenesulfonamide scaffold: Molecular docking application // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2023. – Vol. 31, № 12. – P. 101866.
156. Hoyng P.F.J., van Beek L.M. Pharmacological Therapy for Glaucoma // *Drugs*. – 2000. – Vol. 59, № 3. – P. 411–434.
157. Ruan Y., Patzak A., Pfeiffer N., Gericke A. Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Retina—Therapeutic Implications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4989.
158. Gil D.W., Krauss H.A., Bogardus A.M., WoldeMussie E. Muscarinic receptor subtypes in human iris-ciliary body measured by immunoprecipitation // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1997. – Vol. 38, № 7. – P. 1434–1442.
159. Wiederholt M., Thieme H., Stumpff F. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2000. – Vol. 19, № 3. – P. 271–295.

160. Bleiman B.S. Paradoxical Intraocular Pressure Response to Pilocarpine // *Archives of Ophthalmology*. – 1979. – Vol. 97, № 7. – P. 1305.
161. Almasieh M., MacIntyre J.N., Pouliot M., Casanova C., Vaucher E., Kelly M.E.M., Di Polo A. Acetylcholinesterase Inhibition Promotes Retinal Vasoprotection and Increases Ocular Blood Flow in Experimental Glaucoma // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2013. – Vol. 54, № 5. – P. 3171.
162. Proudfoot A. The Early Toxicology of Physostigmine // *Toxicological Reviews*. – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 99–138.
163. Arens A.M., Kearney T. Adverse Effects of Physostigmine // *Journal of Medical Toxicology*. – 2019. – Vol. 15, № 3. – P. 184–191.
164. Horne D.A., Fugmann B., Yakushijin K., Buchi G. A synthesis of pilocarpine // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1993. – Vol. 58, № 1. – P. 62–64.
165. Skaat A., Rosman M.S., Chien J.L., Mogil R.S., Ren R., Liebmann J.M., Ritch R., Park S.C. Effect of Pilocarpine Hydrochloride on the Schlemm Canal in Healthy Eyes and Eyes With Open-Angle Glaucoma // *JAMA Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 134, № 9. – P. 976.
166. Çekiç O., Batman C. Effect of intracameral carbachol on intraocular pressure following clear corneal phacoemulsification // *Eye*. – 1999. – Vol. 13, № 2. – P. 209–211.
167. MORRISON W.H. Stability of aqueous solutions commonly employed in the treatment of primary glaucoma. // *Transactions of the American Ophthalmological Society*. – 1952. – Vol. 50. – P. 551–606.
168. Wood T.O. Effect of carbachol on postoperative intraocular pressure // *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. – 1988. – Vol. 14, № 6. – P. 654–656.
169. Reichert R.W., Shields M.B., Stewart W.C. Intraocular Pressure Response to Replacing Pilocarpine with Carbachol // *American Journal of Ophthalmology*. – 1988. – Vol. 106, № 6. – P. 747–748.
170. Krishna N., Leopold I.H. The Effect of BC-48 (Demecarium Bromide) on Normal Rabbit and Human Eyes // *American Journal of Ophthalmology*. – 1960. – Vol. 49, № 2. – P. 270–277.
171. Ward D.A., Abney K., Oliver J.W. The effects of topical ocular application of 0.25% demecarium bromide on serum acetylcholinesterase levels in normal dogs // *Veterinary Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 6, № 1. – P. 23–25.
172. Kraus C.L., Trivedi R.H., Wilson M.E. Intraocular pressure control with echothiophate iodide in children's eyes with glaucoma after cataract extraction // *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 116-118.e1.

173. Karri R., Chong E.W. ROCK inhibitors in ophthalmology: A critical review of the existing clinical evidence // *Clinical & Experimental Ophthalmology*. – 2023. – Vol. 51, № 5. – P. 472–483.
174. Chang R., Wang S. An emerging treatment option for glaucoma: Rho kinase inhibitors // *Clinical Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 8. – P. 883-890.
175. Saha B.C., Kumari R., Kushumesh R., Ambasta A., Sinha B.P. Status of Rho kinase inhibitors in glaucoma therapeutics—an overview // *International Ophthalmology*. – 2022. – Vol. 42, № 1. – P. 281–294.
176. Pakravan M., Beni A.N., Ghahari E., Varshochian R., Yazdani S., Esfandiari H., Ahmadi H. The Ocular Hypotensive Efficacy of Topical Fasudil, a Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor, in Patients With End-Stage Glaucoma // *American Journal of Therapeutics*. – 2017. – Vol. 24, № 6. – P. e676–e680.
177. Kusuhara S., Nakamura M. Ripasudil Hydrochloride Hydrate in the Treatment of Glaucoma: Safety, Efficacy, and Patient Selection // *Clinical Ophthalmology*. – 2020. – Vol. Volume 14. – P. 1229–1236.
178. Ren R., Li G., Le T.D., Kopczynski C., Stamer W.D., Gong H. Netarsudil Increases Outflow Facility in Human Eyes Through Multiple Mechanisms // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2016. – Vol. 57, № 14. – P. 6197.
179. Chen H., McMillin J.C., Frankfort B.J., Al-Mohtaseb Z. Reticular Epithelial Edema: An Uncommon Side Effect of ROCK/NET Inhibitor Netarsudil // *Journal of Glaucoma*. – 2020. – Vol. 29, № 11. – P. e124–e126.
180. Lewis R.A., Levy B., Ramirez N., Kopczynski C.C., Usner D.W., Novack G.D. Fixed-dose combination of AR-13324 and latanoprost: A double-masked, 28-day, randomised, controlled study in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension // *British Journal of Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 100, № 3. – P. 339–344.
181. Lin C.-W., Sherman B., Moore L.A., Laethem C.L., Lu D.-W., Pattabiraman P.P., Rao P.V., DeLong M.A., Kopczynski C.C. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 34, № 1–2. – P. 40–51.
182. Gonzalez L.E., Boylan P.M. Netarsudil for the Treatment of Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension: A Literature Review // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 55, № 8. – P. 1025–1036.
183. Kahook M.Y., Serle J.B., Mah F.S., Kim T., Raizman M.B., Heah T., Ramirez-Davis N., Kopczynski C.C., Usner D.W., Novack G.D. Long-term Safety and Ocular Hypotensive

