

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Базанов

Базанов Даниил Романович

**2,4,5-Триарилимидазолины: синтез, реакционная способность и
биологическая активность**

1.4.16 – медицинская химия

1.4.3 – органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук
Лозинская Наталья Александровна

Москва – 2022

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ	2
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
2.1. Белок-белковое взаимодействие p53-MDM2 как терапевтическая мишень	12
2.1.1. p53 как страж генома	12
2.1.2. MDM2 как основной регулятор p53	14
2.1.3. Основные ингибиторы p53-MDM2/MDMX взаимодействия	18
2.1.4. Особенности связывания имидазолиновых производных с MDM2.	
Молекулярный уровень.	21
2.1.5. Клеточный уровень: цитотоксичность имидазолиновых производных	27
2.1.6. Особенности применения ингибиторов имидазолинового типа. Доклинические испытания.	28
2.1.7. Клинические испытания нутлинов	34
2.2. Синтез производных имидазолинов	36
2.2.1. Синтетическая стратегия получения имидазолиновых производных семейства нутлинов	36
2.2.2. Синтез вицинальных диаминов с одновременным введением двух амино групп	37
2.2.3. Синтез диаминов: введение одной амино группы	39
2.2.4. Синтез диаминов из азотсодержащих соединений	41
2.2.5. Синтез диаминов с образованием новой C ₁ -C ₂ связи	43
2.2.6. Синтез имидазолинов из вицинальных диаминов	47
2.2.7. Модификация имидазолинов по атому азота в синтезе производных нутлина	48
2.2.8. Модификация вицинального диамина с последующим замыканием имидазолинового цикла	50
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	52
3.1. Разработка методологии синтеза новых производных <i>цис</i> -2,4,5-триарилимидазолинов	52
3.1.1. Синтез алкокси-замещенных <i>цис</i> -2,4,5-триарилимидазолинов	52
3.1.2. Модификация 2,4,5-(гидроксифенил)имидазолинов	56
3.1.3. Антиоксидантная активность имидазолинов	58
3.1.4. Электрохимическое исследование свойств гидроксид-имидазолинов	59
3.1.5. Молекулярное моделирование взаимодействия имидазолинов с активным сайтом MDM2	61
3.1.6. Изучение биологической активности <i>цис</i> -2,4,5-триарилимидазолинов	62
3.1.7. Молекулярное моделирование взаимодействия сульфонамидных и карбамоильных производных имидазолинов с MDM2 и MDMX	68
3.1.8. Синтез <i>N</i> -сульфозамещенных <i>цис</i> -2,4,5-(алкоксифенил)имидазолинов	71
3.1.9. Синтез карбамоил-замещенных <i>цис</i> -2,4,5-триарилимидазолинов	73
3.1.10. Синтез новых 2-замещенных производных алкокси-имидазолинов	74
3.1.11. Восстановление 2,4,5-триарилимидазолинов металлическим натрием	75
3.1.12. Сборка имидазолинового цикла с новым типом замещения по положению 2	78

3.2. Биологическая активность замещенных 2,4,5-триарилимидазолиновых производных	80
3.3.1. Биологическая активность сульфонамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов	80
3.3.3. Биологическая активность карбамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов	83
5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	90
5.1. Органический синтез	90
5.1.1. Синтез незамещенных 2,4,5-триарилимидазолинов (3a-ad)	90
5.1.2. Синтез дихлорацетил производных 2,4,5-триарилимидазолинов (3s, ' 3u')	98
5.1.3. Синтез сульфосоилхлоридов (a-e)	99
5.1.4. Синтез сульфонамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов (4a-l)	100
5.1.5. Синтез производных карбамидов 2,4,5-триарилимидазолинов (серия 5a-aa)	104
5.1.6. Восстановление 2,4,5-триарилимидазолинов натрием	114
5.1.7. Синтез и модификация несимметричного 2,4,5-триарилимидазолина	118
5.2. Антиоксидантная активность	119
5.2.1. Метод хемилюминесценции (модельная система гемоглобин-люминол-H ₂ O ₂).	119
5.2.2. Спектрофотометрические измерения (тест ДФПГ).	120
5.2.3. Электрохимические измерения	120
5.3. Биологические испытания	121
5.3.1. Определение антипролиферативных свойств (МТТ-тест)	121
5.3.2. Вестерн-блот анализ	121
5.3.3. Анализ сортировки клеток, активируемый флуоресценцией (FACS-анализ)	123
5.3.4. Тест Sub-G1	123
5.4. Расчетные методы	123
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
7. ВЫВОДЫ	126
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

Список сокращений

д – дублет

дд – дублет дублетов

кб – килобаза

кв – квадруплет

м – мультиплет

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

мХЛЛ - мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ - острый миелодный лейкоз

с – синглет

т – триплет

ТГФ – тетрагидрофуран

ТМС – тетраметилсилан

ХЛЛ - хронический лимфобластный лейкоз

ХМЛ – хронический миелодный лейкоз

уш – уширенный

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

A549 – клеточная линия рака лёгких.

Ape/ref-1 - апуриновая (апиримидиновая) эндонуклеаза/редокс-фактор 1

ATM – мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок

ATR - атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок

BAH – Bcl2-ассоциированный X протеин

Bcl2 - (B-cell lymphoma 2) – регулятор апоптоза

CDK – циклин-зависимая киназа

CDKN1A - ингибитор циклин-зависимой киназы 1A

CHK1 – Киназа контрольной точки 1

CHK2 - Киназа контрольной точки 2

H460 – клеточная линия рака лёгких

HCT116 – клеточная линия колоректального рака

HRMS – масспектрометрия высокого разрешения

LNCaP – клеточная линия рака предстательной железы

MDA-MB-435 – клеточная линия меланомы

MDM2 – (Mouse double minute 2 homolog) - Убиквитин-протеинлигаза E3, являющаяся негативным регулятором белка p53

MDM4 - (Mouse double minute 4 homolog) - Убиквитин-протеинлигаза E3, являющаяся негативным регулятором белка p53

MNM – клеточная линия остеосаркомы

MTBP – MDM2 связывающий белок

Nbs1- Nijmegen breakage syndrome 1 protein – участвует в репарации двуниевых разрывов

Numb - endocytic adaptor protein - Задействован в нейрогенезе и альтернативном сплайсинге

p53 - transformation-related protein 53 – связанный с трансформацией белок 53

p73 - tumor protein 73 (TP73) – опухолевый протеин 73

PI3K - Фосфоинозитид-3-киназы

PUMA – (p53 upregulated modulator of apoptosis) —проапоптотический белок семейства Bcl-2.

RKO – клеточная линия карциномы толстой кишки

SJSA1 – клеточная линия остеосаркомы

SH-SY5Y – клеточная линия нейробластомы

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз.

WT – клетки дикого типа

NMR – в контексте - титрометрия с ядерным магнитным резонансом

FP – в контексте - метод поляризационной флюоресценции

TR-FRET – в контексте - метод фёрстеровского переноса энергии

SPR – в контексте - метод плазмонного резонанса

SP - в контексте - спектрофотометрический метод

MCF-7 - клеточная линия аденокарциномы протоков молочной железы человека

1. Введение

Актуальность темы исследования. Фрагмент имидазолина часто встречается в биологически активных веществах, в том числе в уже имеющихся на рынке лекарственных препаратах. Так, например, среди производных родоначальника класса имидазолинов - 2-замещенного имидазолина - можно выделить агонисты адренорецепторов α_1 и α_2 , которые имеют широкий спектр применения от снятия отека носа при насморке до снижения артериального и внутриглазного давления. Значительно меньше данных существует о биологической активности 4,5-замещенных производных имидазолина. Связано это с меньшей доступностью соответствующих вицинальных этилендиаминов, служащих исходными соединениями для синтеза данных имидазолинов. Кроме того, для подобных производных имидазолинов возможна *цис-транс*-изомерия, осложняющая выделение изомеров в чистом виде и их дальнейшую модификацию. В то же время потребность именно в диастереомерно чистых производных значительно возросла после того, как было обнаружено, что некоторые *цис*-2,4,5-триарилимидазолины – нутлины - способны индуцировать апоптоз в раковых клетках за счет ингибирования белок-белкового MDM2-p53 взаимодействия. Проявляя высокую селективность по отношению к раковым клеткам в сравнении с нормальными, данные имидазолины были особенно эффективны в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами, снижая их необходимую дозировку и тем самым уменьшая сопутствующие стандартной противораковой терапии побочные эффекты. Однако, внедрению нутлинов в клиническую практику мешает их низкая растворимость в воде, отчасти связанная с наличием атомов галогена в их структуре. Поэтому разработка новых методов синтеза производных 2,4,5-триарилимидазолинов, обладающих повышенной растворимостью в воде и сохраняющих целевую биологическую активность, является актуальной задачей как органической, так и медицинской химии.

Степень разработанности темы диссертации. В литературе описан ряд синтетических подходов к получению замещенных имидазолинов, в том числе и обладающих противораковой активностью. В диссертационной работе представлен обзор литературы, посвященный ингибиторам p53-MDM2 взаимодействия и их синтезу. Особое внимание уделено методам стереоселективного синтеза производных имидазолинов и выявлено, что существующие варианты стереоселективной сборки 2,4,5-триарилимидазолинового каркаса предполагают в основном алкильные группы и галогены в качестве заместителей. Поэтому синтез и изучение биологической активности потенциально водорастворимых 2,4,5-триарилимидазолинов, содержащих гидрофильные группы, такие как гидроксильные и алкокси-группы, является актуальной задачей, требующей дополнительного исследования и разработки.

Целью настоящей работы является разработка препаративно удобного метода получения *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов и изучение их реакционной способности, а также

направленный синтез производных имидазолинов с антиоксидантной и противораковой активностью и потенциально улучшенной водорастворимостью. В соответствии с данной целью в работе были поставлены следующие задачи:

- разработать препаративный метод синтеза разнообразных алкокси-производных 2,4,5-триарилимидазолинов и изучить их антиоксидантную и противораковую активность с целью выявления наиболее удачной модификации с целевыми свойствами;
- изучить реакционную способность заместителей в арильных кольцах 2,4,5-трис(алкоксиарил)имидазолинов с целью изучения возможности их дальнейшей направленной модификации;
- разработать препаративный метод *N*-сульфонилзамещенных 2,4,5-трис(арил)имидазолинов и изучить их влияние на уровень p53 в раковых клетках и цитотоксичность;
- разработать препаративный метод *N*-карбамоилзамещенных 2,4,5-трис(арил)имидазолинов и изучить их влияние на уровень p53 в раковых клетках и цитотоксичность;
- изучить возможность восстановительного раскрытия имидазолинового кольца в новых производных *цис*-2,4,5-трис(арил)имидазолинов с целью разработки подхода к синтезу труднодоступных *эритро*-1,2-диарил-1,2-этилендиаминов;

Объект и предмет исследования.

Объектом исследования являются *цис*-2,4,5-трис(арил)имидазолины, предметом исследования является их биологическая активность, антиоксидантные свойства и реакционная способность.

Методология и методы исследования

Для подтверждения состава и структуры соединений в работе использованы разнообразные физико-химические методы анализа, в том числе спектральные методы, такие как ЯМР спектроскопия на ядрах ^1H и ^{13}C , масс-спектрометрия (EI и масс-спектрометрия высокого разрешения HRMS-ESI) и элементный анализ. Исследование антиоксидантных свойств проводили спектрофотометрически и электрохимически с помощью циклической вольтамперометрии. Цитотоксичность оценивали на клеточных линиях рака человека спектрофотометрически с использованием МТТ-теста. Изменение уровня p53 и других ключевых белков оценивали с помощью вестерн-блот анализа. Анализ гибели клеток под действием соединений проводили с использованием проточной цитометрии. Достоверность полученных результатов подтверждается их систематической воспроизводимостью.

Научная новизна.

Разработан синтетический подход к новым производным 2,4,5-трис(арил)имидазолинов, содержащим алкокси- и гидроксигруппы в арильных кольцах. Показано, что гидроксипроизводные имидазолины обладают выраженными антиоксидантными свойствами, но не проявляют цитотоксичности по отношению к раковым клеткам, в то время как алкокси-

производные 2,4,5-трис(арил)имидазолинов способны стабилизировать уровень белка p53 и p53-зависимых белков в раковых клетках, провоцируя их гибель по апоптотическому пути в микромолярном диапазоне концентраций. Таким образом, впервые показано, что наличие галогенов в арильных кольцах в положениях 4 и 5 имидазолина не является исключительно необходимым для повышения уровня p53 в раковых клетках, экспрессирующих p53 дикого типа, что открывает путь к созданию новых производных нутлинов, обладающих целевой противораковой активностью, но при этом значительно лучше растворимых в воде, чем существующие аналоги.

Изучено влияние дополнительной модификации атома азота в 2,4,5-трис(арил)имидазолиновом цикле на биологическую активность и растворимость соединений в воде. Показано, что и сульфониламидная, и карбамоильная модификации обеспечивают стабилизацию уровня p53 и улучшают растворимость имидазолинов в воде, но карбамоильная модификация является предпочтительной из-за большей стабильности данных соединений.

Показано, что полученные имидазолины под действием натрия претерпевают восстановительное раскрытие цикла и, в зависимости от условий, могут давать в качестве основного продукта как 1,2-диарил-1,2-этилендиамины, так и замещенные дибензиламины.

Теоретическая и практическая значимость.

Разработан удобный синтетический подход к ранее неизвестным 2,4,5-трис(арил)имидазолинам, обладающим противораковой и антиоксидантной активностью на основе производных, содержащих алкокси- и гидроксигруппы, соответственно. Впервые показано, что замена атомов галогена в арильных заместителях имидазолинового цикла на алкоксигруппы не приводит к потере способности соединений стабилизировать уровень p53 в раковых клетках, экспрессирующих белок p53 дикого типа, но при этом значительно повышает растворимость производных имидазолинов в воде. Этот факт является важным при создании лекарственных средств и может быть использован при разработке противораковых препаратов класса нутлинов нового поколения. Рассмотрено 2 варианта модификации атома азота имидазолинового цикла, изучена зависимость «структура-свойство» и выявлено, что несмотря на то, что обе модификации позволяют увеличить растворимость производных в воде и повысить уровень p53 и p53-зависимых белков в клетке, и использование карбамоильной модификации является предпочтительной из-за ее большей стабильности. Продемонстрирована разница в реакционной способности алкокси и гидроксизаместителей в арильных кольцах в положениях 2 и 4,5 для 2,4,5-трис(арил)имидазолинов, что открывает путь к их селективной модификации. Разработан метод восстановительного раскрытия имидазолинового цикла под действием металлического натрия, позволяющий получить в зависимости от условий как замещенные дибензиламины, так и 1,2-диарилэтилендиамины с препаративными выходами. Визуальные

диамины такого типа являются труднодоступными соединениями, в то же время потребность в них высока, т.к. они могут быть использованы не только в синтезе разнообразных биологически активных соединений, но и в качестве лигандов при катализе переходными металлами (например, таких как селен-комплексы).

Положения, выносимые на защиту

- Препаративный синтез алкокси-производных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов может быть осуществлен по реакции ароматических альдегидов с газообразным аммиаком в тетрагидрофуране с последующим *one-pot* дисротаторным замыканием цикла в образующемся тримере под действием сильного основания.

- Имидазолиновый цикл оказывает существенное влияние на реакционную способность заместителей в арильных кольцах *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов, причем наибольшее отличие наблюдается при расположении заместителей в *орто*- и *пара*-положениях к имидазолиновому циклу. Алкокси и гидроксигруппы в арильных кольцах в положениях 4 и 5 имидазолина обладают большей нуклеофильностью, чем подобные группы в кольце в положении 2, что позволяет проводить их селективные модификации.

- Восстановительное раскрытие имидазолинового цикла под действием натрия в зависимости от условий реакции приводит как к производным 1,2-диарил-1,2-этилендиаминов, так и замещенным дибензиламинам.

- *Цис*-2,4,5-триарилимидазолины, содержащие гидроксигруппы, обладают выраженной антиоксидантной активностью, но не проявляют цитотоксичности по отношению к раковым клеткам.

- *Цис*-2,4,5-триарилимидазолины, содержащие алкоксигруппы в положениях 2 и 4 арильных колец, обладают способностью провоцировать гибель раковых клеток по p53-зависимому апоптотическому пути.

- Наличие сульфоиламидной группы в качестве заместителя на атоме азота *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов улучшает их растворимость в воде. Данные производные способны повышать уровень белка p21 и в меньшей степени - белка p53 в раковых клетках, экспрессирующих p53 дикого типа.

- *N*-карбамоилзамещенные 2,4,5-трис(арил)имидазолины способны стабилизировать уровень p53 в раковых клетках, экспрессирующих p53 дикого типа, а также повышать уровни p53-зависимых белков, таких как p21 и *Puma*.

Личный вклад автора состоит в подборе и анализе литературы по основным направлениям работы с последующей систематизацией в обзоре литературы. Автор лично осуществлял синтетические эксперименты, решая актуальные задачи оптимизации методов проведения синтеза и очистки полученных веществ. Автор принимал непосредственное участие

в постановке целей и промежуточных задач, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке соединений к изучению их антиоксидантной активности и биологических свойств. Автор также принимал непосредственное участие в представлении ключевых результатов работы на конференциях и подготовке материалов к патентованию и публикации в научных журналах.

Апробация работы и публикации.

Основное содержание работы изложено в 24 публикациях в виде 5 статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых виртуальными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованы ВАК для публикации результатов диссертационных работ, 1 патенте РФ, а также 18 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях. Во всех работах вклад автора является определяющим.

Основные материалы работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на конференциях: Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2015", "Ломоносов 2019", "Ломоносов 2020", "Ломоносов 2021" (Москва, Россия), IX Молодежная конференция ИОХ РАН, посвященная 160-летию со дня рождения академика Н.Д. Зелинского (Москва, Россия, 2021), EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network (Базель, Швейцария, 2020), IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2019), XXVIth Young Research Fellow Meeting, (Париж, Франция, 2019), XXV Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" (Москва, Россия, 2018), 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry/3-я Российская конференция по медицинской химии (Казань, Россия, 2017), Кластер конференций «Оргхим-2016» (Репино, Санкт-Петербург, Россия, 2016), I Всероссийская молодёжная школа-конференция "Успехи синтеза и комплексообразования", (Москва, Российский университет дружбы народов, Россия, 2016), IV Всероссийская конференция по органической химии и XVIII Молодежная школа-конференция по органической химии (Россия, Москва, Институт Органической Химии, 2015), Всероссийская Симпозиум: Второй Междисциплинарный Симпозиум по медицинской, органической и биологической химии, (Россия, Крым, Новый Свет, 2015), 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, Россия, 2021).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-03-01320, 20-03-00915) и РНФ (грант 22-23-20141)

Структура и объем диссертационной работы

Материал диссертации изложен на 146 страницах машинописного текста и состоит из следующих основных разделов: введение, литературный обзор, обсуждение результатов,

экспериментальная часть, выводы и список литературы. Диссертация содержит 28 рисунков, 16 таблиц и 34 схемы. Список литературы включает 221 наименование.

2. Литературный обзор

2.1. Белок-белковое взаимодействие p53-MDM2 как терапевтическая мишень

2.1.1. p53 как страж генома

В 1979 году в университете Принстона группа ученых, работая в области развития злокачественных новообразований, обнаружила белок с кажущейся массой 53 кДа в качестве мишени для вируса SV40, который способствует развитию опухолей (даным вирусом к тому времени были заражены миллионы людей, так как он содержался в вакцине против полиомиелита). Спустя три года, в 1982 на другом континенте в Академии наук СССР Петр Чумаков клонировал мышинный ген данного белка – *Trp53*, а к 1985 был определен уже и ген человека - *TP53*, расположенный на хромосоме 17p13.1. Но только спустя 10 лет после открытия, в 1989 году, в том же университете Принстона была показана роль белка p53 как супрессора опухолей.

Более чем в 50% случаев в опухолевых клетках мутирован именно ген данного белка, что является безусловным показателем его важности для успешного прогрессирования опухоли. «Страж генома» - именно так называют p53 за его чрезвычайную способность супрессировать опухоли.

В отсутствие стресса (повреждение ДНК УФ, ИК- излучениями, химическими агентами, окислительный стресс, осмотический шок, нарушение регуляции экспрессии онкогенов) p53 практически не обнаруживается в пролиферирующих клетках [1]. Высвобождение же белка при вышеупомянутых событиях замедляет клеточный цикл вплоть до его остановки и индуцирует апоптоз. Природа фенотипических ответов на активацию p53, по крайней мере частично, пропорциональна тяжести и природе активирующего сигнала. Сильный клеточный стресс вызывает более экстремальные и необратимые реакции, такие как апоптоз и старение, тогда как более мягкий стресс приводит к временной остановке клеточного цикла в сочетании с попыткой восстановить вызванное повреждение.

