

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ефремов Александр Михайлович

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

Специальность 1.4.16. Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2026

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

Научный **Лозинская Наталья Александровна**

руководитель: кандидат химических наук

Официальные **Аверин Алексей Дмитриевич**

оппоненты:

доктор химических наук,

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра органической химии, ведущий научный сотрудник

Злотский Семен Соломонович

доктор химических наук, профессор,

Уфимский государственный нефтяной технический университет, Высшая школа информационных и социальных технологий, кафедра общей, аналитической и прикладной химии, заведующий кафедрой

Грин Михаил Александрович

доктор химических наук, профессор,

МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, кафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского, заведующий кафедрой

Защита состоится «05» июня 2026 г. в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, аудитория 446.

E-mail: 7422990@mail.ru (ученый секретарь)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3925>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.7,
кандидат химических наук

Н.А. Синикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение посвящено рассмотрению актуальности, научной новизны и практической значимости работы, а также в нем сформулированы цель и основные задачи работы.

Обзор литературы посвящен глаукоме, основным классам антиглаукомных препаратов и недавним исследованиям в области создания новых соединений для терапии глаукомы.

Результаты и их обсуждение

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

Ранее нашей научной группой некоторые 3-гидрокси-2-оксиндолы уже были получены с помощью реакции изатиннов с циануксусной и малоновой кислотами в присутствии триэтиламина в диоксане или в смеси пиридина с пиперидином с хорошими выходами. 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.

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 (рис. 1, табл. 1). Состав реакционных смесей оставался неизменным для каждого из двух методов.



Рисунок 1. Синтез 3-гидрокси-2-оксиндолов 2a-i и 3a-i методами термической или микроволновой активации

Таблица 1. Выходы 3-гидрокси-2-оксиндолы **2a-i** и **3a-i**, полученных методами термической или микроволновой активации

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

*МА – микроволновая активация; †ТА – термическая активация

1.2. Синтез 3-замещенных 2-оксиндолы без гидрокси-группы

Как было сказано выше, в нашей научной группе уже было получено несколько биологически активных 2-оксиндолы, как с гидрокси-группой в 3 положении оксиндольного цикла, так и без неё. Однако, полученные данные не позволяют однозначно судить о том, способствует ли гидрокси-группа усилению биологического отклика 3-замещенных 2-оксиндолы и увеличению их аффинности к NQO2. Поэтому по описанной ранее методике нами были получены 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолы, не содержащие 3-гидрокси-группу (рис. 2, табл.2).

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 гидролизуетея до кислоты. Этот эффект был использован для получения 3-карбоксиметил-2-оксиндолы **7c** и **7d**.

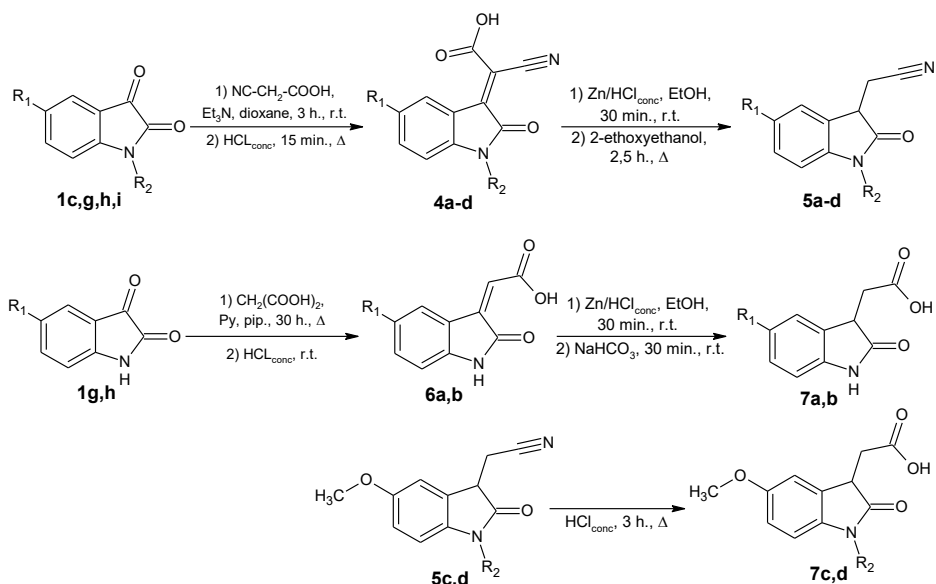


Рисунок 2. Синтез 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **5a-d** и **7a-d**