- Efficacy Evaluation of Netarsudil Ophthalmic Solution: Rho Kinase Elevated IOP Treatment Trial (ROCKET-2) // *American Journal of Ophthalmology*. – 2019. – Vol. 200. – P. 130–137.
184. Ren R., Humphrey A.A., Kopczynski C., Gong H. Rho Kinase Inhibitor AR-12286 Reverses Steroid-Induced Changes in Intraocular Pressure, Effective Filtration Areas, and Morphology in Mouse Eyes // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2023. – Vol. 64, № 2. – P. 7.
185. Williams R.D., Novack G.D., van Haarlem T., Kopczynski C. Ocular Hypotensive Effect of the Rho Kinase Inhibitor AR-12286 in Patients With Glaucoma and Ocular Hypertension // *American Journal of Ophthalmology*. – 2011. – Vol. 152, № 5. – P. 834-841.e1.
186. Ha A., Kim Y.K., Jeoung J.W., Satyal S., Kim J., Kim S., Park K.H. Sovesudil (locally acting rho kinase inhibitor) for the treatment of normal-tension glaucoma: the randomized phase II study // *Acta Ophthalmologica*. – 2022. – Vol. 100, № 2. – P. e470-e477.
187. Hartman P.J., Cooke D.L., Hsu H.H., Stewart J., Sumi K., Yoshida Y., Hidaka H., Novack G.D. Phase I/II, Double-Masked, Randomized, Vehicle-Controlled Study of H-1337 Ophthalmic Solution for Glaucoma and Ocular Hypertension // *Ophthalmology Glaucoma*. – 2023. – Vol. 6, № 2. – P. 198–205.
188. Shoji H., Yoshida Y., Sanada T.J., Naito A., Maruyama J., Zhang E., Sumi K., Sakao S., Maruyama K., Hidaka H., Tatsumi K. The Isoquinoline-Sulfonamide Compound H-1337 Attenuates SU5416/Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats // *Cells*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 66.
189. Sun Y., Li Y., Miao Z., Yang R., Zhang Y., Wu M., Lin G., Li L. Discovery of 3,4-dihydrobenzo [f] [1,4]oxazepin-5(2H)-one derivatives as a new class of ROCK inhibitors for the treatment of glaucoma // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 45, № February. – P. 128138.
190. Becquet F., Courtois Y., Goureau O. Nitric oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes // *Survey of Ophthalmology*. – 1997. – Vol. 42, № 1. – P. 71–82.
191. Schneemann A., Leusink-Muis A., van den Berg T., Hoyng P.F.J., Kamphuis W. Elevation of nitric oxide production in human trabecular meshwork by increased pressure // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 241, № 4. – P. 321–326.
192. Hara M.R., Agrawal N., Kim S.F., Cascio M.B., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J.H., Tankou S.K., Hester L.D., Ferris C.D., Hayward S.D., Snyder S.H., Sawa A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding // *Nature Cell Biology*. – 2005. – Vol. 7, № 7. – P. 665–674.

193. Neufeld A.H., Das S., Vora S., Gachie E., Kawai S. ichiro, Manning P.T., Connor J.R. A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma // *Journal of Glaucoma*. – 2002. – Vol. 11, № 3. – P. 221–225.
194. Pang I.-H., Johnson E.C., Jia L., Cepurna W.O., Shepard A.R., Hellberg M.R., Clark A.F., Morrison J.C. Evaluation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Glaucomatous Optic Neuropathy and Pressure-Induced Optic Nerve Damage // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2005. – Vol. 46, № 4. – P. 1313.
195. Nathanson J.A. Nitrovasodilators as a new class of ocular hypotensive agents. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 1992. – Vol. 260, № 3. – P. 956–965.
196. Kotikoski H., Alajuuma P., Moilanen E., Salmenperä P., Oksala O., Laippala P., Vapaatalo H. Comparison of Nitric Oxide Donors in Lowering Intraocular Pressure in Rabbits: Role of Cyclic GMP // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2002. – Vol. 18, № 1. – P. 11–23.
197. Wang R.-F., Podos S.M. Effect of the topical application of nitroglycerin on intraocular pressure in normal and glaucomatous monkeys // *Experimental Eye Research*. – 1995. – Vol. 60, № 3. – P. 337–339.
198. Cavet M.E., DeCory H.H. The Role of Nitric Oxide in the Intraocular Pressure Lowering Efficacy of Latanoprostene Bunod: Review of Nonclinical Studies // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 34, № 1–2. – P. 52–60.
199. Andrés-Guerrero V., García-Feijoo J. Nitric oxide-donating compounds for IOP lowering in glaucoma // *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)*. – 2018. – Vol. 93, № 6. – P. 290–299.
200. Weinreb R.N., Scassellati Sforzolini B., Vittitow J., Liebmann J. Latanoprostene Bunod 0.024% versus Timolol Maleate 0.5% in Subjects with Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension // *Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 123, № 5. – P. 965–973.
201. Wang Y., Liao Y., Nie X. Comparative evaluation of Latanoprostene Bunod, Timolol Maleate, and latanoprost Ophthalmic Solutions to assess their safety and efficacy in lowering intraocular pressure for the management of Open-Angle Glaucoma // *Clinics*. – 2020. – Vol. 75. – P. e1874.
202. Garcia G., Ngai P., Mosaed S., Lin K. Critical evaluation of latanoprostene bunod in the treatment of glaucoma // *Clinical Ophthalmology*. – 2016. – Vol. Volume 10. – P. 2035–2050.
203. Impagnatiello F., Toris C.B., Batugo M., Prasanna G., Borghi V., Bastia E., Ongini E., Krauss A.H.P. Intraocular Pressure-Lowering Activity of NCX 470, a Novel Nitric Oxide-Donating Bimatoprost in Preclinical Models // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2015. – Vol. 56, № 11. – P. 6558.