P53 дикого типа представляет собой мощный проапоптотический белок с коротким периодом полураспада, составляющим 6-20 минут. На рисунке 1А показана принципиальная схема действия p53: связываясь с ДНК, белок запускает апоптоз, репликативное старение, репарацию ДНК или же останавливает клеточный цикл [2]). Непосредственное разрушение

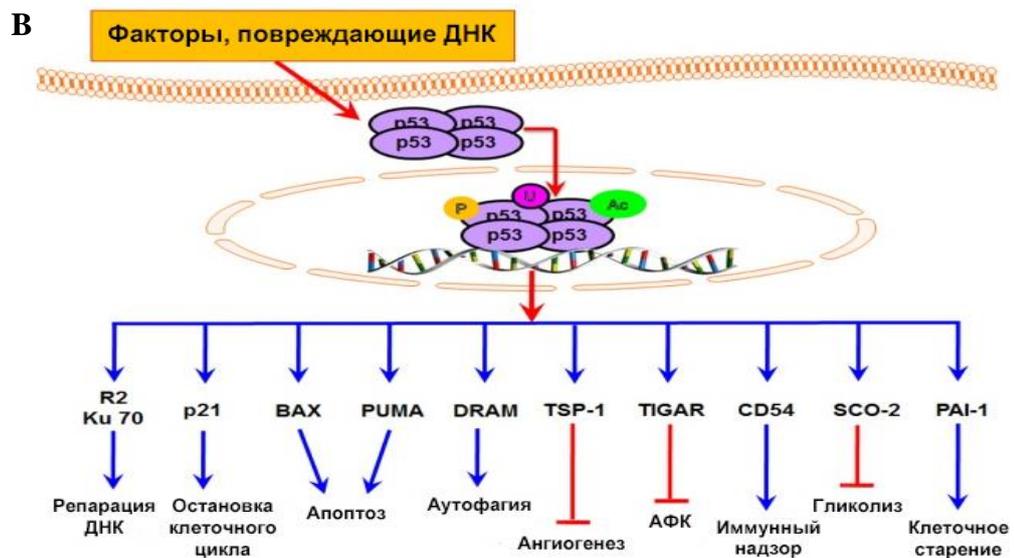
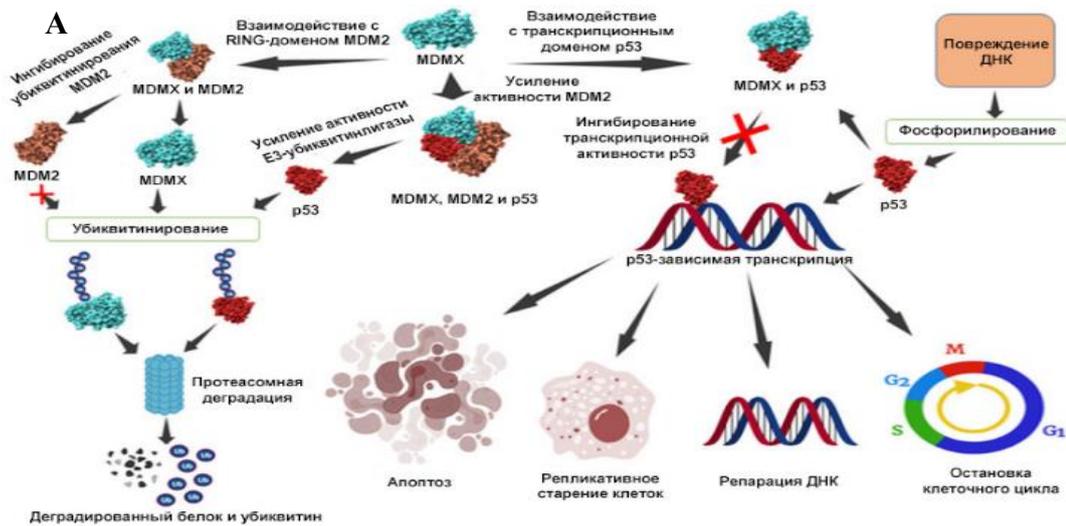


Рисунок №1. А. Схема, представляющая взаимодействие MDM2/MDMX с p53. В. Сигнальные пути и клеточные процессы, в которых участвует p53. Синие стрелки означают активацию, в то время как красным обозначена остановка процесса.

избыточного белка реализуется путем каскада белок-белковых взаимодействий. На рисунке 1Б показаны основные сигнальные пути, через которые реализуется непосредственное влияние на вышеупомянутые процессы [3]. P53 играет роль почти во всех типах систем репарации ДНК, взаимодействует с Ape/ref-1, OGG1 и Polβ (компоненты эксцизионной репарации оснований), участвует в ATM-опосредованной индукции Ku70. Ku70 взаимодействует с BAX, ингибируя его митохондриальную транслокацию и олигомеризацию, что приводит к выживанию клеток. Компоненты негомологичной системы репарации и эксцизионной репарации нуклеотидов также активируются p53 в ответ на повреждение ДНК [4]. Это лишь чрезвычайная малая доля сигнальных путей, которые в данном обзоре подробно рассматриваться не будут. Тем не менее стоит упомянуть такие белки как p21 и PUMA, активность которых напрямую зависит от p53, и которые приводят либо к остановке клеточного цикла, либо к апоптозу, соответственно.

2.1.2. MDM2 как основной регулятор p53

Как видно на рисунке 1А, важную роль в регуляции p53 играет белок MDM2 и его близкий гомолог MDMX. *Mdm2* был впервые идентифицирован как ген, ответственный за спонтанную трансформацию мышинной клеточной линии BALB/c 3Т3 [5]. Ранние исследования клеточных культур показали, что сверхэкспрессия *mdm2* делает фибробласты грызунов более подверженным злокачественной трансформации, тем самым подтверждая то, что он является онкогеном [6]. Затем, ген *mdm2* был клонирован и картирован на хромосоме 12q13-14, и было обнаружено, что он содержит два элемента транскрипционного промотора, названные *P1* и *P2*, причем последний является p53-зависимым [7].

В нормальном состоянии белок MDM2 является основным регулятором, определяющим активность и стабильность белка p53 с помощью работы E3-убиквитинлигазы [8]. Кроме того, по данным клинических и доклинических исследований известно, что MDM2 играет важную роль в клетке независимо от p53. Например, MDM2 способен влиять на такие процессы, как синтез и репарация ДНК (путем взаимодействия с ДНК-полимеразой), DHFR, амплификацию centrosомы и ДНК-комплекса MRN [9]. Аналогичным образом MDM2 взаимодействует с несколькими белками, такими как комплекс Rb/E2F-1, ДНК-метилтрансфераза DNMT3A, p107, MTPP, ингибитор циклинкиназы p21 (независимо от p53). MDM2 управляет прогрессированием клеточного цикла (обычно S-фаза) [10]. Антиапоптотическая роль MDM2 также включает его взаимодействие с хорошо известными медиаторами апоптоза, такими как p73 и FOXO3a. MDM2 снижает стабильность белка FOXO3a, а также опосредует NEDDилирование p73, предотвращая трансактивацию p53. В то же время MDM2 активирует трансляцию антиапоптотического XIAP, инактивируя каспаз-опосредованный апоптоз [11; 12]. Таким образом, MDM2 влияет как на проапоптотические, так и на антиапоптотические белки. Роль MDM2 в регуляции p53 и в поддержании жизни дополнительно подтверждается тем фактом, что направленная делеция гена *mdm2* у мышей приводит к летальному исходу [13]. Эти наблюдения подчеркивают, что взаимодействие MDM2 с p53 включает в себя больше, чем простое связывание белка.

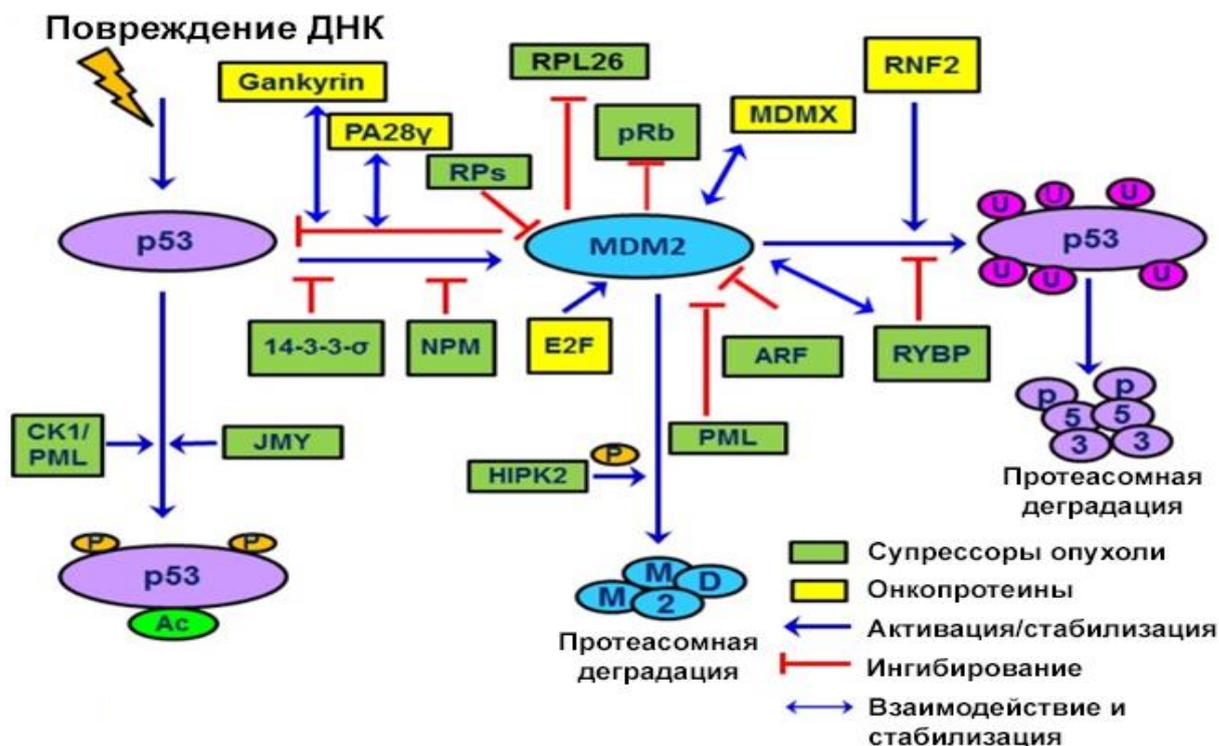


Рисунок №2. Несколько опухолевых супрессоров и онкобелков регулирующих взаимодействие MDM2-p53.

Mdm2 действует как онкоген благодаря его способности связывать опухолевый супрессор p53 и ингибировать опосредованную p53 трансактивацию генов [14]. Последующие исследования показали, что сверхэкспрессия MDM2 снижает уровень p53 в клетке, что привело к предположению, что MDM2 является негативным регулятором p53 [15]. На рисунке 2 показана основная концепция взаимодействия MDM2-p53, показывающая, что белок MDM2 физически связан с супрессором опухоли p53.

Первоначально считалось, что взаимодействие MDM2-p53 является результатом исключительно взаимного связывания MDM2 и p53 через их N-концевые домены [16]. Однако, Поюровский с соавторами обнаружили, что изменения в С-конце p53 (такие как делеция, мутация или ацетилирование) также могут влиять на взаимодействие MDM2-p53 [17]. Кроме того, С-концевой пальцевый домен RING MDM2 служит убиквитинлигазой E3 для протеолиза p53 и убиквитинирует p53 по нескольким остаткам лизина [18]. Низкие уровни активности MDM2 индуцируют моноубиквитинирование и ядерный экспорт p53, тогда как более высокие уровни способствуют полиубиквитинированию и ядерной деградации p53 [19].

Протеасомная деградация белка p53 с помощью MDM2 важна для подавления противоопухолевых функций p53. Многие белки влияют на эту активность либо усиливая, либо ингибируя ее. MDM2 нацелен на убиквитинирование и деградацию p53 протеасомой, выведение p53 из ядра, предотвращение взаимодействия p53 с коактиваторами транскрипции и рекрутирование ко-активатора транскрипции [16; 20]. С другой стороны, p53 регулирует

экспрессию онкобелка MDM2, связываясь с его промотором [21]. Повышенные уровни MDM2 заставляют его, в свою очередь, связывать и инактивировать p53, напрямую блокируя трансактивационный домен p53 и направляя белок p53 для убиквитин-зависимой деградации протеасомой. Эта элегантная ауторегуляторная петля помогает поддерживать низкий уровень p53 в нормальных клетках. Уровни p53 должны строго контролироваться в не подвергавшихся стрессу клетках, поскольку высокие уровни антипролиферативного и проапоптотического p53 могут быть вредными для нормального роста и развития клеток [4].

Петля обратной связи MDM2-p53 имеет решающее значение для ограничения уровня и активности p53 при нормальной клеточной физиологии и жестко регулируется несколькими другими белками. Эти кофакторы изменяют конформацию MDM2 или p53, связывание, локализацию, экспрессию и модулируют лигазную активность E3 MDM2 по отношению к самому себе, p53 и другим субстратам; следовательно, регулируя множество различных клеточных процессов (рисунок 2). Краткая информация по функциям данных белков приведена в таблице №1.

Таблица №1. Связь некоторых белков с p53 или MDM2.

Название белка	Мишень	Биологические взаимодействия	последствия	Источник
14-3-3-σ	p53	Активация p53 индуцирует 14-3-3-σ, вызывая остановку фазы G2/M.		[22]
p14 (ARF)	MDM2	ARF локализует MDM2 в ядре, предотвращая взаимодействие MDM2-p53, одновременно способствуя быстрой деградации MDM2.		[23]
p73	MDM2	Увеличение апоптоза и остановка клеточного цикла из-за повышения стабильности p53		[24]
Caspase-2	MDM2	При повреждении ДНК p53 индуцирует каспазу-2-PIDDosome, создавая петлю положительной обратной связи, которая ингибирует MDM2 и усиливает стабильность и активность p53, способствуя выживанию клеток и устойчивости к лекарствам.		[25]
Gankyrin(PSM10)	p53	Повышенная пролиферация клеток и снижение апоптоза из-за снижения стабильности p53		[26]
HAUSP/USP7	MDM2, p53	Увеличение пролиферации клеток и снижение апоптоза		[27]
HIPK2	p53	Повышенный апоптоз и остановка клеточного цикла из-за активации p53		[28]
IGF-1R	MDM2, p53	Повышенный апоптоз и остановка клеточного цикла при сверхэкспрессии IGF-1R		[29]

JMY	MDM2	Вызывает опосредованную p53 остановку клеточного цикла и апоптоз; влияет на подвижность клеток	[30]
Merlin	MDM2	Снижение пролиферации клеток из-за повышения стабильности p53	[31]
MDMX	p53	Увеличение пролиферации клеток и снижение апоптоза	[32]
NUMB	MDM2	MDM2 увеличивает деградацию и активность p53	[33]
Nucleosteomin	p53	Снижение апоптоза и остановка клеточного цикла из-за снижения транскрипции p53	[34]
Nucleophosmin (NPM,B23)	p53	Повышенный апоптоз и остановка клеточного цикла из-за активации p53	[35]
PA28γ	MDM2	Усиление протеасомной деградации различных белков, участвующих в клеточном цикле, что приводит к пролиферации клеток.	[36]
PML	p53	Повышенный апоптоз и остановка клеточного цикла из-за повышенного накопления p53 в клетке	[37]
PCAF	MDM2	Повышенный апоптоз и остановка клеточного цикла из-за активированного p53	[38]
Retinoblastoma protein (Rb)	MDM2	Сверхэкспрессия MDM2 ингибирует Rb, вызывая повышенную пролиферацию клеток и снижение апоптоза	[39]
Siva-1	MDM2	Повышенная пролиферация клеток и снижение апоптоза из-за снижения стабильности p53	[40]
Tip60	p53	Усиление апоптоза и остановка клеточного цикла из-за активированного p53	[11]
YY1	p53	Увеличение пролиферации клеток и снижение апоптоза	[41]

Различные механизмы, такие как амплификация гена *mdm2*, однонуклеотидный полиморфизм в нуклеотиде 309 (SNP309) в его промоторе гена [42], повышенная транскрипция и трансляция [43] приводят к гиперэкспрессии MDM2. Исследования показали, что ген *mdm2* был амплифицирован более чем в трети из 47 сарком, включая распространенный рак костей и мягких тканей [15]. Известно также, что повышение уровня MDM2 связано с плохим прогнозом для лечения, особенно при солидных опухолях молочной железы, легких, желудка и пищевода; липосаркомах, глиобластомах и лейкозах [14; 15]. Есть прямая корреляция сверхэкспрессии *mdm2* с метастазированием и прогрессирующими формами заболевания при остеосаркомах, раке толстой кишки, молочной железы и предстательной железы, а также с развитием резистентных к лечению опухолей [44].

Поскольку сверхэкспрессия MDM2 наблюдается и в опухолях, содержащих p53 дикого типа, было высказано предположение, что в этом случае ингибирование взаимодействия MDM2-p53 поможет восстановить уровень и активность p53 [21].

Повышение экспрессии и активности p53 дикого типа является конечной целью большинства стратегий лечения. Одним из путей повышения уровня p53 являются подходы на основе генной терапии. К ним относится система доставки p53 на основе аденовирусного вектора, получившая одобрение в Китае в 2004 г. при лечении рака головы и шеи. Еще одна стратегия восстановления p53 дикого типа в клетке связана с созданием вакцины против мутантного p53, основанная на введении небольших молекул, которые связываются с мутантным p53 для восстановления нормальной конформации и/или активности (например, эллиптицин) [45].

2.1.3. Основные ингибиторы p53-MDM2/MDMX взаимодействия

Небольшие молекулы, нацеленные на MDM2, которые блокируют сайт связывания p53 в MDM2, предотвращая его взаимодействие с p53 через стерические затруднения, в настоящее время включают соединения следующих классов [46; 47]:

- Нутлины (RG7112) [48]
- Spiroоксиндолы (SAR405838) [49]
- Бензодиазепиндионы [50]
- Пиперидиноны (AMG232) [51]

Примеры активных соединений представлены на рисунке 3 [46]. Наиболее изученными среди них являются нутлин и его аналоги. Так, аналог нутлина RG7112 был первым ингибитором MDM2, испытанным в клинике у пациентов с липосаркомой с амплификацией MDM2 [52]. Производное нутлина последнего поколения, RG7388, продемонстрировало повышенную аффинность и эффективность *in vitro* и *in vivo* [53]. Принцип действия всех нутлинов основан на том, что они стабилизируют и активируют p53, связываясь с гидрофобным карманом MDM2 (подробнее в главе 2.1.4.). Это приводит к экспрессии нижестоящих мишеней p53, таких как p21 или PUMA, и индукции остановки клеточного цикла или к апоптозу [48].

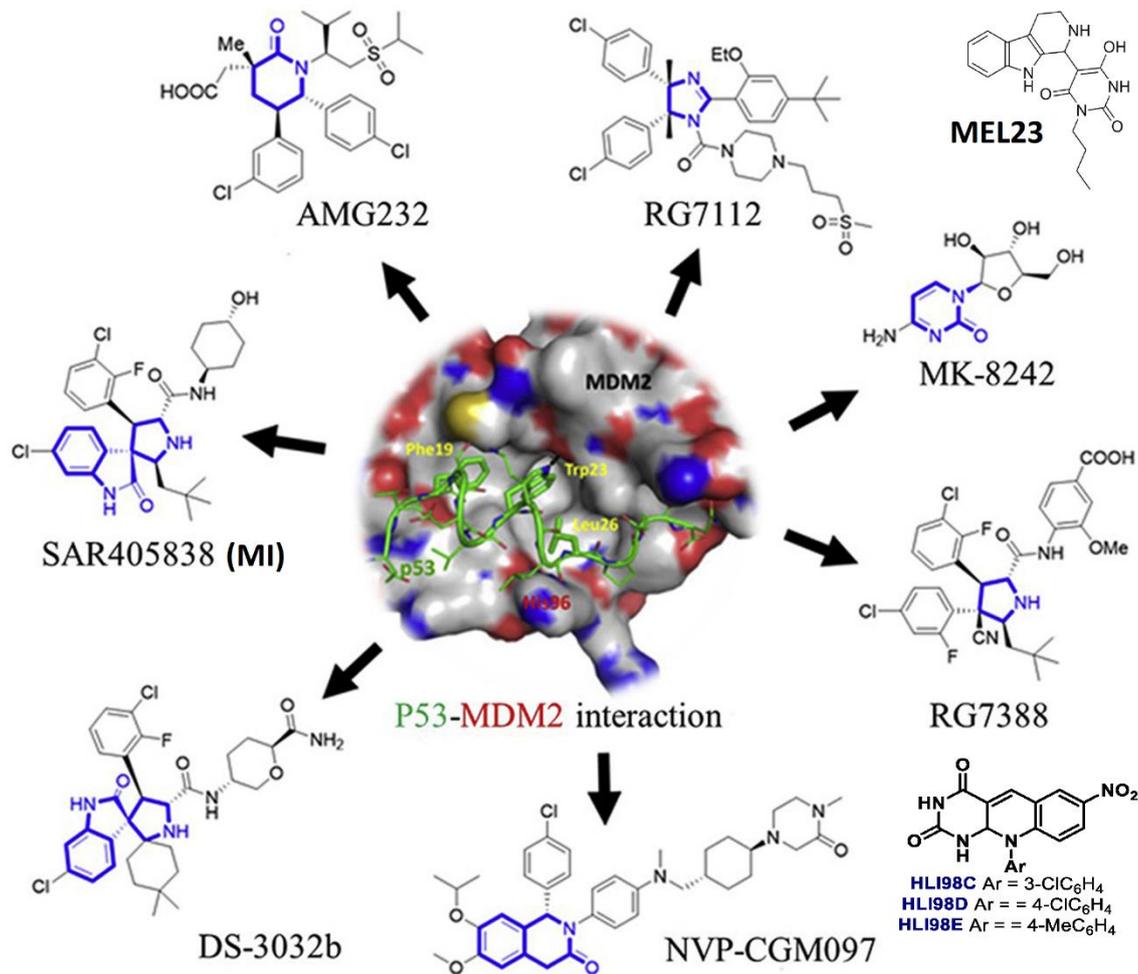


Рисунок №3. Примеры основных ингибиторов p53-MDM2 взаимодействия.