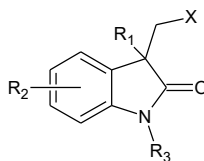
Таблица 2. Выходы 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов **5a-d** и **7a-d**

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

1.3. Исследование биологической активности 3-цианометил и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов

Поскольку ранее в нашей научной группе 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* (табл. 3). Изучение ингибирующей активности по отношению к ферменту хинонредуктаза 2 (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. 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†
2c	CN	OH	5-OCH ₃	н/т	3,88
2f	CN	OH	5,7-NO ₂	-9,23	1,13
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
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*
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

Из анализа таблицы 3 можно сделать вывод, что 2-оксиндолы с 3-цианометильной группой, в среднем, способствуют лучшему биологическому отклику, чем их аналоги с 3-карбоксиметильной группой.

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

1.4. Синтез и биологическая активность 5-арил-замещенных 3-гидрокси-2-оксиндолов

Для проверки выдвинутых гипотез было принято решение синтезировать серию 5-арил-замещенных 3-гидрокси-3-цианометил- и 3-карбоксиметил-2-оксиндолов вышеописанным экспресс-методом (рис. 3, табл. 4). Исходные 5-арил-замещенные изатины (**1j-p**) были любезно предоставлены к.х.н., доцентом Куркиным А.В. и к.х.н. Ивановым В.Н.

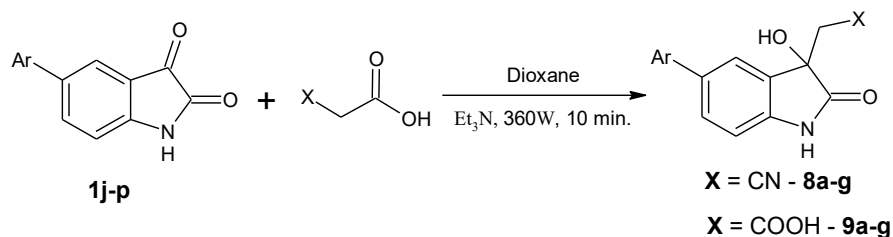


Рисунок 3. Синтез 5-арил-замещенных 2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g**

Таблица 4. Выходы 5-арил-замещенных 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				

Результаты молекулярного моделирования взаимодействия 2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g** с ферментом NQO2 были многообещающими, однако оказалось, что введение объемного гидрофобного фрагмента в пятое положение 2-оксиндольного цикла привело к значительному ухудшению растворимости соединений в фосфатном буферном растворе. Этот факт сильно

ограничил возможность тестирования полученных соединений *in vitro* на ферменте NQO2 и *in vivo* на нормотензивных кроликах.

Способность снижать ВГД показали только соединения **8d** (2,00 мм.рт.ст.) и **8f** (1,40 мм.рт.ст.), остальные соединения оказались нерастворимы. Кроме того, максимальная степень ингибирования фермента NQO2 при концентрации 10 мкМ составила 21,68% (для соединения **8с**), что свидетельствует об отсутствии значимой ингибирующей активности у всех синтезированных соединений в отношении данной мишени.

1.5. Синтез амин-замещенных 2-оксиндолов

Исходя из предположения, что низкая биологическая активность полученных 5-арил-замещенных 2-оксиндолов **8a-g** и **9a-g** объясняется слабой растворимостью соединений и ограниченной подвижностью арильной группы в 5 положении, было решено ввести арильный заместитель через линкер, способный повысить гидрофильность соединения.