204. Walters T.R., Kothe A.C., Boyer J.L., Usner D.W., Lopez K., Duquesroix B., Fechtner R.D., Navratil T. A Randomized, Controlled Comparison of NCX 470 (0.021%, 0.042%, and 0.065%) and Latanoprost 0.005% in Patients With Open-angle Glaucoma or Ocular Hypertension: The Dolomites Study // *Journal of Glaucoma*. – 2022. – Vol. 31, № 6. – P. 382–391.
205. Li C., Zhu M., Liu S., Zhang J., Ye H., Zhang C., Ji D., Tang H., Zhang Y., Wu J., Huang Z. Development of Nitric Oxide-Donating Netarsudil Derivatives as a Synergistic Therapy for Glaucoma with Reduced Ocular Irritation // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 67, № 18. – P. 16311–16327.
206. Amankwa C.E., Gondi S.R., Dibas A., Weston C., Funk A., Nguyen T., Nguyen K.T., Ellis D.Z., Acharya S. Novel thiol containing hybrid antioxidant-nitric oxide donor small molecules for treatment of glaucoma // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10, № 4. – P. 1–16.
207. Acharya S., Rogers P., Krishnamoorthy R.R., Stankowska D.L., Dias H.V.R., Yorrio T. Design and synthesis of novel hybrid sydnimine and prodrug useful for glaucomatous optic neuropathy // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26, № 5. – P. 1490–1494.
208. Spinozzi E., Baldassarri C., Acquaticci L., Del Bello F., Grifantini M., Cappellacci L., Riccardo P. Adenosine receptors as promising targets for the management of ocular diseases // *Medicinal Chemistry Research*. – 2021. – Vol. 30, № 2. – P. 353–370.
209. Fishman P., Cohen S., Bar-yehuda S. Targeting the A3 adenosine receptor for glaucoma treatment // *Molecular Medicine Reports*. – 2013. – Vol. 7, № 6. – P. 1723–1725.
210. Jacobson K.A., Tosh D.K., Jain S., Gao Z.-G. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 124.
211. Zhong Y., Yang Z., Huang W.-C., Luo X. Adenosine, adenosine receptors and glaucoma: An updated overview // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2013. – Vol. 1830, № 4. – P. 2882–2890.
212. Myers J.S., Sall K.N., DuBiner H., Slomowitz N., McVicar W., Rich C.C., Baumgartner R.A. A Dose-Escalation Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Efficacy of 2 and 4 Weeks of Twice-Daily Ocular Trabodenoson in Adults with Ocular Hypertension or Primary Open-Angle Glaucoma // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2016. – Vol. 32, № 8. – P. 555–562.
213. Park C.-W., Han C.-T., Sakaguchi Y., Lee J., Youn H.-Y. Safety evaluation of FM101, an A3 adenosine receptor modulator, in rat, for developing as therapeutics of glaucoma and hepatitis. // *EXCLI journal*. – 2020. – Vol. 19. – P. 187–200.

214. Kim J., Park D.-Y., Bae H., Park D.Y., Kim D., Lee C.-K., Song S., Chung T.-Y., Lim D.H., Kubota Y., Hong Y.-K., He Y., Augustin H.G., Oliver G., Koh G.Y. Impaired angiopoietin/Tie2 signaling compromises Schlemm's canal integrity and induces glaucoma. // *The Journal of clinical investigation*. – 2017. – Vol. 127, № 10. – P. 3877–3896.
215. Mishra S., Ipe U., Nottebaum A.F., Peters K.G., Vestweber D. Inhibition of VE-PTP rejuvenates Schlemm's canal in aged mice and acts via Tie2 // *PLOS One*. – 2025. – Vol. 20, № 5. – P. e0323615.
216. Brigell M., Withers B., Buch A., Peters K.G. Tie2 Activation via VE-PTP Inhibition With Razuprotafib as an Adjunct to Latanoprost in Patients With Open Angle Glaucoma or Ocular Hypertension // *Translational Vision Science & Technology*. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 7.
217. Li G., Nottebaum A.F., Brigell M., Navarro I.D., Ipe U., Mishra S., Gomez-Caraballo M., Schmitt H., Soldo B., Pakola S., Withers B., Peters K.G., Vestweber D., Stamer W.D. A Small Molecule Inhibitor of VE-PTP Activates Tie2 in Schlemm's Canal Increasing Outflow Facility and Reducing Intraocular Pressure // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2020. – Vol. 61, № 14. – P. 12.
218. Haider A.A., Rex T.S., Wareham L.K. cGMP Signaling in the Neurovascular Unit— Implications for Retinal Ganglion Cell Survival in Glaucoma // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, № 11. – P. 1671.
219. Stein P.J., Clack J.W. Topical application of a cyclic GMP analog lowers IOP in normal and ocular hypertensive rabbits // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1994. – Vol. 35, № 6. – P. 2765–2768.
220. Fernández-Durango R., Moya F.J., Rípodas A., de Juan J.A., Fernández-Cruz A., Bernal R. Type B and type C natriuretic peptide receptors modulate intraocular pressure in the rabbit eye // *European Journal of Pharmacology*. – 1999. – Vol. 364, № 2–3. – P. 107–113.
221. Ma J., Yu W., Wang Y., Cao G., Cai S., Chen X., Yan N., Yuan Y., Zeng H., Fleenor D.L., Liu X., Pang I.-H. Neuroprotective Effects of C-Type Natriuretic Peptide on Rat Retinal Ganglion Cells // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2010. – Vol. 51, № 7. – P. 3544.
222. Martin P., Cohen A., Uddin S., Epelbaum L., Josiah S. Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Dose Escalation Study of TAK-639 Topical Ophthalmic Solution in Subjects with Ocular Hypertension or Primary Open-Angle Glaucoma // *Clinical Ophthalmology*. – 2020. – Vol. Volume 14. – P. 885–896.
223. Feng Y., Prokosch V., Liu H. Current Perspective of Hydrogen Sulfide as a Novel Gaseous Modulator of Oxidative Stress in Glaucoma // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 671.