Спирооксиндолсодержащие соединения (серия MI) представляют собой еще один класс высокоаффинных соединений-антагонистов MDM2, разработанных специально для имитации трех ключевых гидрофобных остатков (Phe19, Trp23 и Leu26) белка p53, образующих связывание внутри кармана MDM2. Подобно производным нутлина, соединения спирооксиндолов (серия MI, на рис. 3 представитель SAR405838) вызывают остановку клеточного роста в нескольких клеточных линиях благодаря активации p53. Также было показано, что представители данной серии подавляли рост опухоли *in vivo* в модели ксенотрансплантата SJSA-1 как отдельно, так и в комбинации с иринотеканом и проявляли противоопухолевую активность без очевидной токсичности при пероральном введении [54]. SAR405838 значительно снижал онкогенность ксенотрансплантатов дедифференцированной липосаркомы с высоким уровнем MDM2 [55]. Однако приобретение мутаций p53, придающих устойчивость к ингибиторам MDM2, требует разработки новых ингибиторов подобного рода [56].

Дизайн *de novo*, основанный на способе комбинирования структурных фрагментов ранее известных ингибиторов, привел к разработке нового скаффолда для ингибирования MDM2 - пиперидинона. Так, пиперидинон AMG232 показал противоопухолевый эффект на модели ксенотрансплантата остеосаркомы SJSA-1 у мышей. В настоящее время AMG232 проходит

испытания в рамках исследования I фазы у пациентов с различными типами солидных и гематологических опухолей [51].

Дизайн «сшитых» пептидов на основе p53 является еще одним многообещающим подходом к ингибированию взаимодействия p53-MDM2. Так называемые степлерные пептиды фиксируются путем добавления углеводородной связи, которая стабилизирует α -спиральную структуру белка, придает устойчивость к протеазам и способствует клеточному поглощению. Первый синтезированный степлерный пептид SAN-p53-8 (стабилизированная α -спираль p53) индуцировал апоптоз в клетках остеосаркомы SJSA-1, сверхэкспрессирующих MDM2, путем реактивации сигнального пути p53 [57], но, к сожалению, был эффективен только в достаточно высоких концентрациях. Поэтому были найдены его аналоги методом фагового дисплея и дополнительно оптимизированы с целью выхода к более высокой аффинности к MDM2. Аналоги фагового происхождения, sMTide-02/02A, индуцируют остановку G1/G2 в клетках, несущих p53 дикого типа, что делает их полезными в случае циклотерапии или другими словами для защиты нормальных клеток от побочных эффектов химиотерапии [58].

Ингибирование отдельно активности лигазы E3 MDM2, а не белок-белкового взаимодействия, является альтернативной стратегией для создания низкомолекулярных активаторов p53. Семейство низкомолекулярных соединений HLI98 (рис. №3) блокируют активность лигазы MDM2, в то время как MEL23 (рис. №3) и MEL24 блокируют активность лигазы E3 гетерокомплекса MDM2/MDMX. MEL23 взаимодействовал с агентами, повреждающими ДНК в p53-нулевых клетках, в небольшой, но воспроизводимой степени. Было показано, что MDM2 обладает независимыми от p53 онкогенными эффектами - например, сверхэкспрессия MDM2 у мышей вызывает опухоли независимо от статуса p53. Таким образом, специфические ингибиторы лигазы MDM2 E3 могут быть полезны в p53-нулевых или p53-мутантных опухолях [59].

2.1.4. Особенности связывания имидазолиновых производных с MDM2. Молекулярный уровень.

Особенности структурного взаимодействия белков p53-MDM2 были изучены рентгеноструктурным методом. Было найдено, что площадь поверхности взаимодействия двух белков составляет $\sim 700 \text{ \AA}^2$, и предоставляет потенциальную мишень для нарушения или ингибирования p53-MDM2 взаимодействия низкомолекулярными ингибиторами. Четырнадцать аминокислот образуют углубленную гидрофобную впадину в третичной структуре белка MDM2, и именно она может быть занята низкомолекулярным ингибитором. Эти остатки представляют собой Leu54, Leu57, Ile61, Met62, Tyr67, Gln72, Val75, Phe86, Phe91, Val93, His96, Ile99, Tyr100 и Ile101. Со стороны же белка p53, всего три аминокислоты, а именно Phe19, Trp23 и Leu26 напрямую вовлечены и взаимодействуют с поверхностными аминокислотами MDM2 (рисунок 4) [60].

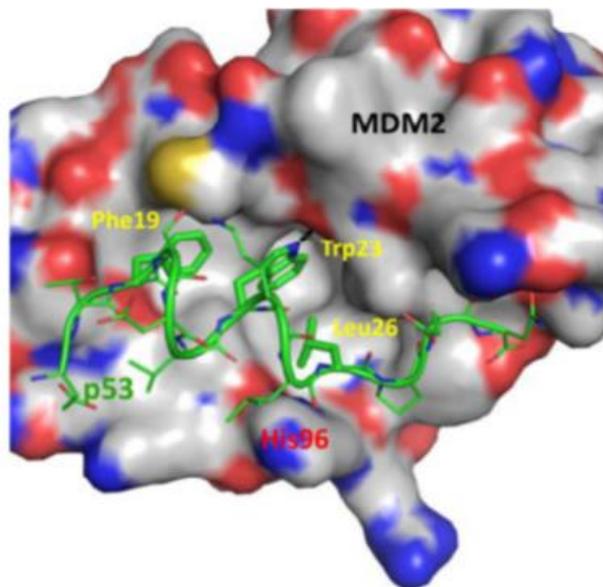


Рисунок №4. Структура комплекса MDM2-p53 (код PDB: 1YCR)

Таким образом, имитация остатков p53, вовлеченных в связывание с MDM2 (Phe19, Trp23 и Leu26) в пространстве за счет низкомолекулярного химического соединения открывает путь к ингибиторам данного вида взаимодействия. В ингибиторах *цис*-имидазолиновой структуры, таких, как RG7112 и Нутлин-3а, имитация связующих остатков Leu26 и Trp23 происходит за счет двух хлорфенильных заместителей (в 5-м и 4-м положении) соответственно, а имитация Phe19 - за счет алкокси группы в арильном заместителе во 2-м положении (рисунок 5).

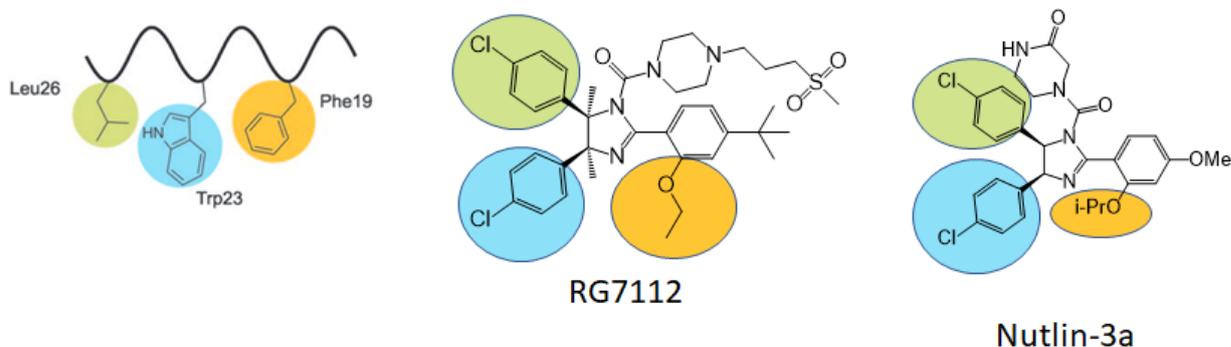


Рисунок №5. Соответствие аминокислотных остатков p53 и структурных фрагментов имидазолиновых ингибиторов.

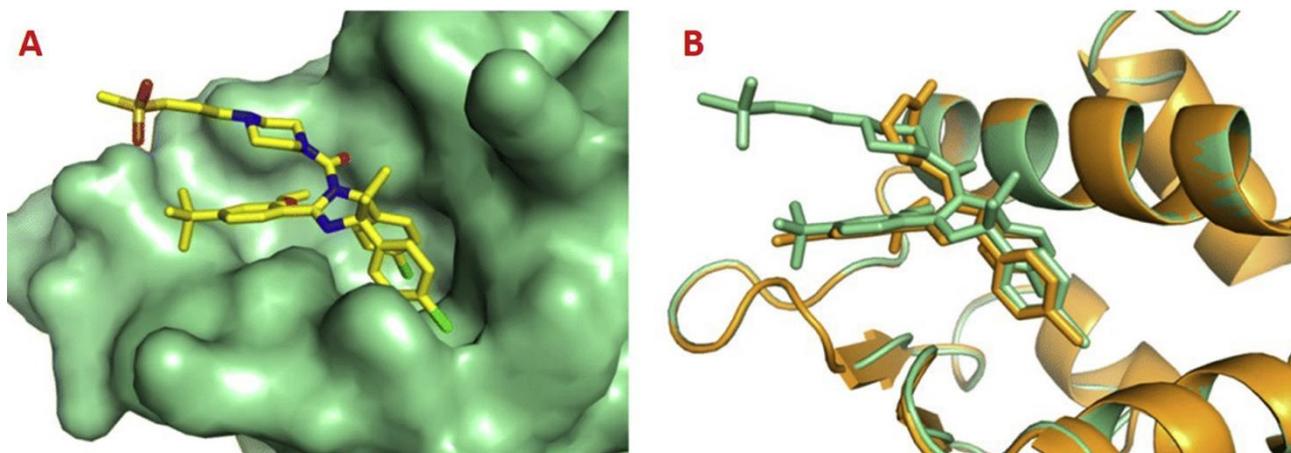
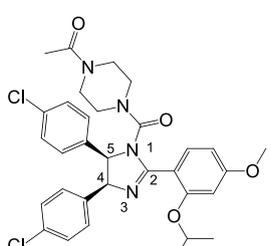
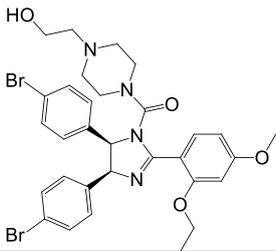
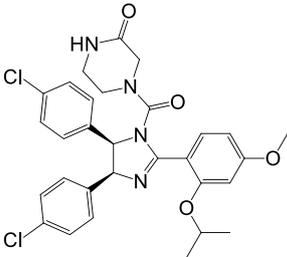
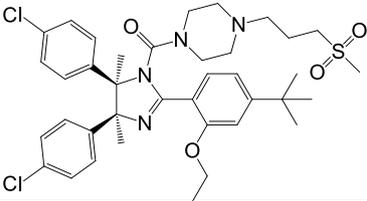
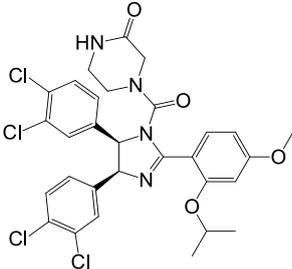
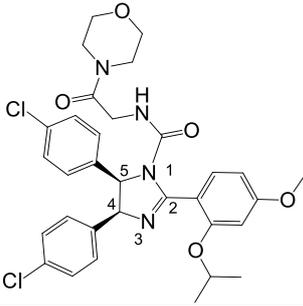
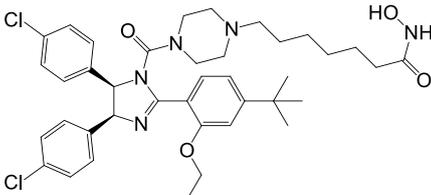


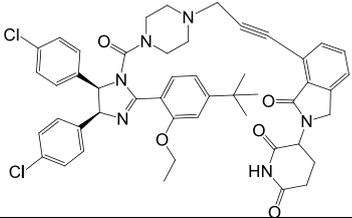
Рисунок №6. Кристаллическая структура MDM2 (показана зеленым) в комплексе с RG7112 (желтый, код PDB: 4IPF). (B) Наложение кристаллических структур MDM2 в комплексе с RG7112 (зеленый) и Nutlin-3a (золотой, код PDB: 4J3E).

Структурные особенности ингибирования взаимодействия MDM2-p53 были изучены методом молекулярной стыковки SERM по данным PCA. Нутлин-3a взаимодействует с 3 ключевыми гидрофобными сайтами в p53-связывающем домене MDM2, который включает взаимодействия двух 4-хлорфенильных заместителей в гидрофобных карманах, образованных Leu54, His96, Leu99, Tyr100 и Leu54, Leu57, Leu61 соответственно через π - π -взаимодействие и π -алкильные взаимодействия (расстояние $<5 \text{ \AA}$). Кроме того, 2-изопропокси-4-метоксифенильный заместитель также осуществляет гидрофобные взаимодействия с Val93 (расстояние $<5 \text{ \AA}$) [61].

Таблица №2. Количественные характеристики взаимодействия с белком ингибиторов имидазолинового типа.

Соединение	MDM2	MDMX
	Активность, нМ	
p53	770 (K _i , NMR, [62])	480 (K _i , NMR, [62])
Нутлин-1 	260 (IC ₅₀ , SPR, [48]) 1240 (K _i , FP, [63])	-

<p>Нутлин-2</p> 	<p>140 (IC₅₀, SPR, [48])</p>	<p>-</p>
<p>Нутлин-3а</p> 	<p>36 (K_i, FP, [49]) 90 (IC₅₀, SPR, [48]) 8 (IC₅₀, TR-FRET, [64]) 6.4 (K_i, TR-FRET, [64]) 69 (K_i, FP, [65]) 270 (IC₅₀, FP, [65])</p>	<p>70 (K_i, FP, [65]) 4300 (IC₅₀, TR-FRET, [64])</p>
<p>RG7112</p> 	<p>18 (K_i, TR-FRET, [66])</p>	<p>-</p>
<p>Кайлин-1</p> 	<p>1480 (IC₅₀, SP, [67])</p>	<p>-</p>
<p>нутлин-1^{mod}</p> 	<p>480 (K_i, FP, [63])</p>	<p>-</p>
<p>14d-2</p> 	<p>60 (K_i, FP, [68])</p>	<p>-</p>

32		-
<p>NMR – титриметрия с ядерным магнитным резонансом</p> <p>FP – метод поляризационной флюоресценции</p> <p>TR-FRET – метод фёрстеровского переноса энергии</p> <p>SPR – метод плазмонного резонанса</p> <p>SP – спектрофотометрический метод</p>		

Ближайшими аналогами нутлина-3 и его подгруппы является семейство кайлинов, которое, однако, уступает ему в активности (таблица №2). Взаимодействие кайлина-1 изучено

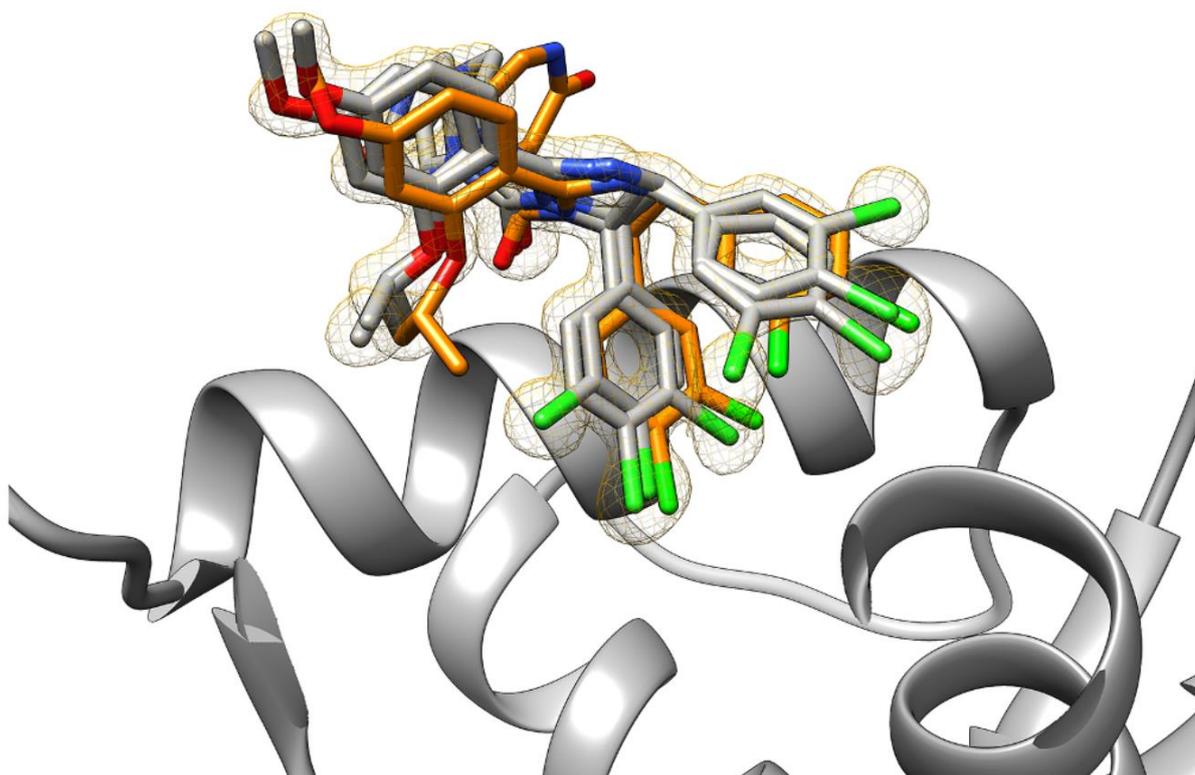
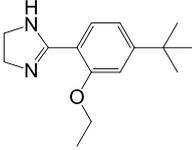
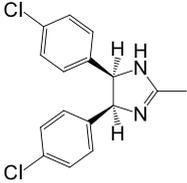
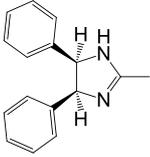


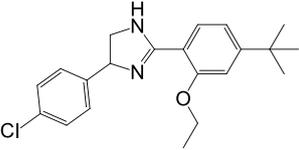
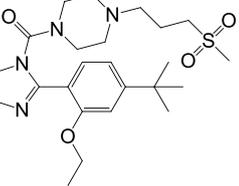
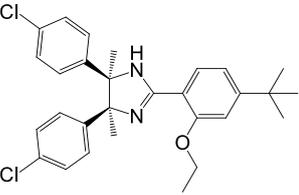
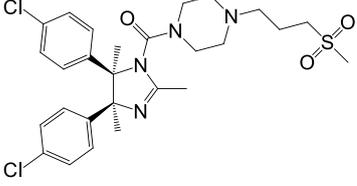
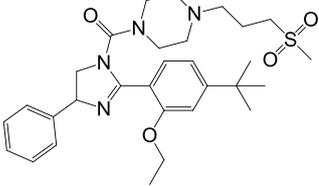
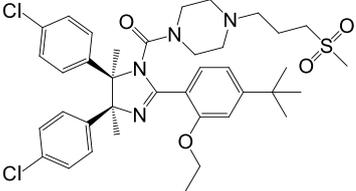
Рисунок №7. Наложение ЯМР и рентгеновских структур MDM2 в комплексе с кайлином-1. Сравнение структуры комплекса, полученного с помощью ЯМР2 (оранжевый), с рентгеновскими структурами комплекса MDM2-кайлин-1 (серый) и соответствующей электронной плотностью (сетка). Перекрытие создавалось путем наложения белковых структур. Структура кайлин-1, полученная с помощью рентгеновской кристаллографии, показывает две одинаково заполненные конформации дихлорфенильных колец, одна из которых хорошо перекрывается со структурой ЯМР (красный цвет для кислорода, синий для азота, зеленый для хлора и оранжевый или серый для углерода).

как методом РСА, так и методом ЯМР спектроскопии. На рисунке 7 показаны положения низкомолекулярного ингибитора полученными двумя методами [69].

Для структуры нутлина проведено дополнительное исследование, позволяющее определить важные для взаимодействия с MDM2 части молекулы. Результаты исследования представлены в таблице №3 [70]. Важным для связывания атрибутом структуры являются галогеновые заместители у фенильных колец в положениях 4 и 5. Интересно, что способностью к связыванию обладает даже имидазолин 4, содержащий только эти фрагменты. Дальнейшие модификации имидазолина увеличивают константы связывания, причем влияние заместителя у атома азота кажется значительнее, чем фенильного фрагмента в положении 2. Рентгеноструктурные данные фрагментов приведены на рисунке №8.

Таблица №3. Характеристики связывания отдельных фрагментов аналога нутлина с MDM2.