Наиболее удобным способом восстановления 5-нитро-оксиндола оказалась классическая реакция цинком в соляной кислоте. С её помощью был получен 5-амино-3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндол **10a** с относительно высоким выходом (рис. 4).

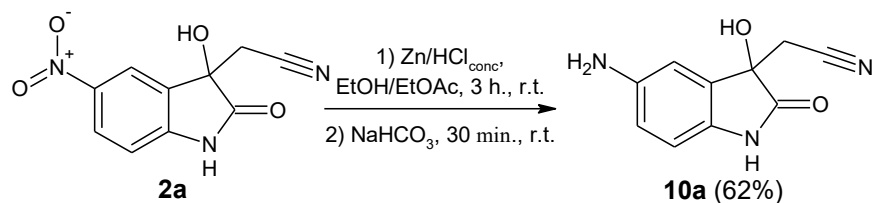


Рисунок 4. Восстановление 3-гидрокси-5-нитро-3-цианометил-2-оксиндола **2a** цинком в соляной кислоте

Аналогичная методика, описанная ранее в работах нашей научной группы, была применена для получения 5-амино-3-цианометил-2-оксиндола **10b** (рис. 5).

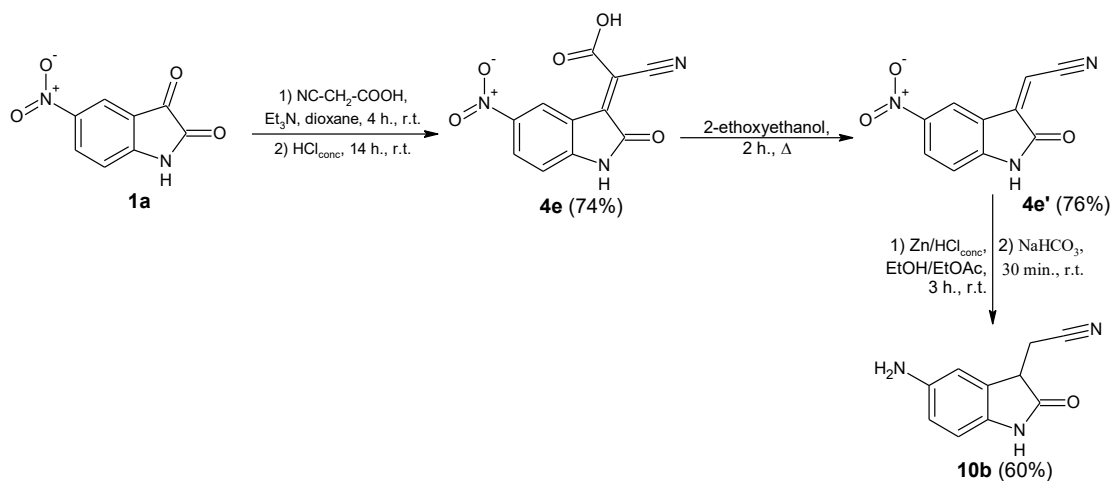


Рисунок 5. Конденсация 5-нитроизатина **1a** с циануксусной кислотой и восстановление продукта цинком в серной кислоте

Таблица 5. Структуры и выходы продуктов восстановительного аминирования 5-амино-оксиндолов **10a-c**

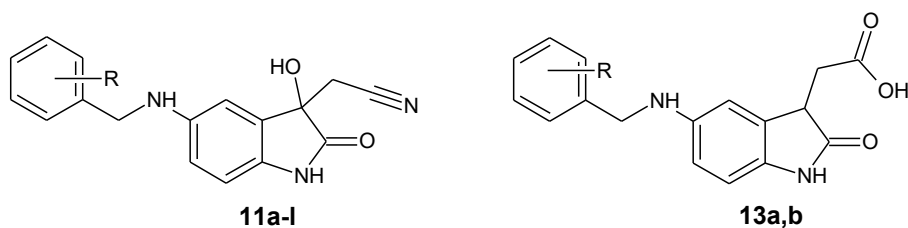
№	R ₂	Выход, %	№	R ₂	Выход, %
11a	2-OMe	81	11g	4-OMe	51
11b	4-Cl	72	11h	2,4-OMe	66
11c	4-F	58	11i	2,5-OMe	79
11d	4-пиридинил	66	11j	2,3,4-OMe	76
11e	4-OH	49	11k	3,4,5-OMe	64
11f	4-N(Me) ₂	55	11l	2,5-OMe, 4-OH	46
12a	2-OMe	71	12d	4-OH	57
12b	4-Cl	69	12e	4-OMe	54
12c	2,5-OMe	48			
13a	2-OMe	41	13b	4-Cl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