224. Erisgin Z., Ozer M.A., Tosun M., Ozen S., Takir S. The effects of intravitreal H₂S application on apoptosis in the retina and cornea in experimental glaucoma model // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2019. – Vol. 100, № 5–6. – P. 330–336.
225. Salvi A., Bankhele P., Jamil J.M., Kulkarni-Chitnis M., Njie-Mbye Y.F., Ohia S.E., Opere C.A. Pharmacological Actions of Hydrogen Sulfide Donors on Sympathetic Neurotransmission in the Bovine Anterior Uvea, In Vitro // *Neurochemical Research*. – 2016. – Vol. 41, № 5. – P. 1020–1028.
226. Sparaco R., Citi V., Magli E., Martelli A., Piragine E., Calderone V., Andrezzi G., Perissutti E., Frecentese F., Santagada V., Caliendo G., Severino B., Corvino A., Fiorino F. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Molecular Hybrids between Antiglaucoma Drugs and H₂S Donors // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 22. – P. 13804.
227. Hepler R.S. Marijuana Smoking and Intraocular Pressure // *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. – 1971. – Vol. 217, № 10. – P. 1392.
228. Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1997. – Vol. 74, № 2. – P. 129–180.
229. Passani A., Posarelli C., Sframeli A.T., Perciballi L., Pellegrini M., Guidi G., Figus M. Cannabinoids in Glaucoma Patients: The Never-Ending Story // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. 3978.
230. Lindner T., Schmidl D., Peschorn L., Pai V., Popa-Cherecheanu A., Chua J., Schmetterer L., Garhöfer G. Therapeutic Potential of Cannabinoids in Glaucoma // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16, № 8. – P. 1149.
231. Porcella A., Maxia C., Gessa G.L., Pani L. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 decreases the intraocular pressure in human glaucoma resistant to conventional therapies // *European Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 13, № 2. – P. 409–412.
232. Hingorani T., Adelli G.R., Punyamurthula N., Gul W., ElSohly M.A., Repka M.A., Majumdar S. Ocular Disposition of the Hemiglutarate Ester Prodrug of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol from Various Ophthalmic Formulations // *Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 30, № 8. – P. 2146–2156.
233. Taskar P.S., Patil A., Lakhani P., Ashour E., Gul W., ElSohly M.A., Murphy B., Majumdar S. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Derivative-Loaded Nanoformulation Lowers Intraocular Pressure in Normotensive Rabbits // *Translational Vision Science & Technology*. – 2019. – Vol. 8, № 5. – P. 15.
234. Onofrychuk T.J., Cai S., McElroy D.L., Roebuck A.J., Greba Q., Garai S., Thakur G.A., Laprairie R.B., Howland J.G. Effects of the cannabinoid receptor 1 positive allosteric modulator GAT211 and acute MK-801 on visual attention and impulsivity in rats assessed

- using the five-choice serial reaction time task // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2021. – Vol. 109. – P. 110235.
235. Kulkarni A.R., Garai S., Janero D.R., Thakur G.A. Design and Synthesis of Cannabinoid 1 Receptor (CB1R) Allosteric Modulators: Drug Discovery Applications. – 2017. – P. 281–315.
236. Laprairie R.B., Kulkarni P.M., Deschamps J.R., Kelly M.E.M., Janero D.R., Cascio M.G., Stevenson L.A., Pertwee R.G., Kenakin T.P., Denovan-Wright E.M., Thakur G.A. Enantiospecific Allosteric Modulation of Cannabinoid 1 Receptor // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2017. – Vol. 8, № 6. – P. 1188–1203.
237. Garai S., Leo L.M., Szczesniak A.-M., Hurst D.P., Schaffer P.C., Zagzoog A., Black T., Deschamps J.R., Miess E., Schulz S., Janero D.R., Straiker A., Pertwee R.G., Abood M.E., Kelly M.E.M., Reggio P.H., Laprairie R.B., Thakur G.A. Discovery of a Biased Allosteric Modulator for Cannabinoid 1 Receptor: Preclinical Anti-Glaucoma Efficacy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64, № 12. – P. 8104–8126.
238. Cairns E.A., Szczesniak A.-M., Straiker A.J., Kulkarni P.M., Pertwee R.G., Thakur G.A., Baldrige W.H., Kelly M.E.M. The In Vivo Effects of the CB 1 -Positive Allosteric Modulator GAT229 on Intraocular Pressure in Ocular Normotensive and Hypertensive Mice // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2017. – Vol. 33, № 8. – P. 582–590.
239. Garai S., Schaffer P.C., Laprairie R.B., Janero D.R., Pertwee R.G., Straiker A., Thakur G.A. Design, synthesis, and pharmacological profiling of cannabinoid 1 receptor allosteric modulators: Preclinical efficacy of C2-group GAT211 congeners for reducing intraocular pressure // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 50, № July. – P. 116421.
240. Mallorga P., Sugrue M.F. Characterization of serotonin receptors in the iris + ciliary body of the albino rabbit // *Current Eye Research*. – 1987. – Vol. 6, № 3. – P. 527–532.
241. Meyer-Bothling U., Bron A.J., Osborne N.N. Topical application of serotonin or the 5-HT1-agonist 5-CT intraocular pressure in rabbits // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 1993. – Vol. 34, № 10. – P. 3035–3042.
242. Ciobanu A.M., Dionisie V., Neagu C., Bolog O.M., Riga S., Popa-Velea O. Psychopharmacological Treatment, Intraocular Pressure and the Risk of Glaucoma: A Review of Literature // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10, № 13. – P. 2947.
243. A. Sharif N. Serotonin-2 Receptor Agonists as Novel Ocular Hypotensive Agents and their Cellular and Molecular Mechanisms of Action: Novel Drug Targets for Glaucoma Treatment // *Current Drug Targets*. – 2010. – Vol. 11, № 8. – P. 978–993.
244. Sharif N.A., May J.A. Potential for serotonergic agents to treat elevated intraocular pressure and glaucoma: Focus on 5-HT2 receptor agonists // *Expert Review of Ophthalmology*. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 105–120.