№	Формула фрагмента	Способность связывания с белком MDM2, метод	
		ЯМР	SPR (K _d , мкМ)
1		нет	нет
2		нет	нет
3		нет	нет
4		да	да (26)
5		нет	нет

6		да	нет
7		нет	нет
8		да	да (20)
9		да	да (14)
10		да	да (1000)
11		да	да (0,22)

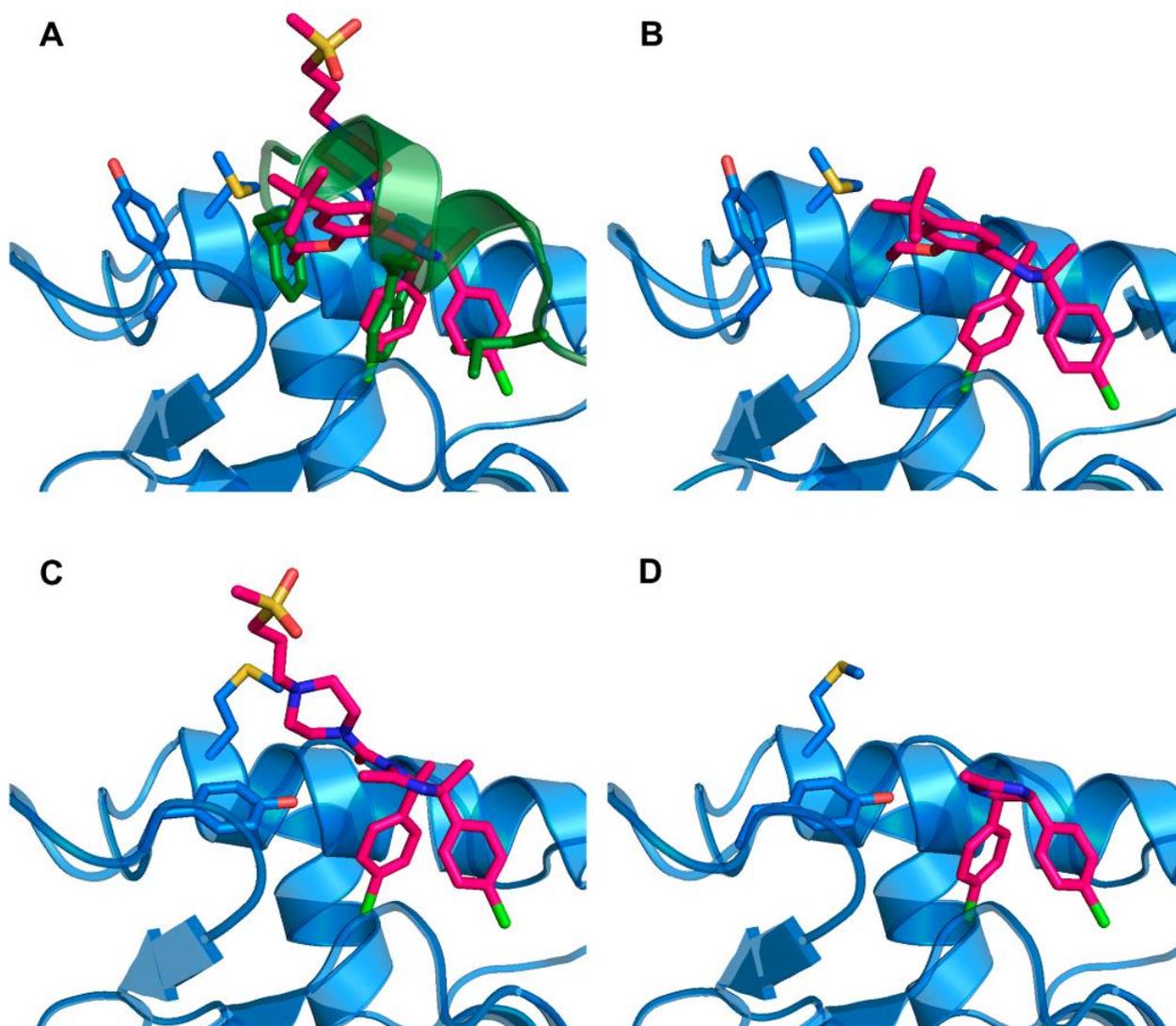


Рисунок №8. Рентгеноструктурные данные MDM2 в комплексе с RG7112 (**11**) (A) и различными фрагментами (таблица №3): **8** (B); **9** (C); и **4** (D). На рисунке (A) также представлен белок p53, изображенный зеленым цветом (спираль).

2.1.5. Клеточный уровень: цитотоксичность имидазолиновых производных

Результаты тестов на сериях клеточных культур p53 дикого и мутантного типа из разных типов опухолей, включая рак толстой кишки, рак молочной железы, рак легких, рак простаты, меланому, остеосаркому, рак почек приведены в таблице №3. Ингибиторы класса нутлинов, способные активировать p53 дикого типа и с некоторой селективностью уничтожать раковые клетки в достаточно низких концентрациях (IC_{50} 1-2 мкМ) в таких клеточных линиях как SJSA-1 (остеосаркома), HCT116 (колоректальный рак) и RKO (карцинома толстой кишки), оказались в 10 раз селективнее по отношению к p53-мутантными клеточным линиями MDA-MB-435 (меланома) и SW480 (колоректальная аденокарцинома) в сравнении с линиями, несущими p53 дикого типа [71]. Было показано, что и Нутлин-3а [72–75] и RG-7112 [76–78] были более активны

в культурах дикого типа и индуцировали остановку клеточного цикла на границах G1/S и G2/M и истощение клеток S-фазы во всех клеточных линиях. В конечном итоге результат зависел от активации или инактивации сигнальных путей выживания в клетке. Так, большинство линий гематологических раковых клеток с p53 дикого типа претерпевают апоптоз как первичный ответ на лечение нутлином-3а, тогда как большинство, но не все негематологические линии раковых клеток (саркомы, карциномы) подвергаются остановке роста. Было показано, что SJSA-1 и MНМ, две линии клеток остеосаркомы с амплификацией гена *mdm2*, были высокочувствительны к апоптозу, индуцированному нутлином-3, тогда как НСТ-116 (рак толстой кишки), А549 (рак легких) и Н460 (рак легких), в которых ген не амплифицирован были наименее чувствительными. Несколько отличается действие RG-7112, он тоже оказался наиболее эффективным в уничтожении раковых клеток, продуцирующих белок MDM2, в результате амплификации гена *mdm2*. Однако, несмотря на его существенно более высокую эффективность, RG7112 не смог вызвать эффективную гибель клеток более чем в половине из 12 панелей солидных опухолевых клеток. Как ранее было показано для нутлина-3 [74], это было связано не с неспособностью стабилизировать p53 и активировать его транскрипционные мишени и функцию остановки клеточного цикла, но, вероятно, с нарушением передачи апоптотических сигналов факторов регулируемых p53.

Высокая чувствительность опухолей с амплификацией *mdm2*, вероятно, связана с тем фактом, что в этих опухолях отсутствуют другие дефекты пути p53, и ингибирование MDM2 восстанавливает их полный p53-зависимый апоптотический потенциал [77; 78].

Таблица №4. Данные по эффективности нутлина-3а и RG7112 на разных клеточных линиях

Клеточная линия	TP53 статус	Нутлин-3а (µM)	RG7112 (µM)	Ссылки
A549	Дикого типа	17.68 ± 4.52	0.18-2.2	[77; 79]
SJSA-1	Дикого типа	1.3 ± 0.2	0.18-2.2	[77; 80]
НСТ116	Дикого типа	5.6 ± 0.11	0.18-2.2	[77; 80]
RKO	Дикого типа	0.9 ± 0.8	0.18-2.2	[71; 77]
MDA-MB-435	Мутантная форма	40.0	5.7-20.3	[71; 77]
SW480	Мутантная форма	~17	5.7-20.3	[77]
SKOV-3	Мутантная форма	38	5.7-20.3	[72; 77]

Таким образом, рациональность использования имидазолиновых ингибиторов MDM2 в случае p53 дикого типа не вызывает сомнений, а также имеются предпосылки их применения и в случае мутантных опухолей.

2.1.6. Особенности применения ингибиторов имидазолинового типа.

Доклинические испытания.

Существуют исследования показывающие, что остановка клеточного цикла, вызванная длительным лечением нутлином-3 в раковых клетках p53 дикого типа, в известной степени, если не полностью, обратима [81]. Так, известно, что нутлин-3 вызывает старение фибробластов и

клеток фибросаркомы в зависимости от длительности воздействия [82]. Воздействие нутлином-3 в течении 6 дней также вызывало остановку клеточного цикла, похожую на старение, которая отличалась повышенной экспрессией β -галактозидазы в некоторых линиях злокачественных клеток с p53 дикого типа. Но после прекращения воздействия ингибитора почти 100% обработанных нутлином-3 клеток возобновили цикл. Восстановление клеточного цикла после прекращения лечения, конечно, несет в себе потенциальное осложнение терапии нутлинами. В то же время, эти данные послужили обоснованием для нестандартного использования нутлина-3 против p53-дефицитного или мутантного рака. Предварительное лечение опухолей с дефицитным p53 или мутантными опухолями останавливает деление нормальных тканей и клеток, окружающих опухоль, но позволяет опухолевым клеткам продолжать пролиферацию. Воздействие лекарств, нацеленных на пролиферирующие клетки, селективно уничтожает именно опухолевые клетки, не затрагивая при этом нормальные окружающие клетки, остановившие деление [83; 84].

Однако, несмотря на теоретические предпосылки к применению в мутантных формах, имидазолиновые ингибиторы в настоящее время стараются применять все-таки в опухолях, несущих p53 дикого типа. Педиатрические опухоли являются особенно привлекательными терапевтическими мишенями для нутлина-3а, поскольку в большинстве из них выявляется именно p53 дикого типа. Так, нейробластома является агрессивным злокачественным новообразованием в детском возрасте и становится причиной большего количества смертей от рака у детей. Фактически, нейробластома является причиной >15% всех случаев смерти от рака у детей и представляет собой серьезную терапевтическую проблему в педиатрической онкологии, поскольку существующая терапия неадекватна для поздних стадий заболевания с долгосрочной выживаемостью <40% и связана с неприемлемой дозозависимой токсичностью [85]. В то же время 98% опухолей нейробластомы сохраняют p53 дикого типа при постановке диагноза, и нутлин-3а показал высокую цитотоксическую активность *in vitro* на клеточных линиях этого типа. Это позволило высказать предположение, что такие пациенты, вероятно, получают пользу от терапии нутлином-3а [85]. Тем не менее, пероральный прием нутлина-3а два раза в день (200 мг/кг) при модели ксенотрансплантата подкожной нейробластомы позволил лишь частично ингибировать рост опухоли, несмотря на хорошую чувствительность к нутлину ($IC_{50} = 5,56$ нМ) этих клеток *in vitro* [86–88]. Однако, данные этого эксперимента стоит интерпретировать с осторожностью. Так, в эксперименте использовалась рацемическая смесь нутлинов-3 (нутлин-3а и нутлин-3б), и предполагаемая эквивалентная доза для энантиомерно чистого нутлина-3а должна была бы составлять 100 мг/кг два раза в день. При этом оценка концентрации несвязанного нутлин-3а в плазме показала, что она будет постоянно

ниже установленной IC50 при этом режиме дозирования, что объясняет только частичный ответ на лечение рацемическим нутлином-3.

Нутлин-3а продемонстрировал цитотоксичность *in vitro* и на другой модели детской опухоли, представленной рабдомиосаркомой [89]. Хотя, в отличие от испытаний на нейробластоме, нутлин еще не был испытан на доклинической модели рабдомиосаркомы, тем не менее фармакокинетическая модель предсказывает, что стандартного режима перорального приема 200 мг/кг нутлина-3а два раза в день достаточно для достижения концентрации несвязанного нутлина-3а в мышцах, постоянно превышающей IC50 для клеточной линии рабдомиосаркомы-УМ [90]. В том же исследовании было показано, что концентрации нутлина-3а выше IC50 для клеток первичного Т-острого лимфобластного лейкоза были достигнуты в плазме и селезенке при пероральном приеме 100 мг/кг нутлина-3а два раза в день [90]. Однако биодоступность в костный мозг была низкой, и для данного диагноза была рекомендована доза в 400 мг/кг два раза в день [91].

Для лечения ретинобластомы (опухоли, часто несущей p53 дикого типа) Лоури с коллегами предложили в качестве терапии ежедневное субконъюнктивальное введение нутлина-3а в течение 5 дней, в сочетании с топотеканом (ингибитором топоизомеразы I) Нутлин-3а вызывал 82-кратное снижение опухолевой массы в модели ретинобластомы без системных или окулярных побочных эффектов [92]. Субконъюнктивальное введение нутлина-3а в данном случае является более подходящим для нацеливания на метастазы ретинобластомы стекловидного тела [89] по сравнению с пероральным режимом, наиболее часто используемым в доклинических исследованиях (200 мг/кг перорально два раза в день), поскольку из-за плохой биодоступности IC50 никогда не достигалась в стекловидном теле при пероральном приеме нутлина-3а в такой дозировке и была достигнута лишь временно при повышенной дозе - 400 мг/кг два раза в день [90].

Что касается гематологических злокачественных новообразований, следует подчеркнуть, что лейкозы и лимфомы у взрослых также демонстрируют относительно низкий процент делеций и/или мутаций p53 при постановке диагноза (<15%) [93], что также делает эти опухоли привлекательной мишенью для терапии нутлином-3а. И действительно, ряд исследований показал, что нутлин-3 проявляет значительную цитотоксичность *in vitro* в отношении нескольких типов гематологических злокачественных новообразований [94; 95]. Совсем недавно несколько исследований выявили терапевтический потенциал нутлина-3 при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). В частности, Абдул-Наби с коллегами [96], сравнивая *in vitro* эффекты 4 основных групп слитых онкогенов ОМЛ на первичные CD34+ клетки человека, обнаружил, что MDM2 активировался слитым онкогеном AML1-ETO. Нутлин-3 ингибировал пролиферацию и самообновление первичных клеток CD34+ человека, индуцированных трансдукцией с помощью

AML1-ETO, подтверждая гипотезу, что такая терапия может быть эффективна при ОМЛ, несущем слитый онкоген AML1-ETO. В другом исследовании анализ случаев ОМЛ, демонстрирующих наибольшую чувствительность к ингибиторам MDM2, выявил сильную и значимую связь с мутацией Flt3 (Flt3-ITD) [97]. В случае острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) также была показана эффективность активации пути p53 и последующего ингибирования клеточного цикла и индукции апоптоза в агрессивных клетках детской лейкемии *in vitro* и в ксенотрансплантате мышей [76; 98]. В случае взрослых в случае ОЛЛ также отмечается также снижение жизнеспособности клеток, включая аутофагию [99].

Многие используемые в настоящее время химиотерапевтические препараты действуют, индуцируя повреждение ДНК, которое, в свою очередь, активирует путь p53 как неотъемлемый компонент механизма их действия. Тем не менее, давая высокую генотоксическую нагрузку на нормальные ткани, лечение терапевтическими дозами химиотерапевтических препаратов часто приводит к развитию вторичных злокачественных новообразований в более позднем возрасте. Эти вторичные злокачественные новообразования обычно очень агрессивны и плохо поддаются химиотерапии. В этом отношении очевидно преимущество негенотоксичных активаторов p53, таких как нутлин-3а, т.к. показано, что нутлин-3 имеет низкую токсичность для животных при терапевтически эффективных схемах доз. Эти данные предполагают, что негенотоксическая активация может быть менее токсичной для организма в целом и лучше переносимой, чем генотоксическая активация p53 *in vivo*. Хотя многие исследования *in vivo* и *in vitro* ранее показали, что нутлин-3а потенциально активен и в качестве единственного агента в терапии рака, недавние исследования, показывающие возможность более эффективной комбинации нутлина-3 с другими терапевтическими соединениями, обнадеживают [48].

Птак, например, помимо эффективности монотерапии нутлином в p53 немутантных штаммах была продемонстрирована синергетическая активность нутлина-3 на различных моделях лейкемии, несущих как нативные, так и мутантные формы p53. Нутлин проявлял синергетическое действие с ингибиторами мультикиназ - дазатинибом и сорафенибом - при В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемии и модели ОМЛ за счет ингибирования пути Akt путем индукции апоптоза/аутофагии [100; 101]. Совместное применение нутлина с наночастицами, сконструированными с помощью ритуксимаба, позволило, нацеливаясь на клетки CD20+, усилить антителозависимую клеточную цитотоксичность и увеличить выживаемость у мышей с ксенотрансплантатом В-лейкемии [75; 102]. Одновременный прием нутлина с дихлорацетатом натрия приводил к увеличению экспрессии генов-мишеней P53, MDM2, PUMA, TIGAR (TP53-индуцибельный регулятор гликолиза и апоптоза) и CDKN1A [103]. Нутлин в комбинации с ибрутинибом приводил к ингибированию передачи сигналов BCR и путей выживания MAPK/PI3K [104]. Также, Нутлин-3 продемонстрировал синергетический

эффект и в комбинации с генотоксичными препаратами доксорубицином, хлорамбуцилом и флударабином на клетках В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, снижая требуемую дозировку таких препаратов [105].

Несколько исследований, в основном проведенных на гематологических злокачественных новообразованиях, предложили потенциальную терапевтическую комбинацию нутлина-3 с рекомбинантным TRAIL/Аро5к. Обоснованием для использования такой комбинации было то, что TRAIL и нутлин-3 активируют внешний и внутренний пути апоптоза соответственно, а нутлин-3 среди своих транскрипционных генов-мишеней повышал поверхностную экспрессию TRAIL-R2 [106]. Комбинация нутлина-3 с TRAIL показала синергетическую активность в индукции апоптоза в клеточных линиях p53 дикого типа, но не в лейкозных клетках ОМЛ, несущих мутацию p53 [107]. Синергическая активность Нутлин-3 в комбинации с TRAIL была впоследствии продемонстрирована также и в других гематологических злокачественных линиях и в клеточных линиях саркомы. Поскольку TRAIL проявляет умеренную цитотоксичность в отношении нормальных эритроидных клеток-предшественников *in vitro* остается установить, будет ли комбинация нутлин-3 с TRAIL иметь приемлемый токсический профиль в отношении нормального костного мозга [108]. Помимо воздействия на трансмембранный TRAIL-R2, нутлин-3 может также проявлять синергизм с TRAIL благодаря своей способности подавлять остеопротегерин (OPG), нейтрализующий рецептор TRAIL-апоптоза, который способствует адгезии лейкоэмических клеток к эндотелиальным клеткам. Таким образом данная комбинация может теоретически применяться в терапии гематологических опухолей [109; 110].

В недавнем исследовании был продемонстрирован выраженный синергетический эффект нутлина-3 и ингибитора протеасом бортезомиба, совместное применение которых позволило ингибировать рост в клетках мантийноклеточной лимфомы (МКЛ) и множественной миеломы. Интересно, что нутлин-3 проявлял синергизм с бортезомибом в клетках МКЛ, независимо от мутаций p53 и врожденной чувствительности к бортезомибу [111]. В частности, в клетках МКЛ с мутацией p53, которые по своей природе устойчивы к бортезомибу, комбинация нутлина-3 с бортезомибом индуцировала цитотоксичность посредством митохондриального апоптотического пути, что указывает на потенциальную терапевтическую эффективность комбинации этих двух препаратов для лечения химиорезистентного МКЛ [112].

Среди множества терапевтических комбинаций с другими негенотоксичными препаратами исследовали комбинацию витамина D с нутлином-3 в клетках ОМЛ, экспрессирующих p53 дикого типа [113]. Нутлин-3 не влиял на способность 1,25D(1,25-дигидроксихолекальциферола) индуцировать моноцитарную дифференцировку, но комбинация нутлин-3а с 1,25D ускоряла апоптоз ОМЛ. Также было показано, что комбинация нутлина-3а с *all-транс*-ретиноевой кислотой (АТРА) значительно усиливала активность АТРА,

индуцирующую дифференцировку в p53-нулевых клетках HL60 и p53-мутантных NB4, но не в клетках U937, содержащих не мутированный p53 [114]. Таким образом, синергетическая активность нутлина-3 в сочетании с АТРА в стимулировании клеточной дифференцировки оказалась p53-независимой. Возможно, это связано с тем, что АТРА может избирательно индуцировать экспрессию Р-гликопротеина (P-gp) в клетках HL60 и NB4, но не в клетках U937. Поскольку и нутлин-3, и АТРА действовали как транспортные субстраты Р-gp, механизм синергии в индуцировании дифференцировки комбинацией нутлина-3 и АТРА был приписан конкурентному связыванию нутлин-3 с Р-gp, что приводило к ингибированию оттока АТРА. Вероятно, именно это накопление АТРА в клетках и отвечает за устойчивую дифференцировочную активность комбинации нутлина-3 и АТРА [115].

Нутлин-3 продемонстрировал также синергетическую цитотоксическую активность в сочетании с ингибитором тирозинкиназы BCR/ABL иматинибом [116], который является препаратом выбора для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и острого лимфобластного лейкоза с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+). Поскольку рецидивы с появлением мутаций резистентности к иматинибу в киназном домене BCR/ABL представляют серьезную проблему, важно отметить, что нутлин-3 резко усиливал апоптоз, индуцированный иматинибом, в различных клеточных линиях, экспрессирующих BCR/ABL, включая первичные лейкозные клетки пациентов с бластным кризом CML или Ph+ ВСЕ. Лечение иматинибом существенно не влияло на индуцированную нутлином-3 экспрессию p53, но снижало активность p21. Кроме того, активация Вах, а также каспазы-3, индуцированная комбинированным лечением иматинибом и нутлином-3, наблюдалась преимущественно в клетках, экспрессирующих p21 на пониженных уровнях [117].

В терапии солидных опухолей добавление имидазолиновых ингибиторов p53-MDM2 к классической химиотерапии или рекомендованной таргетной терапии также имеет терапевтический смысл. Так было показано, что на мышинных моделях Нутлин-3 в комбинации с ингибиторами киназы Аигога А способствует иммуноопосредованной эрадикации опухоли в моделях ксенотрансплантатов [118]. Таким образом, несмотря на то, что исследования комбинаций MDM2-p53 ингибиторов с другими негенотоксическими препаратами пока немногочисленны, все они показывают интересные и перспективные результаты.