1.7. Исследование биологической активности 5-арилметиламин-замещенных 2-оксиндолов

В исследованиях *in vivo* была оценена способность полученных соединений снижать ВГД нормотензивных кроликов, а в исследованиях *in vitro* – способность ингибировать NQO2 (табл. 6). Все 3-цианометил-2-оксиндолы без гидроксигруппы (**12a-e**) и 3-гидрокси-3-цианометил-2-оксиндол **11i** оказались нерастворимы в фосфатном буферном растворе.

Наибольший гипотензивный эффект продемонстрировало соединение **11c**, 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. Таким образом, можно считать окончательно доказанной отсутствие корреляции между гипотензивным эффектом и взаимодействием с NQO2. Поэтому было выдвинуто предположение, что полученные нами оксиндолы снижают ВГД, действуя не через мелатониновый рецептор третьего подтипа, как считалось ранее, а через другую, пока неизвестную мишень.

Таблица 6. 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

Для выявления нейропротекторных и антиоксидантных свойств полученных соединений было исследовано их влияние на Fe²⁺-индуцированное перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенате мозга крыс, а также была оценена их способность к связыванию DPPH-радикалов (табл. 7). Исследования проводились совместно с группой д.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка).

Таблица 7. 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/г*
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/г – не тестировались

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

Введение amino-группы положительно сказалось на растворимости соединений в воде, однако арильный фрагмент в 5 положении цикла, по всей видимости, не способствует 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. Кроме того, введение сульфонамидной фармакофорной группы может заметно увеличить аффинность 2-оксиндолов к карбоангидразам, что позволит получить соединения-лидеры для создания мультитаргетных антиглаукомных препаратов.

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

Первым шагом к синтезу 5-сульфонамидных производных 3-гидрокси-2-оксиндолов стало сульфохлорирование изатинов **1h** и **1q** в пятое положение цикла (рис. 8).

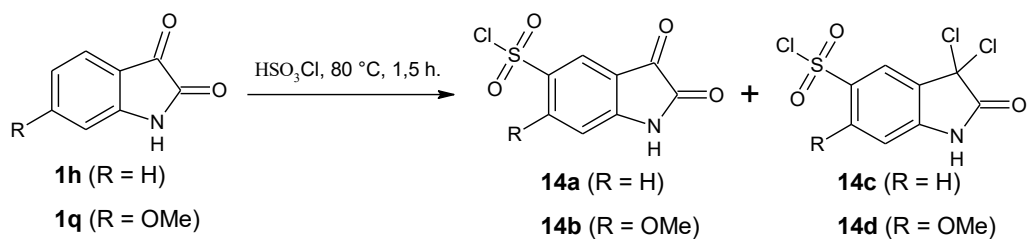


Рисунок 8. Сульфохлорирование изатинов **1h** и **1q**

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). В данной работе полученная смесь **14a+14c** 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 (рис. 9, табл. 8).

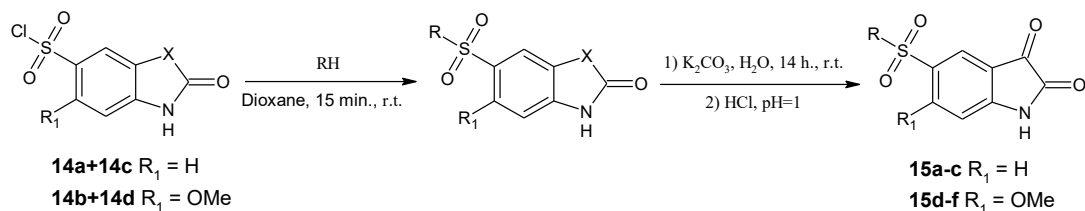


Рисунок 9. Синтез 5-сульфонамидизатинов **15a-f**

Таблица 8. 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**.