245. Sharif N.A., McLaughlin M.A., Kelly C.R. AL-34662: A Potent, Selective, And Efficacious Ocular Hypotensive Serotonin-2 Receptor Agonist // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 2007. – Vol. 23, № 1. – P. 1–13.
246. Hou X., Pan Y. Melatonin in Glaucoma: Integrative Mechanisms of Intraocular Pressure Control and Neuroprotection // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13, № 5. – P. 1213.
247. Dortch-Carnes J., Tosini G. Melatonin receptor agonist-induced reduction of SNP-released nitric oxide and cGMP production in isolated human non-pigmented ciliary epithelial cells // *Experimental Eye Research*. – 2013. – Vol. 107. – P. 1–10.
248. Li K.-L., Shan S.-W., Lin F.-Y., Ling C.-Y., Wong N.-W., Li H.-L., Han W., To C.-H., Do C.-W. Regulation of Aqueous Humor Secretion by Melatonin in Porcine Ciliary Epithelium // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 6. – P. 5789.
249. Nosjean O., Nicolas J.-P., Klupsch F., Delagrangé P., Canet E., Boutin J.A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: mt1, mt2 and mt3/qr2. tissue distribution of mt3/qr2 11Abbreviations: MCA-NAT, methoxy-carbonylamino-N-acetyltryptamine, 2-[125I]-I-MCA-NAT, 2-[125I]-iodomethoxy-carbonylamino-N-acetyltryptamin // *Biochemical Pharmacology*. – 2001. – Vol. 61, № 11. – P. 1369–1379.
250. Viggiano S.R., Koskela T.K., Klee G.G., Samples J.R., Arnce R., Brubaker R.F. The Effect of Melatonin on Aqueous Humor Flow in Humans during the Day // *Ophthalmology*. – 1994. – Vol. 101, № 2. – P. 326–331.
251. Gubin D., Neroev V., Malishevskaya T., Cornelissen G., Astakhov S.Y., Kolomeichuk S., Yuzhakova N., Kabitskaya Y., Weinert D. Melatonin mitigates disrupted circadian rhythms, lowers intraocular pressure, and improves retinal ganglion cells function in glaucoma // *Journal of Pineal Research*. – 2021. – Vol. 70, № 4. – P. e12730.
252. Sugden D., Yeh L.-K., Teh M.-T. Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists // *Reproduction Nutrition Development*. – 1999. – Vol. 39, № 3. – P. 335–344.
253. Alarma-Estrany P., Crooke A., Mediero A., Peláez T., Pintor J. Sympathetic nervous system modulates the ocular hypotensive action of MT 2 -melatonin receptors in normotensive rabbits // *Journal of Pineal Research*. – 2008. – Vol. 45, № 4. – P. 468–475.
254. Fisher S.P., Sugden D. Sleep-promoting action of IIK7, a selective MT2 melatonin receptor agonist in the rat // *Neuroscience Letters*. – 2009. – Vol. 457, № 2. – P. 93–96.
255. Pintor J., Martín L., Pelaez T., Hoyle C.H.V., Peral A. Involvement of melatonin MT3 receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits // *European Journal of Pharmacology*. – 2001. – Vol. 416, № 3. – P. 251–254.
256. Crooke A., Huete-Toral F., Martínez-Águila A., Martín-Gil A., Pintor J. Melatonin and Its Analog 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine Potentiate Adrenergic Receptor-