Также на модели рака груди была доклинически подтверждена эффективность использования нутлина-3 и в комбинации с генотоксическими препаратами, например, с карбоплатином в гуманизированной ортотропной модели метастазирования в легкие [119] и паклитакселом против агрессивных заболеваний, таких как рак молочной железы человека базального типа и дефицитом Numb. Так, комбинация нутлина-3 с паклитакселом в моделях ксенотрансплантата, полученного от пациента, показала стойкое ингибирование роста опухоли и

предотвращение рецидива опухоли, вызванного раковыми стволовыми клетками, после отмены химиотерапии [120; 121]. Нутлин-3 также показал синергизм цитотоксичности с ингибиторами циклинзависимой киназы. Было доказано, что комбинация росковитина и нутлина-3 продемонстрировала синергию в активации p53 и стимулировании p53-зависимого апоптоза в ряде опухолевых клеток дикого типа p53, включая меланому, карциному толстой кишки, молочную железу, клетки аденокарциномы и гепатокарциномы [122]. Молекулярная основа этой комбинированной терапевтической активности заключается в том, что использование ингибиторов CDK сильно усиливает нутлин-3-зависимую индукцию p53.

2.1.7. Клинические испытания нутлинов

Молекула RG7112 (RO5045337) от Roche была первым и пока единственным ингибитором MDM2, прошедшим клиническую оценку. Сводные данные с клиническими испытаниями для данного препарата приведены ниже в таблице 5. Данное соединение представляет собой результат оптимизации исходных соединений (нутлины-1,2,3).

Первоначальная клиническая оценка была проведена на липосаркоме с амплификацией MDM2 в исследовании Европейского сообщества (номер EudraCT: 2009-015522-10) по фармакодинамике RG7112. Несмотря на некоторую эффективность и доклинические испытания *in vivo*, показывающие возможность RG7112-опосредованного ингибирования активации MDM2 и p53, в данном клиническом испытании было выявлено несколько клинических нежелательных явлений, включая гематологическую токсичность, что затрудняет длительное лечение препаратом RG7112 [123]. В исследовании фазы I на пациентах с развитыми солидными опухолями оценивались протоколы доз и лечения, показывающие, что, хотя RG7112 в целом хорошо переносился, более эффективный график с точки зрения адекватной активации опухоли P53 был так или иначе связан с повышенной гематологической токсичностью [124]. RG7112 также прошел клиническую оценку в рамках клинического исследования фазы I, включающего различные типы гематологических злокачественных новообразований, а именно: рецидивирующий/рефрактерный острый миелодный/лимфобластный лейкозы (ОМЛ, ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), а также ХЛЛ и мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (мХЛЛ). RG7112 показал достаточную клиническую активность, чтобы привести к стабилизации P53 и транскрипционной активации генов-мишеней p53 у пациентов с крайне неблагоприятным прогнозом (рецидивирующий рефрактерный) и у пациентов с ХЛЛ /мХЛЛ. Что касается потенциальных молекулярных биомаркеров, обработка RG7112 привела к повышенной экспрессии нескольких генов-мишеней p53, включая BAX, PUMA, FDXR, MDM2, ZMAT3, FAS, TNFRSF10B, CDKN1A и TP53NP1, в циркулирующих лейкозных клетках дикого типа p53 с

различной кинетикой активации. Для ОМЛ корреляция между экспрессией MDM2 и индукцией апоптоза была установлена *in vitro* с нутлин-3а [95] и подтверждена в первом испытании RG7112 при ОМЛ [52]. Также при ОМЛ введение RG7112 показало клиническую активность в качестве монотерапии, особенно при рецидивирующем/рефрактерном ОМЛ, когда у некоторых пациентов достигалась полная ремиссия и гематопоэтическое восстановление, позволяющее провести последующую трансплантацию [124], а также за счет комбинации RG7112 с цитарабином, что позволяет предположить, что комбинации с другими терапевтическими агентами могут приводят к синергетическому эффекту. Хотя RG7112 продемонстрировал клиническую активность у пациентов с ОМЛ и хронической лимфоцитарной лимфомой/мелкоклеточной хронической лимфоцитарной лимфомой, он также показал ограниченную переносимость [52].

Таблица №5. Клинические испытания RG7112

Фаза испытания	Диагноз	Дополнительная терапия	Статус испытания	ID испытания
I	Гематологические новообразования		Завершено	NCT00623870
I	Липосаркомы		Завершено	NCT01143740
I	Солидные опухоли		Завершено	NCT01164033
I	Саркома мягких тканей	Доксорубицин	Завершено	NCT01605526
I	Острый миелоидный лейкоз	Цитарабин	Завершено	NCT01635296
I	Опухоли поздней стадии		Завершено	NCT01677780
I	Солидные опухоли поздней стадии		Завершено	NCT00559533

Проявления гематотоксичности при лечении RG7112 не были неожиданными, поскольку MDM2 играет роль в нормальном кроветворении. Действительно, доклинические исследования показали, что антагонисты MDM2 вызывают серьезные гематопоэтические дефекты и ингибирование мегакариопоэза, что может объяснить значительное подавление в костном мозге лейкемических и нормальных предшественников у пациентов после лечения. Высокие дозы, необходимые для получения клинического эффекта, вместе с увеличением гематотоксических эффектов (например, нейтропения, тромбоцитопения, включая сепсис и кровотечение) и желудочно-кишечной токсичности из-за потери энтероцитов, сделали необходимым дальнейшую оптимизацию данных ингибиторов для достижения большей селективности, растворимости в воде и эффективности. На данный момент клинические испытания с RG7112 приостановлены [125].

2.2. Синтез производных имидазолинов

2.2.1. Синтетическая стратегия получения имидазолиновых производных семейства нутлинов

Структура группы нутлинов представляет собой полностью замещенный имидазолин-1,3, в положениях 2, 4 и 5 которого находятся арильные заместители, а при атоме азота расположен алифатический заместитель с амидо, гидрокси или сульфо группами (рис.9) [48]. Важной особенностью структуры является строгое *цис* положение арильных заместителей в положениях 4 и 5, что значительно ограничивает и усложняет синтетические подходы к подобным соединениям. Более того, модифицированный по атому азота 2,4,5-трисарилимидазолин обладает оптической активностью (причем один изомер для нутлина 3 в 200 раз эффективнее ингибирует p53-МДМ2 взаимодействие [48]).

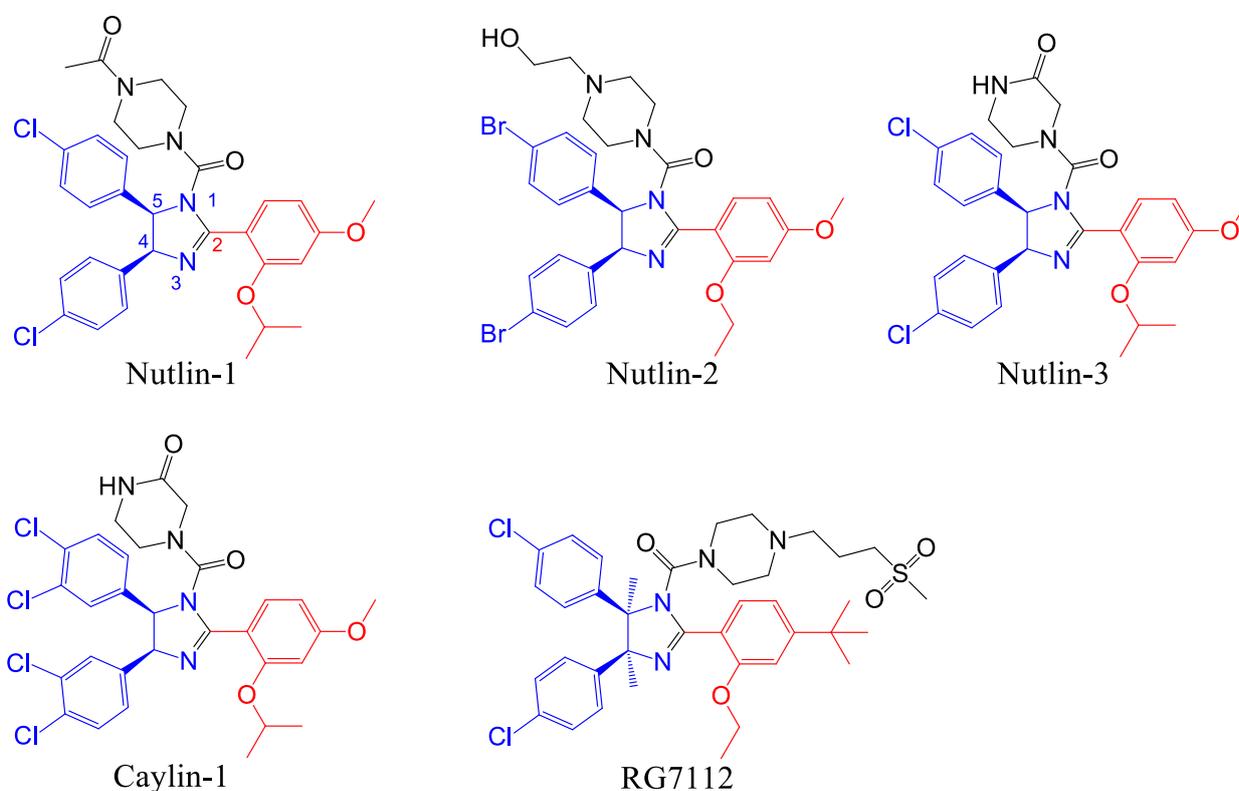


Рисунок №9. Структуры ингибиторов p53/MDM2 взаимодействия семейства нутлинов. Синим, красным, черным цветом обозначены одинаковые синтетические фрагменты молекулы.

Арильные заместители в положениях 4 и 5 в большинстве структур семейства нутлинов являются идентичными, таким образом логичным подходом является использование вициального диамина с заданной конфигурацией на начальном этапе синтеза [126]. И действительно, в большинстве работ по синтезу структур семейства нутлинов исходным соединением является именно вициальный этилендиамин (рис 10).

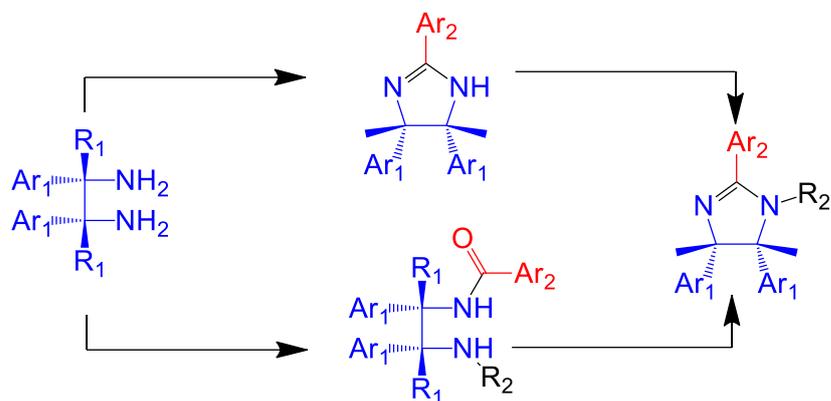


Рисунок №10. Два подхода к созданию модифицированного имидазолина из вициального диаминa.

Дальнейшая стратегия синтеза основана на модификации вициального диаминa и успешно реализована двумя путями (рис 2):

1. Получение имидазолина из вициального диаминa с последующей модификацией имидазолинового ядра.
2. Селективная модификация амина с последующей циклизацией моноамида в имидазолин.

Далее будут рассмотрены преимущества и недостатки каждого из этих синтетических подходов, однако вначале необходимо рассмотреть синтез вициальных 1,2-диарилэтилендиаминoв как начальной структуры для синтеза.

Существует большое количество стереоселективных методов синтеза вициальных этилендиаминoв. Однако, значительная часть этих методов направлена на получение соединений с замещенными аминoгруппами, в то время как получение немодифицированных по атомам азота аминoв является более сложной задачей. Все методы можно разделить на следующие группы: одновременное введение двух аминoгрупп; введение одной аминoгруппы в дополнение к имеющейся; преобразование соединений, уже содержащих два атома азота в нужных положениях (восстановление азотсодержащих соединений); методы с образованием связи C_1-C_2 (сдваивание иминов, оксимов и т.д.; реакция аза-Анри; перегруппировка диаза-Коупа).

2.2.2. Синтез вициальных диаминoв с одновременным введением двух аминo групп

Реакция *син*-гидроксилирования *транс*-алкенов (или *анти*-гидроксилирования *цис*-алкенов) с последующим замещением гидроксильных групп азотсодержащими нуклеофилами и их дальнейшим восстановлением довольно широко используется в синтезе *трео*-изомеров вициальных диаминoв, в то время как для получения *эритро*-изомеров этот метод практически не используется [127–129]. Наличие хиральных реагентов позволяет проводить эту реакцию энантиоселективно.

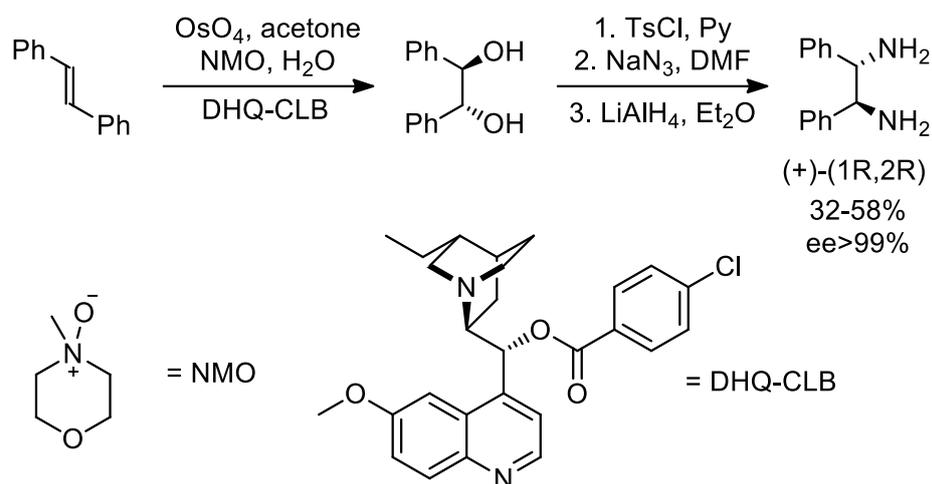


Схема №1. Синтез трео-диаминов из вицинальных диолов.

Для перевода гидроксильной группы в хорошую уходящую группу помимо модификации с помощью тозилхлорида можно использовать SOCl_2 . Данная реакция может проходить через циклическое промежуточное соединение в зависимости от условий реакции. На второй стадии цикл раскрывается под действием нуклеофила с последующим нуклеофильным замещением второй гидроксильной группы и восстановлением, как в способе выше [130].

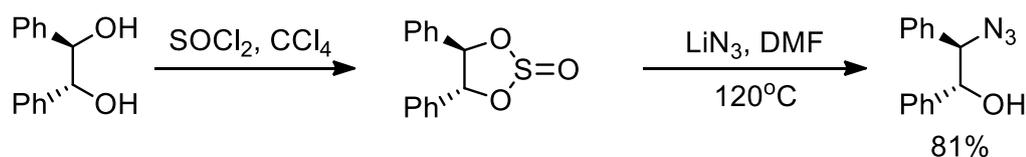


Схема №2. Альтернативный синтез трео-диаминов из вицинальных диолов.

Разумеется, в подобного рода методах можно варьировать первую стадию получения спиртов [131], либо использовать галогенсодержащие соединения [132] или другие реагенты в качестве прекурсоров, но существенных отличий от описанного метода во второй стадии нет.

Одновременное введение двух аминогрупп можно производить с помощью присоединения азидов к алкенам с возможным дальнейшим восстановлением до аминов [133–137]. Так, восстановление проводят водородом на катализаторе Линдлара соответственно (схема №3, [133]) или с помощью алюмогидрида лития [135; 137].

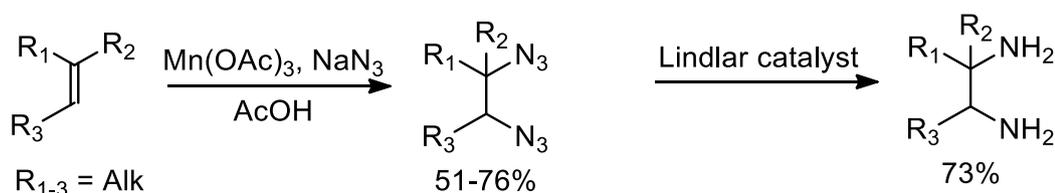


Схема №3. Синтез диаминов из алкенов путем присоединения азидов с последующим восстановлением.

В другом методе аминирования алкенов реагентами выступают оксид азота (II) и его комплекс с кобальтом. На первой стадии этого метода происходит *син*-присоединение комплекса кобальта

через атомы азота NO. После чего промежуточное соединение восстанавливают алюмогидридом лития [138].

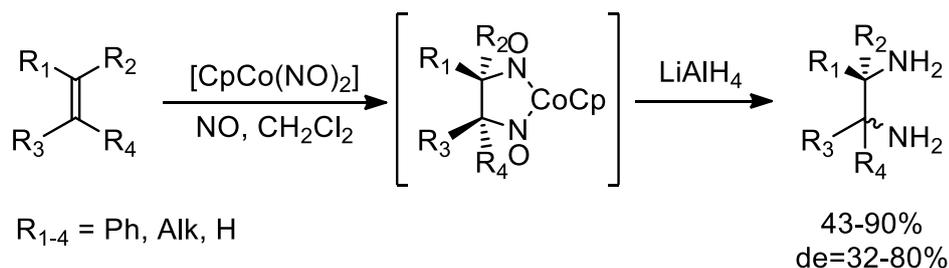


Схема №4. Синтез диаминов из алкенов с использованием комплекса кобальта.

Более современные методы позволяют использовать сульфонамиды в качестве источников азота [139]. Данные методы также предполагают удаление защитных групп, хотя в работе [139] они не приведены, несмотря на то, что авторы позиционируют метод как синтез вициальных диаминов (схема №5). В отличие от предыдущей работы, в работе [140] описано удаление защитных групп, причем двухэтапное (схема №6).

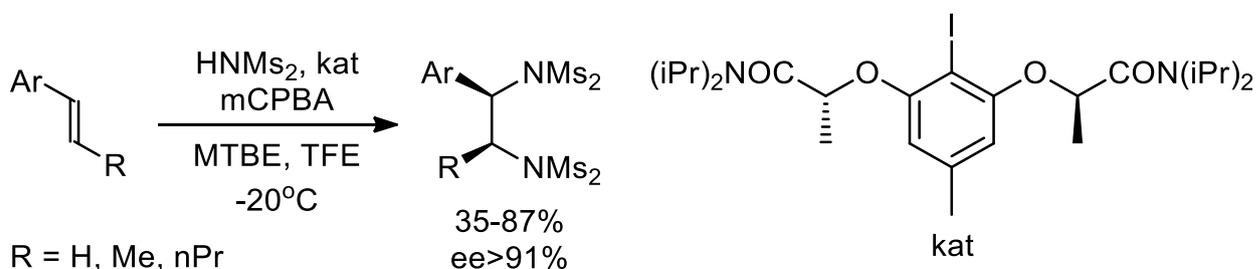


Схема №5. Синтез диаминов из алкенов с использованием йод-содержащего катализатора.

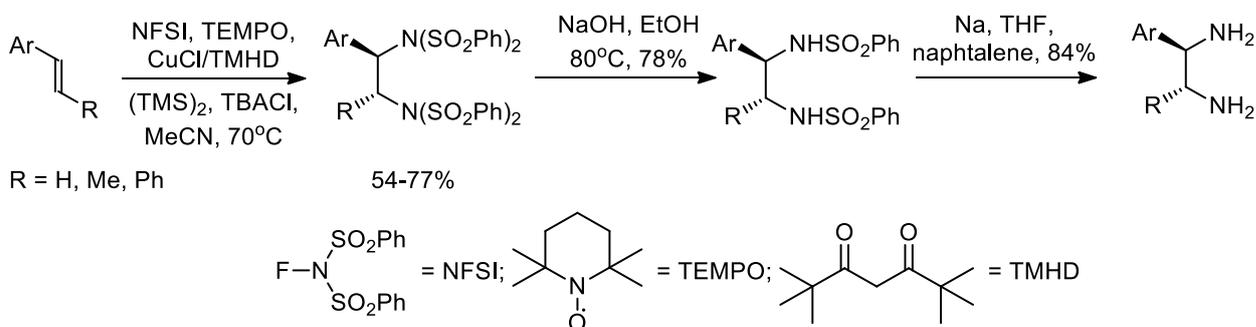


Схема №6. Синтез диаминов из алкенов с использованием меди и йод-содержащего катализатора.

2.2.3. Синтез диаминов: введение одной амино группы

Многие реакции такого типа аналогично предыдущей группе представляют собой нуклеофильное замещение. Такие реакции отличаются от предыдущих лишь тем, что в исходном соединении уже присутствует одна амино группа, а в соседнем положении от нее находится уходящая группа. Исходными веществами здесь могут быть β-аминоспирты [130], и β-галогеналкиламины.

В методе, представленном в последовательных работах [141–143], диамин получают из алкенов. На первой стадии под действием NBS происходит антиприсоединение цианамида и брома (схема 7). При обработке продукта солянокислым этанолом происходит образование производного изомочевины, которое далее под действием триэтиламина нуклеофильно замещает бром, образуя 2-этоксиимидазолин. Для раскрытия такого цикла использованы очень жесткие условия: щелочной гидролиз в запаянной трубке при нагревании до 140°C. Поэтому в более поздних работах метод модифицировали, заменив стадию обработки солянокислым этанолом на восстановление на палладиевом катализаторе. Полученный имидазолин легко подвергается гидролизу разбавленной щелочью.