В результате реакции смесей **14a+14c** или **14b+14d** с двукратным избытком соответствующего вторичного амина и последующего *one-pot* гидролиза, образуются целевые сульфонамид-замещенные изатины **15a-c** (из смеси **14a+14c**) или **15d-f** (из смеси **14b+14d**).

Для получения 5-аминосульфонизатина **15g** 5-сульфохлоридизатин **14a** был введен в реакцию с газообразным аммиаком в дихлорметане (рис. 10).

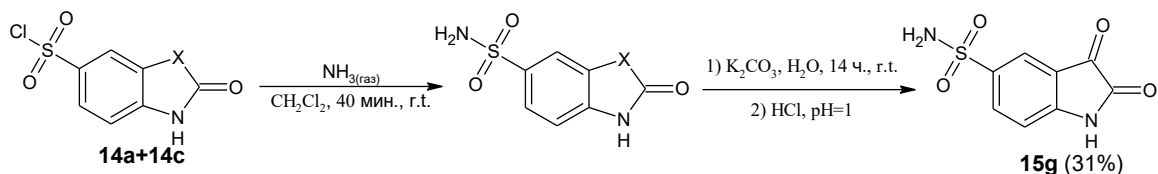


Рисунок 10. Синтез *N*-незамещенного 5-сульфонамидизатина

В результате нами был получен продукт **15g** с суммарным выходом 31% по трем стадиям, начиная с незамещенного изатина **1h**, причем суммарный выход превышает литературный.

На заключительной стадии проводили конденсацию полученных 5-сульфонмидизатинов **15a-g** с циануксусной и малоновой кислотами, по рассмотренным выше методикам (рис. 11, табл. 9).

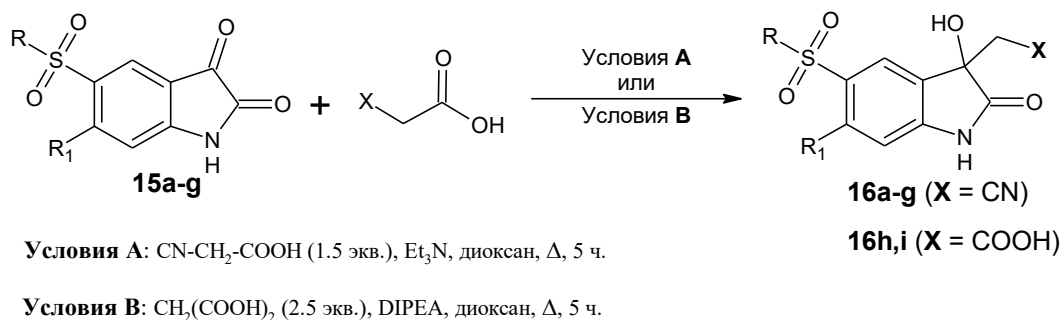


Рисунок 11. Конденсация 5-сульфонамидизатинов **15a-g** с циануксусной и малоновой кислотами

Таблица 9. 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	6-OMe	Et ₂ N-	CN	70
16b	H		CN	76	16e	6-OMe		CN	66
16c	H		CN	77	16f	6-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 для достижения 100% конверсии требовалось использование более сильного основания (DIPEA вместо Et₃N).

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

Далее 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. Также были проведены исследования *in vitro*, направленные на изучение ингибирующей активности этих соединений в отношении СА II. Для выявления антиоксидантных и нейропротекторных свойств было изучено влияние полученных соединений на процессы перекисного окисления липидов, а для

комплексной оценки их безопасности дополнительно проанализировали митохондриальную и клеточную токсичность соединений.