- Mediated Ocular Hypotensive Effects in Rabbits: Significance for Combination Therapy in Glaucoma // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2013. – Vol. 346, № 1. – P. 138–145.
257. Volkova M.S., Jensen K.C., Lozinskaya N.A., Sosonyuk S.E., Proskurnina M. V., Mesecar A.D., Zefirov N.S. Synthesis of novel MT3 receptor ligands via an unusual Knoevenagel condensation // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2012. – Vol. 22, № 24. – P. 7578–7581.
258. Chesnokova N.B., Beznos O. V., Lozinskaya N.A., Volkova M.S., Zaryanova E. V., Zefirov N.S., Grigoryev A. V. Novel agonists of melatonin receptors as promising hypotensive and neuroprotective agents for therapy of glaucoma // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2017. – Vol. 11, № 3. – P. 272–278.
259. Zaryanova E. V., Lozinskaya N.A., Beznos O. V., Volkova M.S., Chesnokova N.B., Zefirov N.S. Oxindole-based intraocular pressure reducing agents // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 27, № 16. – P. 3787–3793.
260. Ardashirova E. V, Lozinskaya N.A., Sosonyuk S.E., Proskurnina M. V, Zefirov N.S. MT3 Receptor Selective Ligands in the Treatment of Glaucoma : Achievements and Prospects. – 2015. – Vol. 1, № 5. – P. 109–118.
261. Tian J., Li X., Shou T., Li W., Lv H. Enantioselective Synthesis of 3-Hydroxy-2-Oxindoles via Ni-Catalyzed Asymmetric Addition of Aromatic Bromides to α -Ketoamides // *Chemistry - A European Journal*. – 2024. – Vol. 30, № 72. – P. 3–7.
262. Zhang Y., Ye D., Shen L., Liang K., Xia C. Tandem Photoredox-Chiral Phosphoric Acid Catalyzed Radical-Radical Cross-Coupling for Enantioselective Synthesis of 3-Hydroxyoxindoles // *Organic Letters*. – 2021. – Vol. 23, № 18. – P. 7112–7117.
263. Zhao X., Fan H., Xu Y., Liao X., Zhang X. PPh₃-Mediated Synthesis of 3-Hydroxy-2-oxindoles from *o*-Alkynylnitrobenzenes // *Chinese Journal of Organic Chemistry*. – 2023. – Vol. 43, № 11. – P. 3997–4002.
264. Zhao Y., Zhu H., Sung S., Wink D.J., Zdrozny J.M., Driver T.G. Counterion Control of *t*-BuO-Mediated Single Electron Transfer to Nitrostilbenes to Construct *N*-Hydroxyindoles or Oxindoles // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2021. – Vol. 60, № 35. – P. 19207–19213.
265. Wu S., Song W., Zhu R., Hu J., Zhao L., Li Z., Yu X., Xia C., Zhao J. Catalyst-Free α -Alkylation- α -Hydroxylation of Oxindole with Alcohols // *Journal of Organic Chemistry*. – 2022. – Vol. 87, № 9. – P. 5464–5471.

266. He H., Tummalapalli K.S.S., Zhu L., Chen M., Krishnamurthy S., Antilla J.C. Asymmetric Rubottom-Type Oxidation Catalyzed by Chiral Calcium Phosphates // *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. – 2023. – Vol. 29, № 10. – P. e202203720.
267. Zhao S., Yang W., Lan Y., Zhao Y., Xu Y., Liu W., Wang L., Zhou X., Yu C., Guo T., Yuan L., Jia Q., Ren Q. Direct Transition-Metal-Free Enantioselective Hydroxylation: Expedient Access to 3-Functionalized 3-Hydroxy-2-oxindoles // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2024. – Vol. 27, № 11. – P. 1–5.
268. Fernandes F.S., Santos H., Lima S.R., Conti C., Rodrigues M.T., Zeoly L.A., Ferreira L.L.G., Krogh R., Andricopulo A.D., Coelho F. Discovery of highly potent and selective antiparasitic new oxadiazole and hydroxy-oxindole small molecule hybrids // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 201. – P. 112418.
269. de-Andrade S.D., Andrade I.M.G., Castro A., Montenegro Y.M.R., das-Neves-Moreira D., Maia R.A., Martins F.T., Vaz B.G., Franco-dos-Santos G., Lima E. de O., Oliveira N. da R., Farias B.K. da S., Lima-Junior C.G. Deep eutectic solvent co-catalyzed synthesis and antimicrobial activity of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1273. – P. 134323.
270. Sun X., Xiong C., Zhou F., Liang K., Wu C., Rao X., Chen Q. Alkynylation of Isatin Derivatives Catalyzed by a Silver-Chiral Quaternary Ammonium Salt Derived from Quinine // *Journal of Organic Chemistry*. – 2023. – Vol. 88, № 11. – P. 7454–7462.
271. Jiang D., Tang P., Tan Q., Yang Z., He L., Zhang M. Enantioselective Alkynylation of Isatins: A Combination of Metal Catalysis and Organocatalysis // *Chemistry - A European Journal*. – 2020. – Vol. 26, № 68. – P. 15830–15834.
272. He H., Yang Z., Chai Y., Wu R., Chen P., Zhou J., Zhou H. Reversal of Enantioselectivity in the Copper-Aminophenol Sulfonamide Catalyzed Alkynylation of Isatins by Slightly Tuning the Ligand Structure and Basic Additives // *Organic Letters*. – 2021. – Vol. 23, № 15. – P. 5739–5743.
273. Chen J.F., Li C. Cobalt/Bisoxazolinephosphine-Catalyzed Asymmetric Alkynylation of Isatins // *Organic Letters*. – 2020. – Vol. 22, № 12. – P. 4686–4691.
274. Chen Z., Wang L., Tian W., Jin Y., Qin X. Enantioselective organocatalytic Friedel–Crafts reaction of electron-rich phenols and isatins by Takemoto’s thiourea catalyst // *Molecular Diversity*. – 2024. – Vol. 28, № 3. – P. 1733–1742.
275. Reiland K.M., Eckroat T.J. Selective butyrylcholinesterase inhibition by isatin dimers and 3-indolyl-3-hydroxy-2-oxindole dimers // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2022. – Vol. 77. – P. 129037.