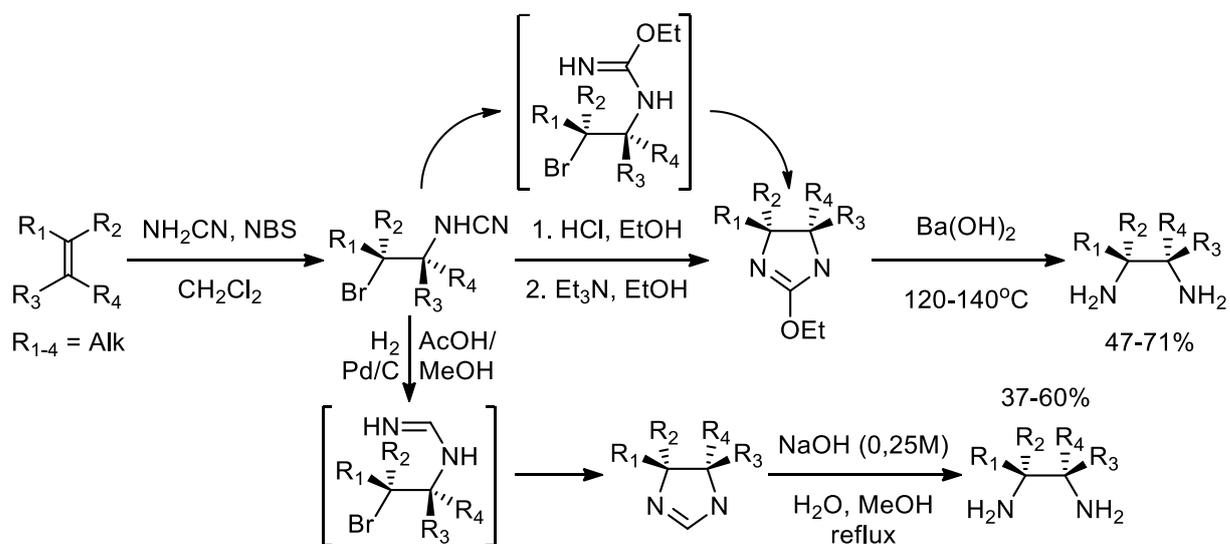


Схема №7. Синтез диаминов из β -бромалкилцианамидов.

В статье [144] синтез диаминов осуществляется из бромфосфорамидатов, получаемых реакцией алкенов с диэтил-N,N-дибромфосфорамидатом (схема №8). Вторая амино-группа вводится путем нуклеофильного замещения брома азидом. Реакция протекает стереоселективно лишь для циклоалкеновых субстратов. Для стереоселективности реакциям с нециклическими субстратами авторы поменяли местами стадии гидролиза и нуклеофильного замещения, но продемонстрировали это лишь на одном примере. Стереоселективность модификации авторы объяснили азиридиновым переходным состоянием.

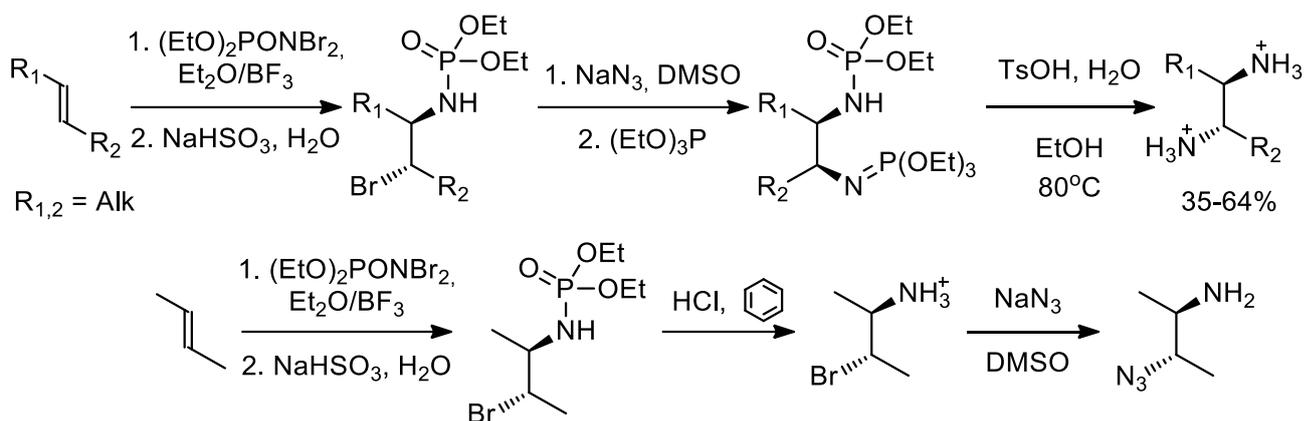


Схема №8. Синтез диаминов из бромфосфорамидатов.

Азиридины являются еще одним прекурсором для получения диаминов. В литературе можно найти широкий спектр субстратов для проведения данной реакции [145–149]. Раскрытие азиридинов проводится в относительно мягких условиях различными азотсодержащими нуклеофилами, чаще всего азидами или аминами. Стереохимия продукта зависит от конфигурации исходного вещества: из *транс*-азиридинов получают *эритро*-диамины, а из *цис*-азиридинов – *трео*-диамины, причем региоселективность реакции зависит от заместителей: чем сильнее они различаются, тем выше региоселективность. Поскольку реакции с азиридинами мало отличаются друг от друга можно продемонстрировать их на общей схеме 9.

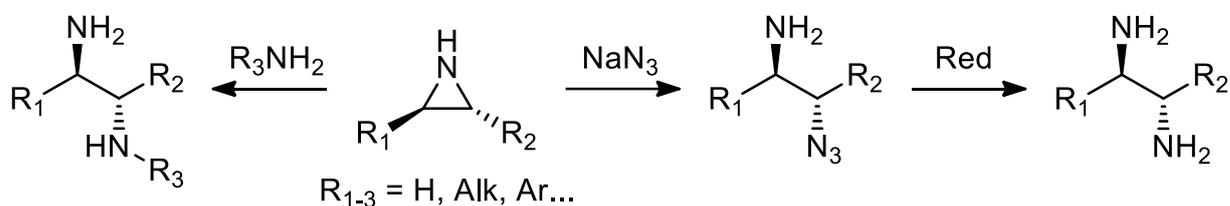


Схема №9. Общая схема синтеза диаминов из азиридинов.

2.2.4. Синтез диаминов из азотсодержащих соединений

Основу данного метода составляют реакции восстановления азотсодержащих соединений. Некоторые из них, в частности различные методы восстановления азидов, уже были рассмотрены в предыдущих разделах. Отличием методов, представленных в данном разделе, будет наличие в исходных веществах кратных связей C=N.

Восстановительное аминирование дикетонов – это старый и эффективный метод синтеза диаминов. Для получения преимущественно *трео*-диаминов авторы разных статей использовали одинаковый набор реагентов [150–152]. На стадии аминирования дикетонов образуется циклический диимин, который затем восстанавливают литием в жидком аммиаке до соответствующего имидазолидина, после чего проводят кислотный гидролиз [152] (схема №10).

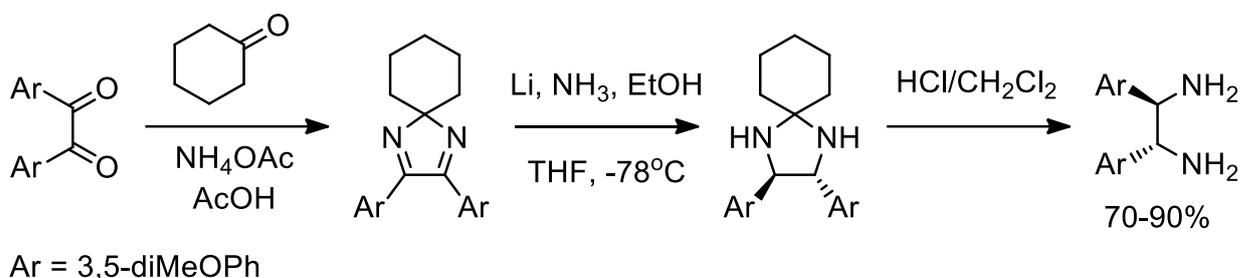


Схема №10. Синтез *транс*-диаминов из спироиминов.

Похожий метод - присоединение металлоорганических соединений к имидам глиоксаля. В статьях для синтеза хиральных лигандов использовали реагенты Гриньяра [153; 154]. Однако представлен новый метод, отличием которого является исключительная стереоселективность, достигаемая использованием спироциклической формы диимина глиоксаля [155]. Получение циклогексилиденовых производных 1,2-*транс*-этилендиаминов достигнуто с использованием литий-органических соединений с высокими выходами (свыше 70% во всех случаях, кроме нафталина). Финальный продукт получали кислотным гидролизом защитной группы (схема 11).

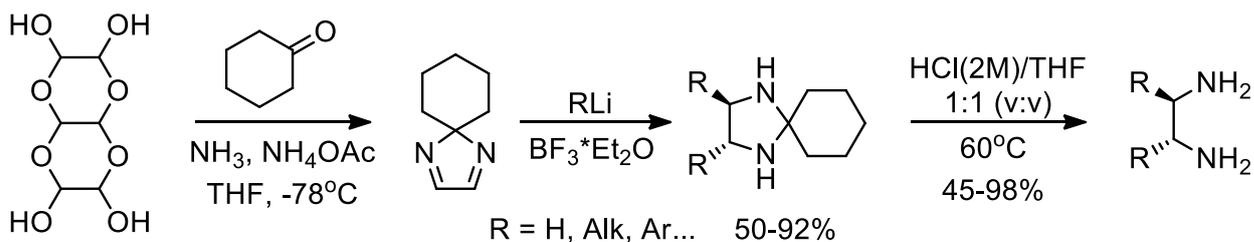


Схема №11. Синтез *транс*-диаминов из спироиминов.

Восстановление диоксимов дикетонов с помощью NaBH_4 проходит нестереоспецифично [136]. Однако, на одном примере продемонстрирована методика восстановления, обеспечивающую стереоселективность 5:1 с преимущественным образованием *эритро*-изомера за счет координации диоксима ионом Ti^{4+} (схема 12) [156].

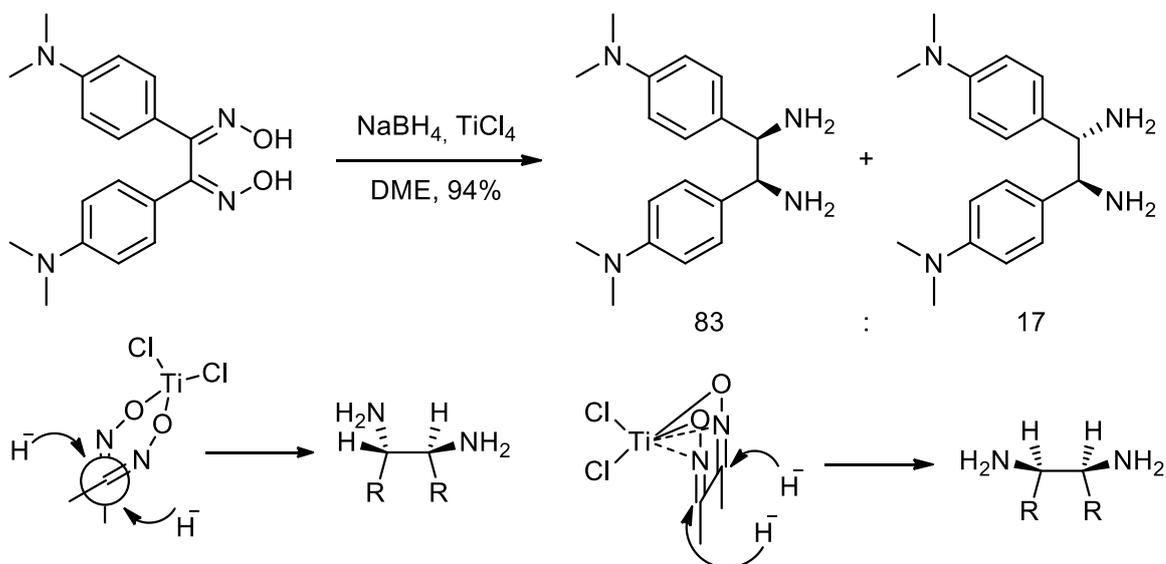


Схема №12. Синтез диаминов из диоксимов с использованием TiCl_4 .

Восстановительное аминирование можно проводить и с α -аминокетонами и альдегидами. Например, получены amino аналоги адреналина, норадреналина и эфедрина из адреналона гидрохлорида и изоцианата калия с последующим восстановлением палладием на угле [157]. Разработан стереоселективный метод синтеза *эритро*- или *трео*-диаминов из иминов, полученных из α -аминокислот [158] (схема №12). Почти аналогичным образом синтез монозамещенных диаминов может производиться из амидов аминокислот [159].

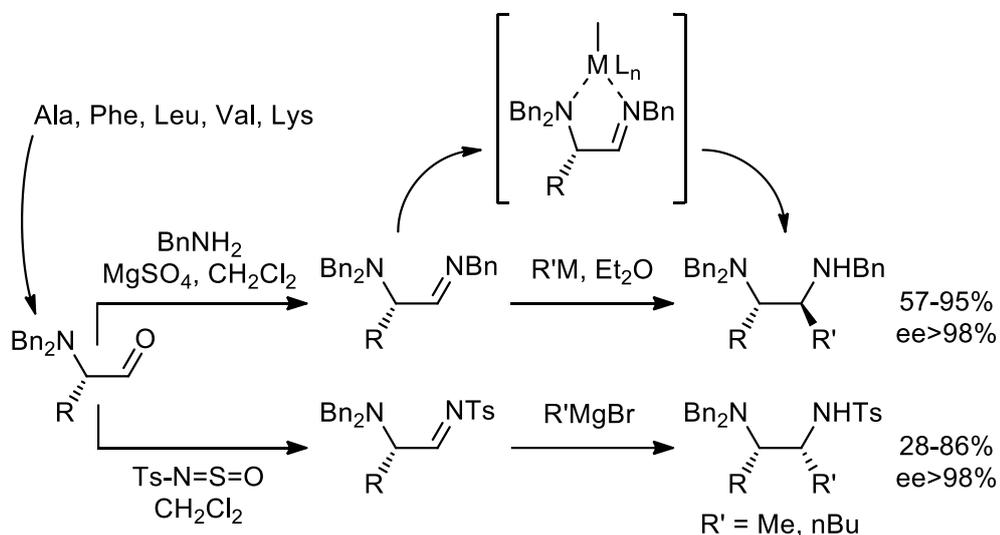
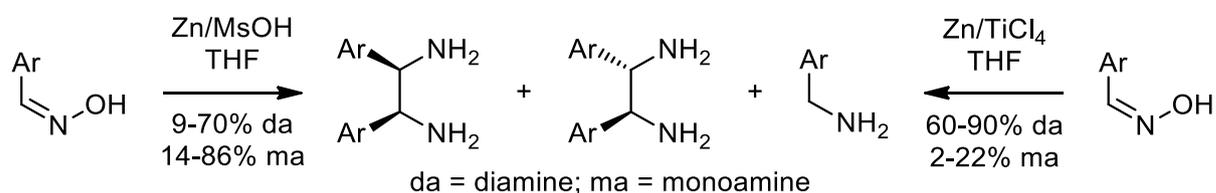


Схема 13. Синтез диаминов из L-аминокислот.

2.2.5. Синтез диаминов с образованием новой $\text{C}_1\text{-C}_2$ связи

Основными представителями этого типа реакций являются реакции сдвигания различных соединений, позволяющие стереоселективно получать симметричные *эритро*- и *трео*-диамины.

Реакции восстановительного сдвигания иминов, оксимов, азинов и гидразонов в общем случае проходят под действием металлов (Zn, Cu, Mg, Sm). В зависимости от условий преобладающим продуктом может быть как *мезо*-форма диамина, так и рацемическая смесь энантиомеров. Побочными продуктами реакции являются моноамины. Например, амины синтезируют из оксимов и азинов в присутствии Zn с добавками метилсульфокислоты или хлорида титана (IV) [160]. Авторы показали, что при использовании MsOH с небольшим перевесом преимущественно образуется мезоформа, с акцепторными и пространственно-затрудненными арильными заместителями резко возрастают выходы моноаминов и падает стереоселективность. В то же время при использовании хлорида титана практически полностью подавляется образование моноамина (<7% во всех случаях кроме Me₂N-Ph), возрастает общий выход диаминов, но теряется стереоселективность (Схемасхема 14). С некоторыми другими системами реагентов удавалось достичь более высокой стереоселективности [161–165].



Ar = 4Me-Ph, 4MeO-Ph, 4NC-Ph, 4Me₂N-Ph, naphthyl.

Схема 14. Пример восстановительного сдвигания оксимов.

Дальнейшее развитие идея сдвигания азотных производных получила в методах с применением реакций аза-Манниха и аза-Анри. Эти методы в отличие от своих предшественников позволяют получать несимметричные диамины. В одном из наиболее современных методов в реакции аза-Манниха главными реагентами являются бензилизоцианиды и *N*-дифенилтиофосфиноилимины [166]. При оптимизации условий реакции авторы исследовали влияние различных лигандов и иминов, остановившись в итоге на комбинации, представленной на схеме (схема 15). Наилучшие выходы и соотношения стереоизомеров были получены для соединения с фенильным, 4-метоксифенильным и фурильным заместителями.

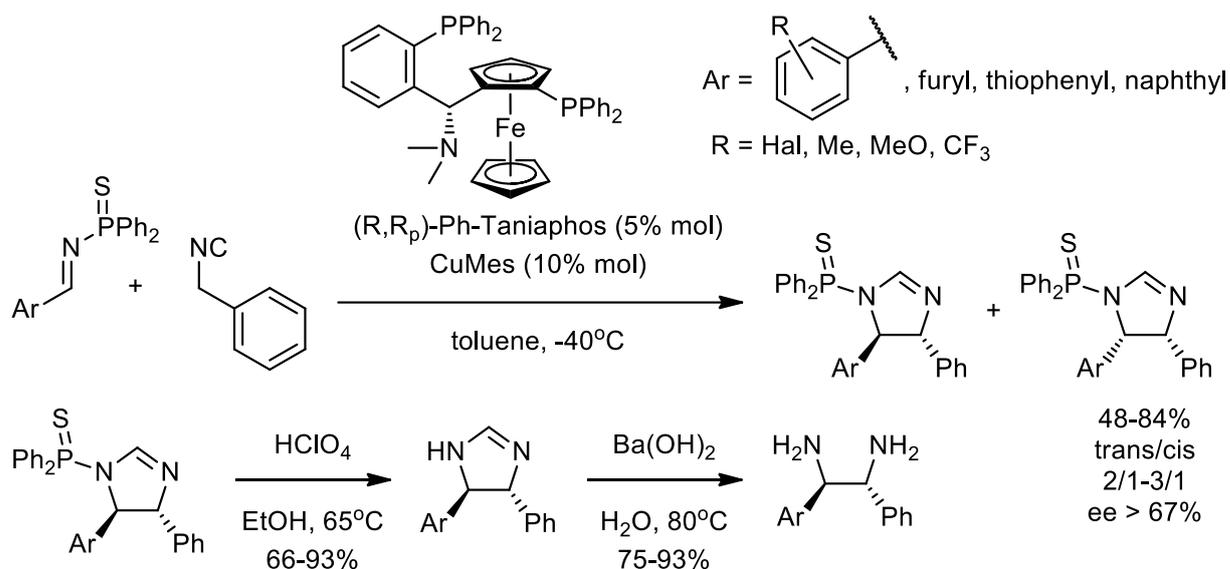


Схема 15. Синтез диаминов с использованием реакции аза-Манниха.

В реакцию аза-Анри вступают защищенные имины и нитросоединения [167–169], также существует модификация с применением вместо иминов амидосульфонов [170]. Требуемая стереоселективность достигается использованием различных катализаторов, в приведенном на примере (схеме 16) синтеза в этой роли выступают бисамидины [169]. Результатом реакции являются 1-амино-2-нитросоединения. Для получения искомым аминов в этих соединениях восстанавливают нитрогруппу и снимают защиту с аминогруппы. Этот метод является в настоящее время весьма популярным при синтезе нутлинов.

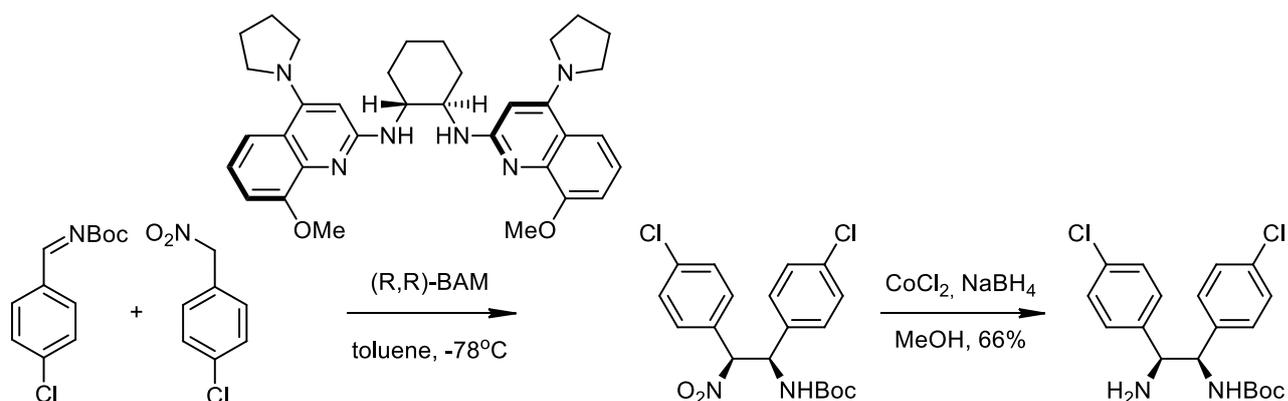


Схема 16. Синтез *эритро*-этилендиаминов с использованием реакции аза-Анри.