1.10.1 Изучение влияния на внутриглазное давление *in vivo*

Исследование гипотензивного действия проводилось на серии 2-оксиндолов **16a-c,g**, что дало возможность проанализировать влияние заместителя в 5 положении оксиндольного цикла на снижение внутриглазного давления (рис. 12, табл. 10). Для оценки резорбтивного эффекта раствор тестируемого соединения инстиллировали только в правый глаз подопытных крыс, тогда как левый глаз служил контролем. Исследование выполнено в сотрудничестве с д.б.н. Науменко Л.В. (ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Волгоград).

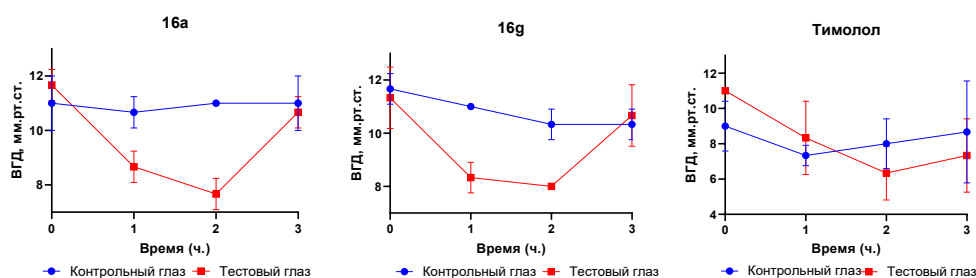


Рисунок 12. Зависимость снижения ВГД у крыс от времени и изучение резорбтивного эффекта

Таблица 10. Максимальное снижение ВГД у крыс после инстилляции 0,4% раствора соединений **16a-c,g**

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

Среди исследованных соединений вещество **16a** продемонстрировало статистически значимую гипотензивную активность, превышающую эффект тимолола. 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.

Далее была выполнена оценка гипотензивной активности соединений **16a-i** на нормотензивных кроликах (табл. 11).

Таблица 11. Максимальное снижение ВГД после инстилляции 0,1%-ного раствора соединений **16a-i**

№	Δ ВГД _{макс.} , %	Δ ВГД _{макс.} , мм. рт. ст.
16a	16,79	2,05
16b	14,62	1,20
16c	16,20	3,50
16d	н/р*	н/р
16e	18,75	0,60
16f	17,20	3,70
16g	6,82	2,13
16h	14,36	1,90
16i	21,93	2,50
Тимолол (0,5%)	18,18	2,63
Дорзоламид (2%)	16,07	2,25

* н/р – нерастворимы в фосфатном буферном растворе

Наибольшую гипотензивную активность продемонстрировали соединения **16c** (3,50 мм.рт.ст.) и **16f** (3,70 мм.рт.ст.), причем их показатели существенно превышают гипотензивный эффект референсных препаратов.

1.10.2 Изучение биологической активности *in vitro*

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) (табл. 12). Исследование выполнено совместно с группой д.х.н. Е.Ф. Шевцовой (ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка).

Таблица 12. Влияние 3-гидрокси-5-сульфонамид-2-оксидолов 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. К сожалению, корреляция между способностью соединений взаимодействовать с hCA II и их гипотензивным действием не наблюдалось.

Результаты исследований на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y с использованием МТТ-теста продемонстрировали отсутствие статистически значимой цитотоксичности у большинства соединений даже при максимальной тестируемой концентрации 100 мкМ. Исключение составило соединение **16c**, которое в данной концентрации вызывало достоверное снижение дегидрогеназной активности клеток на 16%, что может указывать на его умеренное цитотоксическое действие.

Антиоксидантную активность определяли по способности соединений подавлять Fe²⁺-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.

Результаты изучения влияния соединений на митохондриальный потенциал в изолированных митохондриях печени крыс 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.

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, 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты
в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук:

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. – 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, № 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*. – 2025. – Vol. 20, № 10. – 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., 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. – EDN HVIWCN. Импакт-фактор 0.305 (SJR). Объем 1,02 п.л. Личный вклад автора 30%.]