276. Guidotti B.B., Da Silva T.S., Menezes Correia J.T., Coelho F. Brønsted-Acid-catalyzed selective Friedel-Crafts monoalkylation of isatins with indolizines in water // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2020. – Vol. 18, № 37. – P. 7330–7335.
277. Wang J., Zhang Q., Li Y., Liu X., Li X., Cheng J.P. Bi(OAc)₃/chiral phosphoric acid catalyzed enantioselective allylation of isatins // *Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 56, № 2. – P. 261–264.
278. Braire J., Macé A., Zaier R., Cordier M., Vidal J., Lalli C., Martel A., Carreaux F. Catalytic Enantioselective Allylboration and Related Reactions of Isatins Promoted by Chiral BINOLs: Scope and Mechanistic Studies // *Journal of Organic Chemistry*. – 2023. – Vol. 88, № 3. – P. 1469–1492.
279. Li F., Liu F.Y., Zhao X., Yin Y., Yu B., Zhang J., Jiang Z. Unified Enantioselective Allylations and Vinylogous Reactions Enabled by Visible Light-Driven Chiral Lewis Acid Catalysis // *ACS Catalysis*. – 2024. – Vol. 14, № 21. – P. 16479–16487.
280. Maiti S., Parui N., Halder J., Dash J. Synthesis of triazole-fused tetracyclic spirooxindole derivatives via metal-free Huisgen cycloaddition // *Chemical Communications*. – 2024. – Vol. 60, № 73. – P. 10009–10012.
281. Hood J.C., Vuong H., Klumpp D.A. Superacid-Promoted synthesis of spirooxindoles // *Tetrahedron Letters*. – 2023. – Vol. 132. – P. 154817.
282. Wei C., Yang X., Shi S., Bai L., Hu D., Song R., Song B. 3-Hydroxy-2-oxindole Derivatives Containing Sulfonamide Motif: Synthesis, Antiviral Activity, and Modes of Action // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 71, № 1. – P. 267–275.
283. Ma X., Fu C., Wang X., Xing X., Wang N., Zhang W. Trypsin-catalyzed aldol reactions of isatins with ketones and the mechanism probe of substrate selectivity by molecular simulations // *Molecular Catalysis*. – 2022. – Vol. 530. – P. 112573.
284. Gambacorta G., Apperley D.C., Baxendale I.R. A One-Pot Divergent Sequence to Pyrazole and Quinoline Derivatives // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 9. – P. 2160.
285. Zhang Y., Nie L.J., Luo L., Mao J.X., Liu J.X., Xu G.H., Chen D., Luo H.Q. The selective condensation of pyrazolones to isatins in aqueous medium // *Tetrahedron*. – 2020. – Vol. 76, № 7. – P. 130916.
286. Elinson M.N., Ryzhkova Y.E., Ryzhkov F. V., Fakhrutdinov A.N. Kojic acid aldol adduct with isatin as inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinase // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 2022. – Vol. 59, № 4. – P. 760–770.
287. Fujita K., Kumazawa I., Yokoi J., Abe K., Takehara T., Suzuki T., Yasukawa N., Nakamura S. Organocatalytic Stereoselective Decarboxylative Addition of α -Amido Malonic Acid Half

- Oxyesters to Isatins // *Advanced Synthesis and Catalysis*. – 2024. – Vol. 366, № 3. – P. 438–443.
288. Dong C.L., Liu H.C., Guan Z., He Y.H. Photoredox-Neutral Radical-Radical Cross-Coupling of Isatins and Benzyl Carboxylic Acids // *Journal of Organic Chemistry*. – 2024. – Vol. 89, № 15. – P. 10929–10938.
289. Lei Z.L., Huang D.K., Liu Q., Chen H.Y., Gao Y.N., Liu J.T., Liu Z.J. Decarboxylative aldol reaction of α,α -difluoro- β -keto acids and isatins: A facile synthesis of 3-difluoroalkyl-3-hydroxyoxindole derivatives // *Journal of Fluorine Chemistry*. – 2022. – Vol. 253. – P. 109930.
290. Ren Q., Huang J., Wang L., Li W., Liu H., Jiang X., Wang J. Highly efficient assembly of 3-hydroxy oxindole scaffold via a catalytic decarboxylative [1,2]-addition strategy // *ACS Catalysis*. – 2012. – Vol. 2, № 12. – P. 2622–2625.
291. Rajeshkumar V., Chandrasekar S., Sekar G. An efficient route to synthesize isatins by metal-free, iodine-catalyzed sequential C(sp³)-H oxidation and intramolecular C-N bond formation of 2'-aminoacetophenones // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2014. – Vol. 12, № 42. – P. 8512–8518.
292. Pratap Reddy Gajulapalli V., Vinayagam P., Kesavan V. Organocatalytic asymmetric decarboxylative cyanomethylation of isatins using l-proline derived bifunctional thiourea // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2014. – Vol. 12, № 24. – P. 4186.
293. Gao H., Luo Z., Ge P., He J., Zhou F., Zheng P., Jiang J. Direct Catalytic Asymmetric Synthesis of β -Hydroxy Acids from Malonic Acid // *Organic Letters*. – 2015. – Vol. 17, № 24. – P. 5962–5965.
294. Zaryanova E. V., Ignatov A.A., Lozynskaya N.A. Synthesis and reactivity of new amide-substituted oxindole derivatives // *Tetrahedron*. – 2017. – Vol. 73, № 49. – P. 6887–6893.
295. Dwivedi K.D., Reddy M.S., Kumar N.S., Chowhan L.R. Facile Synthesis of 3-Hydroxy Oxindole by a Decarboxylative Aldol Reaction of β -Ketoacid and Isatin in WERSA // *ChemistrySelect*. – 2019. – Vol. 4, № 29. – P. 8602–8605.
296. Gao H., Luo Z., Ge P., He J., Zhou F., Zheng P., Jiang J. Direct Catalytic Asymmetric Synthesis of β -Hydroxy Acids from Malonic Acid // *Organic Letters*. – 2015. – Vol. 17, № 24. – P. 5962–5965.
297. Lozynskaya N., Sosonyuk S., Volkova M., Seliverstov M., Proskurnina M., Bachurin S., Zefirov N. Simple Synthesis of Some 2-Substituted Melatonin Derivatives // *Synthesis*. – 2011. – Vol. 2011, № 02. – P. 273–276.
298. Orlandi M., Tosi F., Bonsignore M., Benaglia M. Metal-Free Reduction of Aromatic and Aliphatic Nitro Compounds to Amines: A HSiCl₃-Mediated Reaction of Wide General Applicability // *Organic Letters*. – 2015. – Vol. 17, № 16. – P. 3941–3943.