Метод получения вициальных диаминов из имидазолинов с соответствующей конфигурацией был продемонстрирован на единственном примере, исходным веществом в котором был бензальдегид (схема 17) [171]. При действии на бензальдегид аммиака на первой стадии образуется тример - гидробензамид, который затем в ходе дисротаторной электроциклической реакции, инициированной сильным основанием, превращается в *цис*-имидазолин. Этот имидазолин затем восстанавливается и гидролизуется с получением *эритро*-диамина.

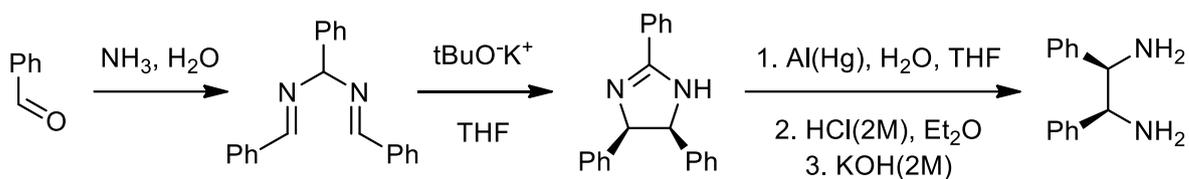


Схема 17. Синтез *эритро*-диаминов из имидазолинов, полученных электроциклизацией.

Частным случаем данной реакции является *эритро*-диамин, являющийся продуктом взаимодействия альдегида с ацетатом аммония. Этот продукт получается в результате дальнейшего раскрытия образующегося имидазолинового цикла под действием альдегида в кислой среде. Данная реакция была широко исследована различными научными группами [63; 68; 172–174] и используется в одном из современных методов синтеза нутлинов (схема 18) [175].

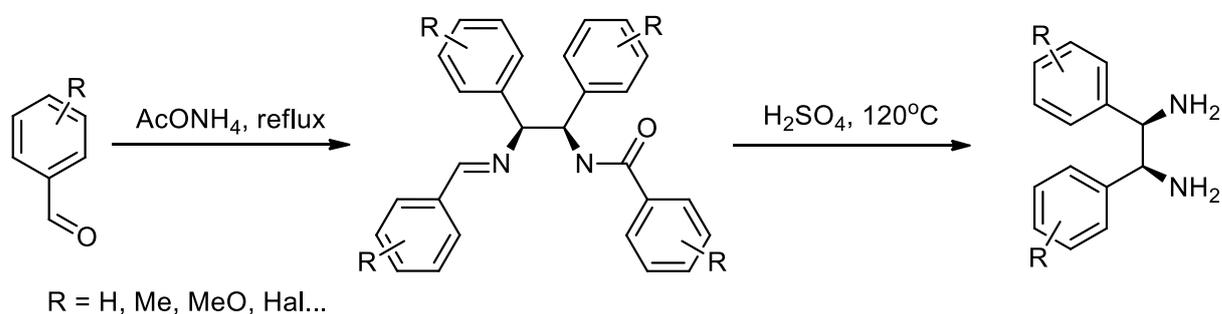


Схема 18. Синтез *эритро*-диаминов из альдегидов с использованием ацетата аммония.

Последний из методов, который следовало бы упомянуть – перегруппировка диаза-Коупа ди(2-гидроксифенил)диаминов с известной конфигурацией [176]. Это достигается взаимодействием исходного «материнского» диамина с альдегидами. В результате образуются «дочерние» диамины той же конфигурации (схема 19). Данный метод широко используется в синтезе нутлинов.

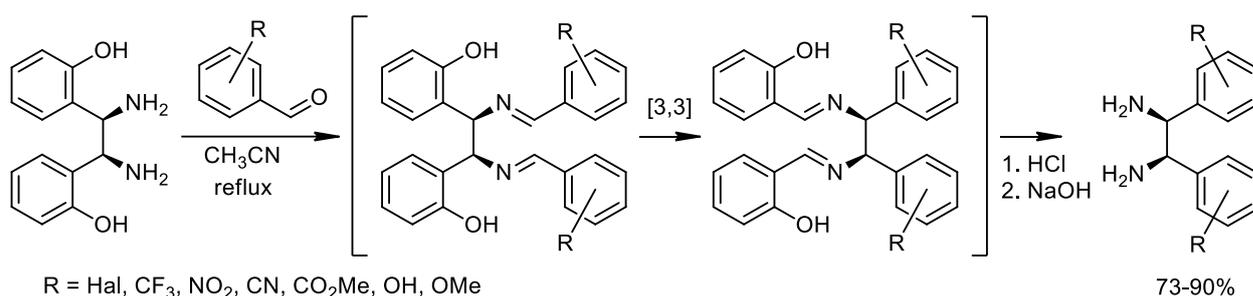


Схема 19. Синтез *эритро*-диаминов с использованием перегруппировки диаза-Коупа.

2.2.6. Синтез имидазолинов из вицинальных диаминов

Данный подход представляет собой получение имидазолинового ядра реакцией диаминна с карбоксильными или карбонильными производными. Различные синтетические подходы представлены на схеме 20 и в таблице №6.

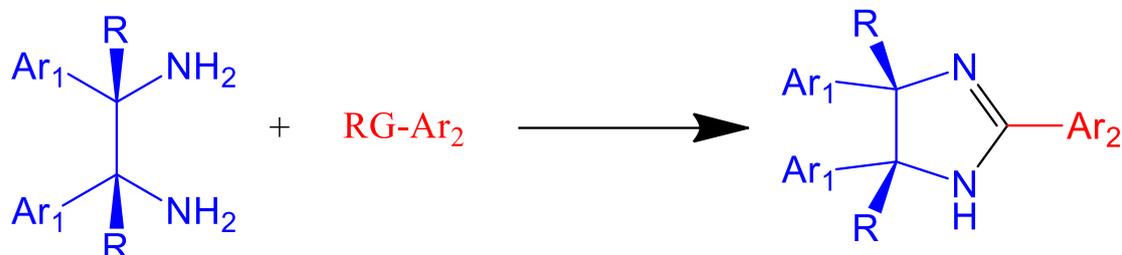
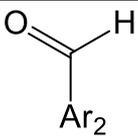


Схема 20. Синтетический подход к имидазолиновым производным из вицинальных диаминов.

Таблица №6. Синтетические подходы синтеза имидазолинов из вицинальных диаминов.

Карбоксильная или карбонильная компонента (RG-Ar ₂)	Условия реакции	Выход, %	Выход, г	Источник
	кипячение в этаноле	до 71	1-10	US 2003/0153580[177]
	Al(Me) ₃ 90°C, толуол	до 80	51,5	WO 2005/110996[178]
	B(OH) ₃ , кипячение в ксилоле	до 88	15100	Lianhe Shu[179]

	NBS, хлористый метилен, 20°C	до 94	0,35	Hu[63; 180]
---	---------------------------------	-------	------	-------------

Из анализа литературных данных по этой стадии можно отметить следующие закономерности:

1. В ранних работах в качестве карбоксильной компоненты используются преимущественно эфиры или производные нитрилов. Вероятно, это связано с отсутствием на тот момент более простых и эффективных методов синтеза.
2. В работе по масштабированию синтеза имидазолиновой структуры авторы закономерно уходят от сложных промежуточных производных и пожароопасных катализаторов, оптимизируя методику с использованием карбоновой кислоты.
3. В дальнейших работах по синтезу аналогов нутлинов в качестве исходных реагентов используются преимущественно альдегиды в совокупности с окислителем из-за доступности (получение 2,4-алкоксибензальдегидов возможно путем формилирования резорцина по Вильсмейеру-Хааку с последующей селективной модификацией гидроксильных групп) и простоты проведения реакций.

2.2.7. Модификация имидазолинов по атому азота в синтезе производных нутлина

Можно выделить четыре направления модификации атома азота (схема 21). Одной из наиболее популярных модификаций имидазолинового фрагмента для производных группы нутлина является создание линкера между атомом азота имидазолина и азотом водорастворимого заместителя с помощью мочевиного фрагмента. В качестве полупромышленного метода в оригинальных работах, посвященных нутлину, для этого используется фосген. Для лабораторного синтеза и последующей наработки серии веществ может быть использован более удобный в работе и менее токсичный аналог – трифосген. При разработке нутлина также были использованы и другие методы модификации, например, хлорангидриды или карбоновые кислоты в присутствии активаторов для синтеза амидных производных; возможен способ модификации с использованием производных бензилбромидов. Все способы модификации имидазолиновой структуры в работах по синтезу производных нутлина представлены в таблице №7.

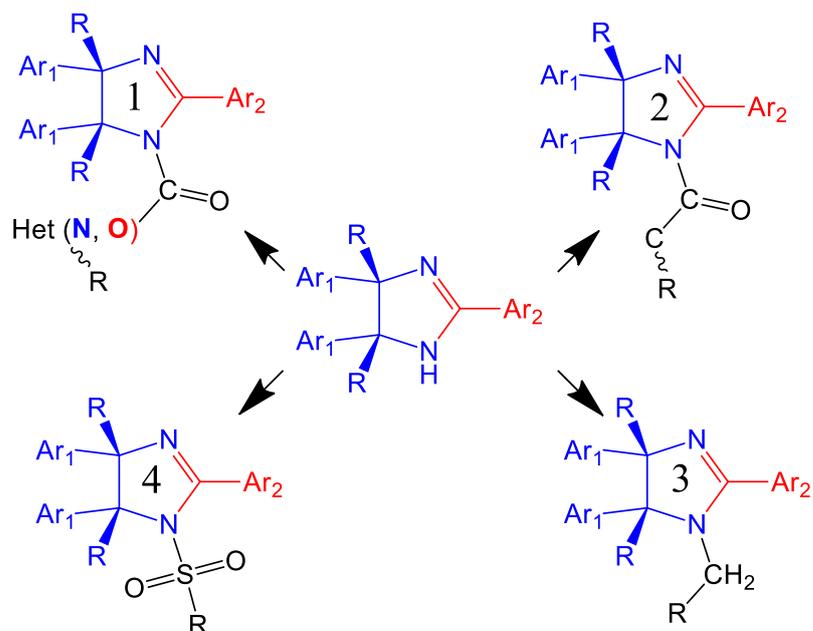


Схема №21. Возможные модификации азота при синтезе нутлинов.

Таблица №7. Модификации азота при синтезе нутлинов.

Тип продукта	Модифицирующий фрагмент	Условия реакции	Выход, %	Источник
1	COCl ₂ , (затем амин или спирт)	Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ или ТГФ	до 90	[177; 180]
1	CCl ₃ COCCl ₃ , (затем амин или спирт)	Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂	до 90	[63]
2	RCOCl (R=Alk)	Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂	-*	[177]
2	RCOOH (R=Alk)	Et ₃ N, ДМФА, пропилфосфоновый ангидрид	-*	[181]
3	ArCH ₂ Br	ДМФА, Cs ₂ CO ₃	-*	[181]
4	RSO ₂ Cl (если R содержит галоген, его замещают амином)	Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂	46	[182]
-* выход не указан в документе				

Отдельно стоит упомянуть разделение полученных изомеров, так как модифицированный имидазолин по атому азота обладает хиральностью. Разделение проводится с помощью коммерчески доступных хроматографических картриджей (преимущественно Chiralcel OD) [183].

2.2.8. Модификация вицинального диамина с последующим замыканием имидазолинового цикла

Стратегия синтеза, предполагающая поэтапную модификацию диамина с последующим замыканием имидазолинового цикла была впервые реализована для диамина, получаемого реакцией аза-Генри из имида и нитроалкана [168; 183]. Преимущество данного синтетического подхода заключается в возможности варьирования заместителей Ar_1 и Ar_2 , что являлось нетривиальной задачей для предыдущей стратегии (хотя несимметричный диамин может быть получен и при перегруппировке диаза-Коупа и также использовался в синтезе аналогов нутлина [177]). Кроме этого, данный метод позволяет сразу получать защищенный необходимый амин с высоким диастереомерным соотношением (200 к 1) и энантиомерным избытком (91% и 99% после перекристаллизации). Одним из недостатков метода является многостадийность в сравнении с оригинальными и оптимизированными методами синтеза нутлинов, и, кроме этого, использование низкотемпературных реакций. Суммарный выход метода составляет 44% без учета синтеза имида (схема 22).

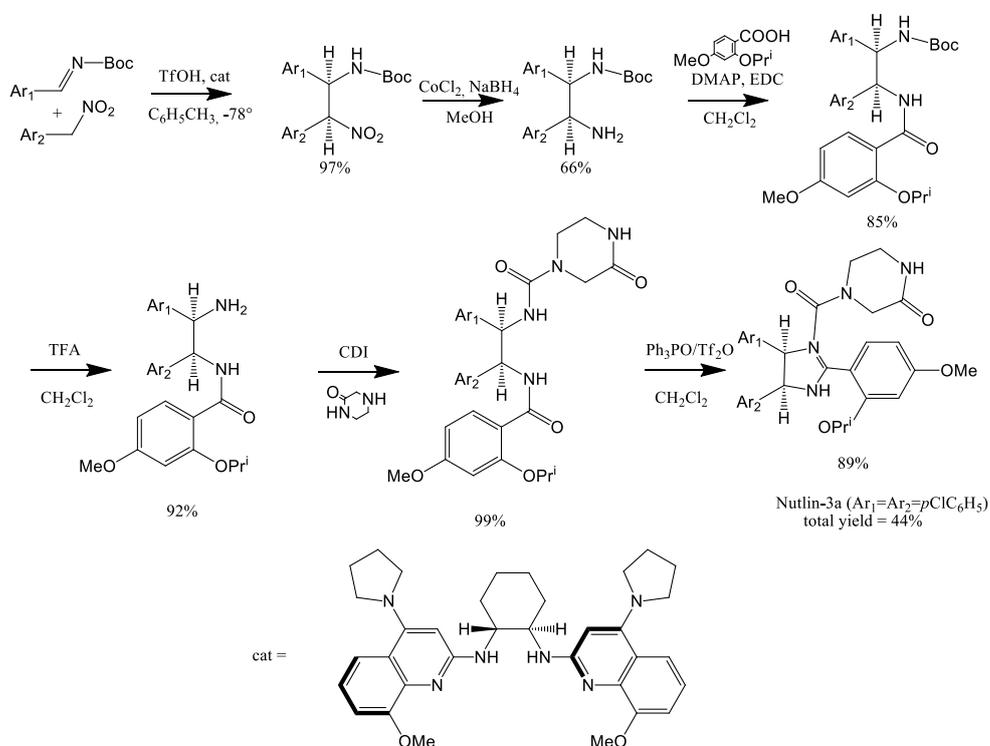


Схема 22. Альтернативный синтез нутлина (метод по реакции аза-Генри).

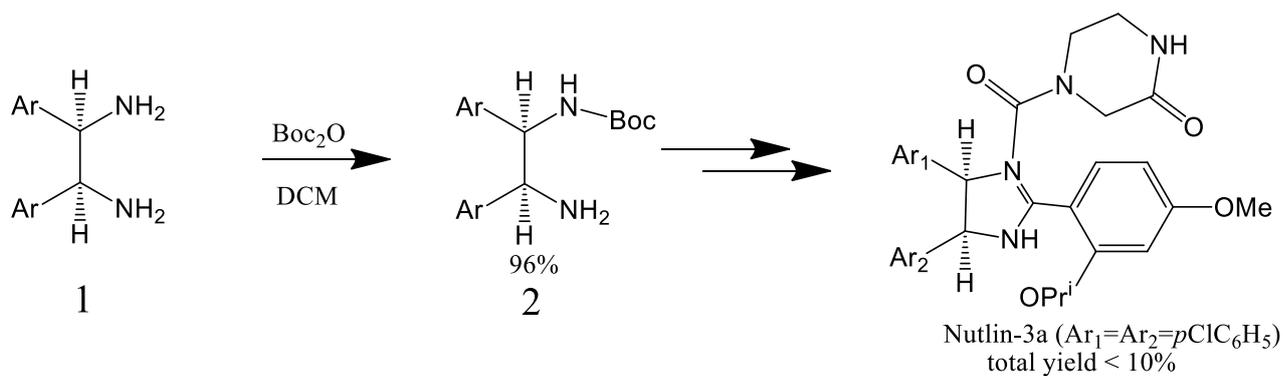


Схема 23. Поэтапная модификации диаминов.

В вышеупомянутом способе стереоселективность достигается путем применения хирального катализатора на этапе сдваивания с последующим восстановлением нитрогруппы, тем самым моно защищённый диамин получается строго заданной конфигурации. Однако, возможна реализация стратегии монозащиты диаминa 1 с последующим разделением (схема 23, US 9,988,368 B1 [184]). Разделение соединения 2 проводят перекристаллизацией с *D*-формой миндальной кислоты с выходом 16%.

3. Обсуждение результатов¹

3.1. Разработка методологии синтеза новых производных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов

3.1.1. Синтез алкокси-замещенных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов

Несмотря на то, что *цис*-2,4,5-триарилзамещенные имидазолины представляют интерес как биологически активные структуры с потенциальной противоопухолевой активностью, как правило, их модификации ограничиваются введением новых заместителей в положения 1 и 2 имидазолинового цикла, в то время как замещение в арильных кольцах в положениях 4 и 5 довольно консервативно и ограничивается атомами галогена. Причиной тому отчасти является теория, предполагающая дополнительные галофильные взаимодействия в гидрофобных карманах связывания MDM2 [70]. Действительно, важность именно такого типа замещения была продемонстрирована с помощью фрагментного подхода, который показал, что даже 2-метил-4,5-ди(4-хлорфенил)имидазолин, обладает способностью к ингибированию p53-MDM2 взаимодействия (см литературный обзор, табл.3 пункт 4), в то время как отсутствие атомов галогена в арильных кольцах подобного имидазолина приводит к полной потере аффинности к MDM2 [70]. Тем не менее, необходимо отметить, что исследования влияния других заместителей в арильных кольцах имидазолина на аффинность к MDM2 не проводилось. Причиной тому может служить гораздо меньшая синтетическая доступность вицинальных *эритро*-1,2-диарилэтилендиаминов с другим типом замещения, а ведь именно эти соединения, как видно из литературного обзора, являются ключевыми исходными для синтеза производных нутлинов.

В то же время наличие атомов галогена в структуре *цис*-имидазолина неизбежно сопровождается рядом неприятных особенностей, которые привели к тому, что ингибиторы MDM2-p53 взаимодействия класса нутлинов до сих пор не нашли применения в клинической практике. Так, наличие атомов галогена в структуре приводит к резкому падению ее растворимости в воде, что является существенным недостатком при разработке лекарственных средств. Поэтому для повышения растворимости в воде соединений класса нутлинов вводят дополнительные гидрофильные заместители к атому азота имидазолинового

¹ Основные результаты данного раздела опубликованы в следующих работах автора: D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Bioorg. and Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 16, 2364-2368; D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Med. Chem. Res.*, 2021, 30, 2216-2227; D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 4, 444; Д.Р.Базанов, Н.А. Максимова, Н.А. Лозинская et al., *Rus. J. of Org. Chem.*, 2021, 57, 11, 1834-1840; Д.Р.Базанов, В.Ю. Савицкая, Н.А. Лозинская et al., *Mend. Comm.*, 2022, 32, 680-682; материалы Международных научных конференций студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020, 2019, 2015 и 2021»

ядра, не влияющие на аффинность соединений и, в сущности, являющиеся утяжеляющим молекулу балластом. Кроме того, благодаря высокой электроотрицательности, галогены понижают электронную плотность на ароматических кольцах, что способствует облегченной ароматизации имидазолинов в имидазолы даже под действием таких легких окислителей как кислород воздуха. Именно поэтому в препаратах нового поколения на основе *цис*-имидазолинов, таких как RG7112, в положения 4 и 5 имидазолинового кольца введены дополнительные метильные группы, препятствующие ароматизации имидазолинов. В данной работе нами была выдвинута гипотеза, что замена атомов галогена на другой, гидрофильный заместитель позволила бы решить проблему, связанную с низкой растворимостью. В то же время данная группа не должна быть очень большой, чтобы сохранять способность ароматических колец в положениях 4 и 5 занимать соответствующие карманы связывания в активном центре MDM2. Выбор пал на кислородсодержащие заместители, такие как гидроксигруппы и алкокси-группы. Выбор данных заместителей был обусловлен еще и тем, что наличие донорных групп в имидазолиновом цикле затрудняет его ароматизацию до имидазола [185]. Схематично цель данного исследования представлена на рисунке №1.