299. Vasilenko D.A., Averina E.B., Zefirov N.A., Wobith B., Grishin Y.K., Rybakov V.B., Zefirova O.N., Kuznetsova T.S., Kuznetsov S.A., Zefirov N.S. Synthesis and antimutagenic activity of novel 5-aminoisoxazoles bearing alkoxyaryl moieties // *Mendeleev Communications*. – 2017. – Vol. 27, № 3. – P. 228–230.
300. Liang Q.-X., Liao L., Luo J., Pu S., Wang Y.-L., Chen T. Synthesis and Antibacterial Activity of 1,5-Disubstituted Indolin-2-one Derivatives Containing Sulfonamides // *Asian Journal of Chemistry*. – 2015. – Vol. 27, № 8. – P. 2959–2963.
301. Lin S.-Y., Yeh T.-K., Kuo C.-C., Song J.-S., Cheng M.-F., Liao F.-Y., Chao M.-W., Huang H.-L., Chen Y.-L., Yang C.-Y., Wu M.-H., Hsieh C.-L., Hsiao W., Peng Y.-H., Wu J.-S., Lin L.-M., Sun M., Chao Y.-S., Shih C., Wu S.-Y., Pan S.-L., Hung M.-S., Ueng S.-H. Phenyl Benzenesulfonylhydrazides Exhibit Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibition with Potent in Vivo Pharmacodynamic Activity and Antitumor Efficacy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59, № 1. – P. 419–430.
302. Liu W., Zhu H.-M., Niu G.-J., Shi E.-Z., Chen J., Sun B., Chen W.-Q., Zhou H.-G., Yang C. Synthesis, modification and docking studies of 5-sulfonyl isatin derivatives as SARS-CoV 3C-like protease inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 22, № 1. – P. 292–302.
303. Lee D., Long S.A., Murray J.H., Adams J.L., Nuttall M.E., Nadeau D.P., Kikly K., Winkler J.D., Sung C.-M., Ryan M.D., Levy M.A., Keller P.M., DeWolf W.E. Potent and Selective Nonpeptide Inhibitors of Caspases 3 and 7 // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2001. – Vol. 44, № 12. – P. 2015–2026.
304. Chu W., Rothfuss J., Chu Y., Zhou D., Mach R.H. Synthesis and in Vitro Evaluation of Sulfonamide Isatin Michael Acceptors as Small Molecule Inhibitors of Caspase-6 // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52, № 8. – P. 2188–2191.
305. Lawrence H.R., Pireddu R., Chen L., Luo Y., Sung S.-S., Szymanski A.M., Yip M.L.R., Guida W.C., Sebt S.M., Wu J., Lawrence N.J. Inhibitors of Src Homology-2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 (Shp2) Based on Oxindole Scaffolds // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51, № 16. – P. 4948–4956.
306. Krymov S.K., Scherbakov A.M., Salnikova D.I., Sorokin D. V., Dezhenkova L.G., Ivanov I. V., Vullo D., De Luca V., Capasso C., Supuran C.T., Shchekotikhin A.E. Synthesis, biological evaluation, and in silico studies of potential activators of apoptosis and carbonic anhydrase inhibitors on isatin-5-sulfonamide scaffold // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 228. – P. 113997.
307. Armarego W.L.F., Chai C.L.L. Purification of Laboratory Chemicals // *Purification of Laboratory Chemicals*. 6th Edition. Oxford: Elsevier Inc. 2009. — 743 p.

308. Zaryanova E. V., Lozinskaya N.A., Beznos O. V., Volkova M.S., Chesnokova N.B., Zefirov N.S. Oxindole-based intraocular pressure reducing agents // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 27, № 16. – P. 3787–3793.
309. Kamal A., Babu K.S., Vishnu Vardhan M.V.P.S., Hussaini S.M.A., Mahesh R., Shaik S.P., Alarifi A. Sulfamic acid promoted one-pot three-component synthesis and cytotoxic evaluation of spirooxindoles // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 25, № 10. – P. 2199–2202.
310. Gao M., Luo Y., Xu Q., Zhao Y., Gong X., Xia Y., Hu L. A Unified Catalytic Asymmetric (4+1) and (5+1) Annulation Strategy to Access Chiral Spirooxindole-Fused Oxacycles // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2021. – Vol. 60, № 36. – P. 19813–19820.
311. Zaryanova E. V., Lozinskaya N.A., Beznos O. V., Volkova M.S., Chesnokova N.B., Zefirov N.S. Oxindole-based intraocular pressure reducing agents // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 27, № 16. – P. 3787–3793.
312. Marcus A.J., Iezhitsa I., Agarwal R., Vassiliev P., Spasov A., Zhukovskaya O., Anisimova V., Mohd Ismail N. Data on the effects of imidazo [1,2-a]benzimidazole and pyrimido [1,2-a]benzimidazole compounds on intraocular pressure of ocular normotensive rats // *Data in Brief*. – 2018. – Vol. 18. – P. 523–554.
313. Runtsch L.S., Barber D.M., Mayer P., Groll M., Trauner D., Broichhagen J. Azobenzene-based inhibitors of human carbonic anhydrase II // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – Vol. 11. – P. 1129–1135.
314. Bachurin S.O., Shevtzova E.P., Lermontova N.N., Serkova T.P., Ramsay R.R. The effect of dithiocarbamates on neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) and on mitochondrial respiration chain. // *Neurotoxicology*. – 1996. – Vol. 17, № 3–4. – P. 897–903.
315. Åkerman K.E.O., Wikström M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential // *FEBS Letters*. – 1976. – Vol. 68, № 2. – P. 191–197.