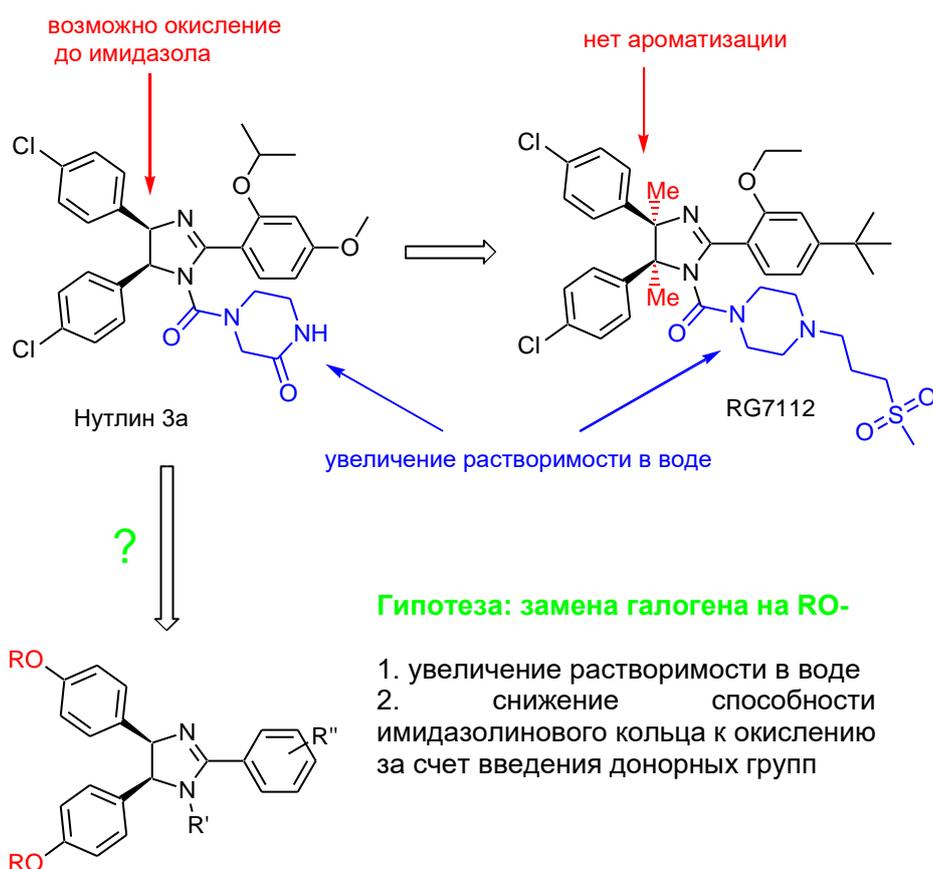


Рисунок №1. Предполагаемый результат замены атомов галогена в *цис*-имидазолиновом цикле на алкокси/гидроксигруппы.

Первым этапом работы стала разработка универсального синтетического подхода к разнообразным алкокси и гидроксизамещенным 2,4,5-триарилимидазолинам. Данный этап работы предполагал использование фрагментного подхода для первичной оценки способности кислородсодержащих имидазолинов влиять на уровень p53 в раковых клетках и их цитотоксичности с целью выбора наиболее подходящего скаффолда для дальнейшей модификации. Нами было показано, что целевые структуры могут быть получены по реакции ароматических альдегидов с растворами аммиака, преимущественно в ТГФ (схема №1), с последующей *one-pot* дисротаторной циклизацией образующихся тримерных продуктов [185] в *цис*-имидазолины под действием трет-бутилата калия или другого сильного основания (схема №1). Дисротаторное замыкание пентадиенового аниона приводит именно к *цис*-продукту по правилам орбитальной симметрии, а экспериментально на это указывают химические сдвиги протонов С-Н имидазолинового кольца. Для *цис*-структур сигнал протонов С-Н имидазолинового кольца находится в области около 5-5,5 м.д., а для *транс*-структур наблюдается сигнал в области 4-5 м.д. Следует отметить, что при длительной обработке *цис*-продукта сильным основанием, таким как трет-бутоксид калия, происходит изомеризация в более стабильный *транс*-изомер [185].

Данный синтетический подход был успешно применен для получения серии новых соединений (преимущественно моно-, ди- и триалкоксифенилпроизводных). Галоген и алкил производные синтезированы для сравнения биологических свойств с алкокси-аналогами (схема №1, таблица №1).

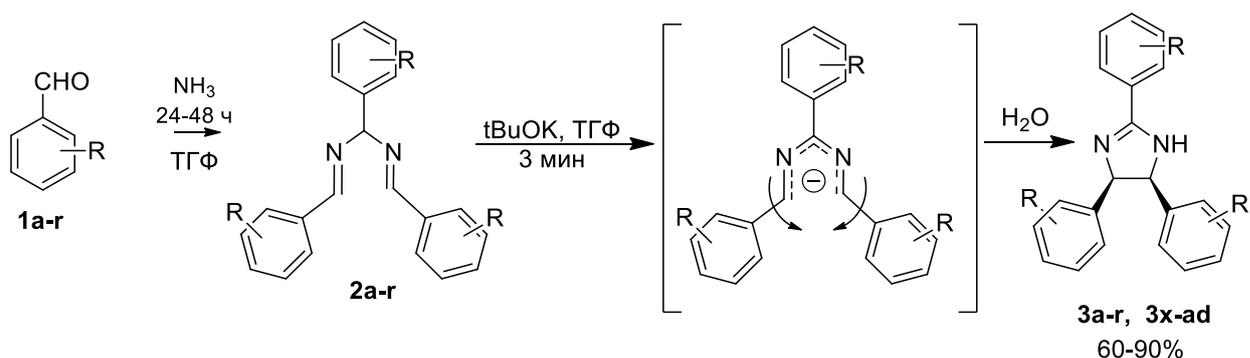
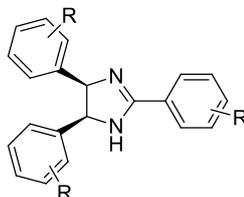


Схема 1. Синтез исходных триарилимидазолинов.

Таблица №1. Выходы триарилимидазолинов **3a-ad**.



№	R	Выход, %	№	R	Выход, %
3a	2-MeO	63	3p	4-Br	60
3b	3-MeO	68	3q	4-F	80
3c	4-MeO	95	3r	3,5-диMeO	78
3d	2,3-диMeO	67	3s	4-OH	65
3e	2-EtO,3-MeO	83	3t	4-OH,(4-MeO)*	95
3f	2,4-диMeO	76	3u	3-OH*	95
3g	3,4-диMeO	53	3v	2,5-диOH*	88
3h	2,5-диMeO	62	3w	3,4,5-триHO*	87
3i	3,4,5-триMeO	84	3x	4-Me	95
3j	4-EtO	38	3y	3-Me	68
3k	3-MeO,4-EtO	73	3z	2-Me	72
3l	2-Cl	93	3aa	4-Et	77
3m	4-Cl	72	3ab	4-iPr	80
3n	2,4-диCl	93	3ac	2,4,5-триMeO	70
3o	3,4-диCl	87	3ad	2,3,4-триMeO	75

*см. схему 2.

Альдегиды, дающие продукт **2** в твердом виде, способны тримеризоваться и в водном растворе аммиака. Чаще всего, это жидкие арилкарбальдегиды, например, бензальдегид и его производные: 4-метокси- и 4-метилбензальдегид, но реакция возможна и для 2-метоксибензальдегида несмотря на то, что он представляет собой твердый порошок. Для других альдегидов предпочтительней вести первую стадию реакции в органическом растворителе – тетрагидрофуране. Диазапентадиен на основе 3,4-диметоксибензальдегида оказался плохо растворим в ТГФ, что облегчило его выделение, но усложнило последующее электроциклическое замыкание цикла, требующее значительного избытка растворителя. В основном же продукты **2** не выделяли и не характеризовали, а использовали без выделения в стадии циклизации. Полученные имидазолины очищали методом колоночной хроматографии (масла) либо перекристаллизацией (твердые вещества).

Для анализа зависимости структура-биологическая активность были также получены гидроксипроизводные имидазолины **3s-w** по реакции соответствующих метокси-производных с VBr_3 с последующей обработкой этанолом (схема 2). Обнаружено, что более

высокая реакционная способность 4-алкоксиарил-групп в положениях 4 и 5 имидазолинового кольца по сравнению с положением 2 может быть использована для получения продукта селективного гидролиза **3t** при использовании небольшого избытка BBr_3 или при проведении реакции в течение 4 ч вместо 24 ч.

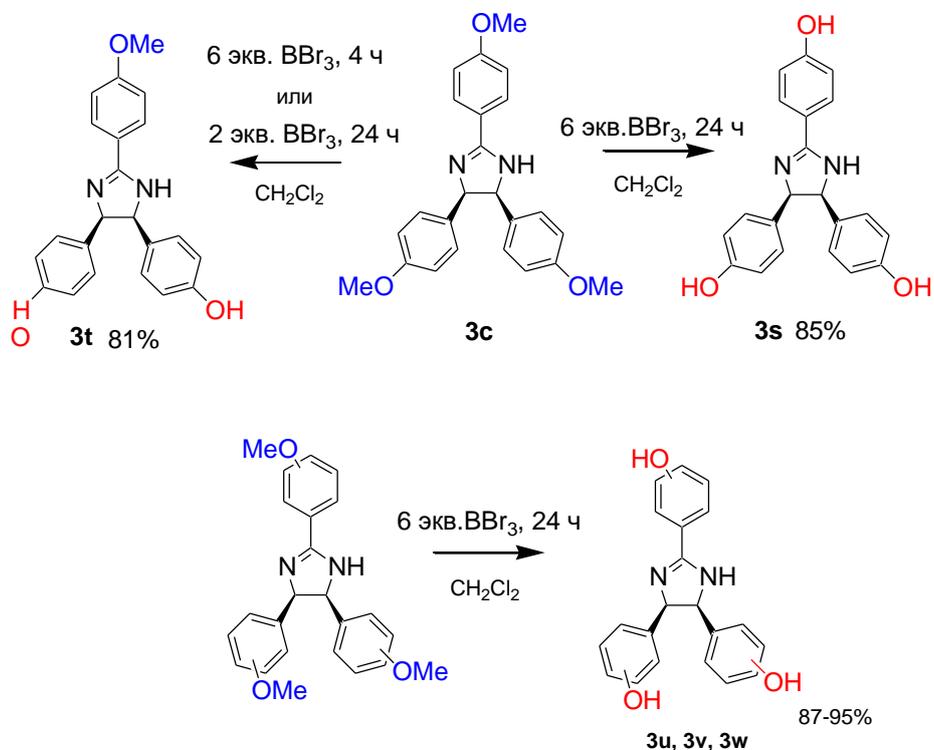


Схема 2. Селективный и полный гидролиз метоксипроизводных имидазолинов.

Таким образом, имидазолиновый цикл напрямую влияет на реакционную способность заместителей в арильных кольцах, причем лучше всего этот эффект проявляется для заместителей, находящихся в *para*-положении по отношению к имидазолиновому циклу. Для арильного кольца в положении 2 электроноакцепторные свойства амидинового заместителя уменьшают нуклеофильность кислорода метокси-группы и затрудняют его реакцию с кислотой Льюиса, в то время как донорные свойства СН-групп в положениях 4 и 5 имидазолинового цикла, наоборот, облегчают это взаимодействие.

3.1.2. Модификация 2,4,5-(гидроксифенил)имидазолинов

Для дальнейшего изучения различной реакционной способности в арильных кольцах в положениях 4,5 и 2 и возможности ее использования для селективных модификаций нами была также проведена реакция полученных гидрокси-производных с дихлоруксусной кислотой и ее производными. Выбор данной кислоты для создания сложноэфирной связи был обусловлен тем, что дихлорацетат-ион является миметиком пируват-аниона и ингибирует киназу пируватдегидрогеназы, меняя дыхательный цикл раковой клетки с гликолиза на

привычное нормальным клеткам гликолитическое окисление. Это приводит к тому, что раковые клетки, ранее способные выживать в условиях гипоксии, теряют эту способность и в них провоцируется апоптоз. Несмотря на то, что для эффективности данного процесса действующая концентрация дихлорацетат аниона должна быть достаточно высока из-за плохой биодоступности ионных соединений, дихлорацетат натрия в настоящее время находит применение в сопутствующей противораковой терапии. Поскольку производные имидазолинов тоже провоцируют апоптоз, но по другому механизму, нами была изучена возможность создания ковалентных относительно легко гидролизуемых конъюгатов дихлоруксусной кислоты с производными имидазолина с целью изучения выхода к мультинаправленным противоопухолевым препаратам. В качестве простейших моделей для создания сложных эфиров нами были выбраны соединения **3s** и **3u**, с *para*- и *meta*-расположением гидрокси-групп по отношению к имидазолиновому циклу (схема 3). Выделение полученных эфиров проводилось путем осторожной обработки водным раствором соды с последующей экстракцией. Использование колоночной хроматографии провоцировало гидролиз полученных эфиров на силикагеле. В данной реакции также было показано, что в случае пара-замещенных гидолксиимидазолинов разница в нуклеофильности гидрокси-групп позволяет селективно модифицировать заместители в положениях 4 и 5 имидазолинового кольца, что хорошо согласуется с данными, полученными в случае гидролиза алкокси-групп.

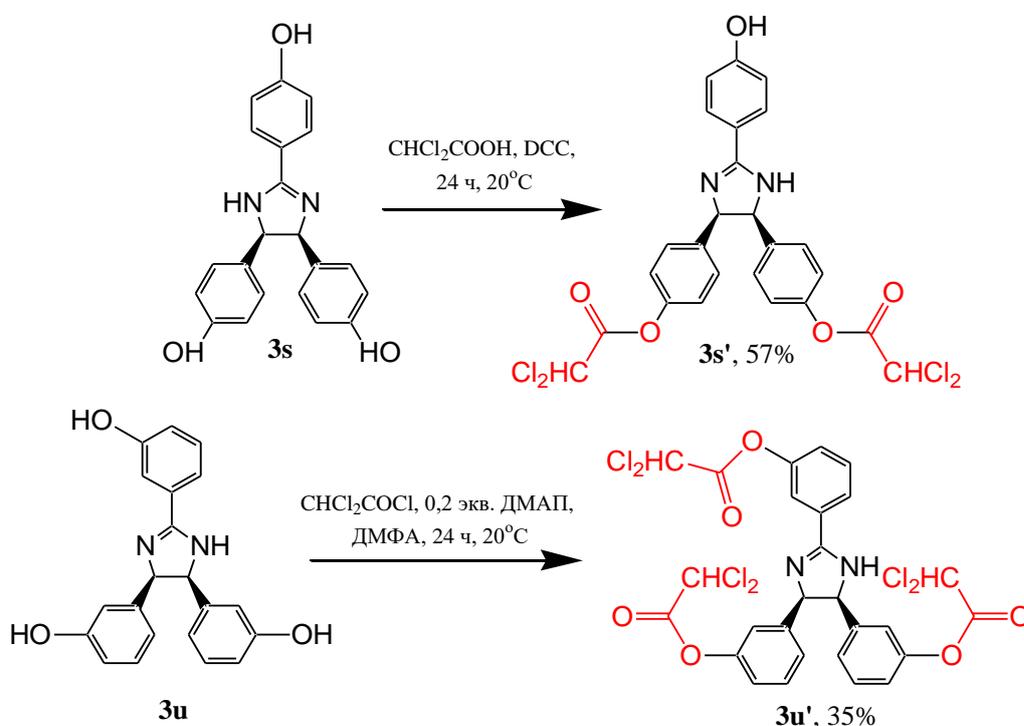


Схема 3. Синтез эфиров гидроксифенил-имидазолинов и дихлоруксусной кислоты.

3.1.3. Антиоксидантная активность имидазолинов

Особый интерес представляло сравнение антиоксидантных свойств полученных галоген-, гидрокси- и алкокси-производных имидазолинов. Для оценки антиоксидантной активности полученных имидазолинов было использовано три метода: а) хемилюминесцентная модель свободнорадикального окисления люминола, инициированного смесью гемоглобин-пероксид водорода (Hb-H₂O₂-Lm) в водной среде; б) спектрофотометрический тест с использованием ДФПГ-радикала и в) электрохимические исследования с использованием циклической вольтамперометрии.. Хорошим вариантом для оценки активности является выбор метода, приближенный к физиологическим условиям, так как часто антиоксиданты такого рода применяются в косметической, фармацевтической и пищевой индустрии. Поэтому вначале для соединений **3a**, **3d**, **3h**, **3i**, **3m**, **3p**, **3s**, **3t**, **3v**, **3w** была изучена антиоксидантная активность в физиологических условиях методом, основанным на хемилюминесцентной модели свободнорадикального окисления люминола, инициированного смесью гемоглобин-пероксид водорода (Hb-H₂O₂-Lm) в водной среде. Этот метод позволяет оценить антиоксидантную активность в отношении двух активных форм кислорода, играющих ключевую роль в воспалительных процессах: гидроксильного радикала и супероксид анион-радикала [186]. Также антиоксидантная активность соединений была оценена по отношению к ДФПГ радикалу. Результаты антирадикальной активности выражены в виде относительной величины по отношению к стандарту - тролоксу (тролокс-эквиваленты, TEAC), в то время как активность по отношению к супероксид аниону выражена в мкМ (табл. 2).

Таблица 2. Антиоксидантная активность 2,4,5-триарилимидазолинов²

Соединения	Антиоксидантная активность		
	Хемилюминесцентный метод (Hb-H ₂ O ₂ -Lm)		Тест ДФПГ
	Гидроксильный радикал, TEAC	Супероксид анион радикал, μM	TEAC
3a, 3d, 3h, 3i, 3m, 3p	<0.1	>500	-
3s	<0.1	>500	<0.1
3t	<0.1	>500	<0.1
3v	1.4	110	2.5
3w	3.5	100	3.8

² Исследования хемилюминесцентным методом выполнены совместно с н.с. Безнос О.В. (НИИ Глазных болезней им. Гельмгольца, Москва). ДФПГ тест выполнен совместно с к.х.н. Грачевой Ю.А. (МГУ, химический факультет) при непосредственном участии соискателя.

Антиоксидантную активность в отношении гидроксильного радикала и супероксида аниона в системе гемоглобин-пероксид водорода-люминол проявляют только гидроксипроизводные **3v** и **3w** с эквивалентной антиоксидантной способностью тролокса 1,4 и 3,5 соответственно (табл. 2). Соединения **3s** и **3t**, содержащие только одну гидроксильную группу в арильном заместителе, не проявляют антиоксидантную активность, что согласуется с общими структурными требованиями к антиоксидантам. Для подтверждения активности соединений **3v** и **3w** был проведен спектрофотометрический тест ДФПГ, в котором соединения **3v** и **3w** показали активность в 2,5 и 3,8 раза выше, чем у стандарта (тролокс). Полученные результаты хорошо согласуются с предыдущим методом. Изученные соединения **3v** и **3w** обладают хорошими антиоксидантными свойствами по сравнению с ближайшим аналогом пропилгаллатом и галловой кислотой, для которых диапазон ТЕАС составляет 1,9-4,2 в зависимости от метода измерения [187].

3.1.4. Электрохимическое исследование свойств гидрокси-имидазолинов³

Редокс свойства соединений **3s**, **3t**, **3v**, **3w** изучали методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) в ацетонитриле с использованием стеклоуглеродного (СУ) электрода. Величины потенциалов электрохимического окисления и восстановления соединений представлены в табл. 3. На вольтамперограмме соединений **3s**, **3t**, **3w** в анодной области наблюдаются два одноэлектронных необратимых анодных пика, очевидно, соответствующих последовательному окислению фенольных фрагментов. С другой стороны, в случае соединения **3v** в анодной области появляются два пика двухэлектронного окисления, а на обратном сканировании наблюдаются соответствующие пики восстановления (рис. 2). Необратимый характер пиков на ЦВА исследуемых соединений свидетельствует о том, что окисление протекает по механизму ЕС, то есть за переносом электрона следует быстрая химическая реакция, скорее всего, депротонирование гидроксильной группы. Характер вольтамперограммы в случае **3v** можно объяснить последовательным окислением фенольных фрагментов до хиноидных структур по пути, соответствующему известной схеме окисления гидрохинона (схема 4)[188]. Следует отметить, что первые пики окисления в случае **3s** и **3t** наблюдаются при менее анодных потенциалах по сравнению с соединениями **3v** и **3w**. Таким образом, окислительно-восстановительное поведение хорошо коррелирует с данными антиоксидантной активности: наибольшую активность проявляют наиболее легкоокисляемые вещества **3v** и **3w** (табл. 2 и 3). Также интересно, что потенциалы первых пиков окисления **3s**, **3t**, **3v**, **3w** значительно смещены в катодную сторону по сравнению с

³ Электрохимические исследования выполнены совместно с к.х.н. Тюриным В.Ю. (МГУ, химический факультет) при непосредственном участии соискателя

гидрохиноном ($E_a = 1,56$ В). Можно предположить, что присутствие имидазолинового цикла приводит к повышению стабильности образующихся катион-радикалов (схема 4), в результате чего происходит разделение первого и второго пиков окисления (рис. 2). Возможно, это указывает на участие имидазолинового цикла в делокализации электронной плотности.

Таблица 3. Электрохимические потенциалы некоторых 2,4,5-триарилимидазолинов (СУ-электрод, 200 мВ/с, С= 1 мМ в ацетонитриле). * - потенциал пика на обратном скане

Соединение	E_{a1} , V	E_{a2} , V	E_{c1} , V	E_{c2} , V
3s	1.05	1.37	-	-
3t	0.96	1.25	-0.85	-
3v	0.90/0.41*	1.33/0.79*	-1.65	-2.03
3w	0.76	-	-1.02	-
Тролокс	1.02/0.74*	-	-	-

Схема 4. Возможный механизм окисления **3v**.

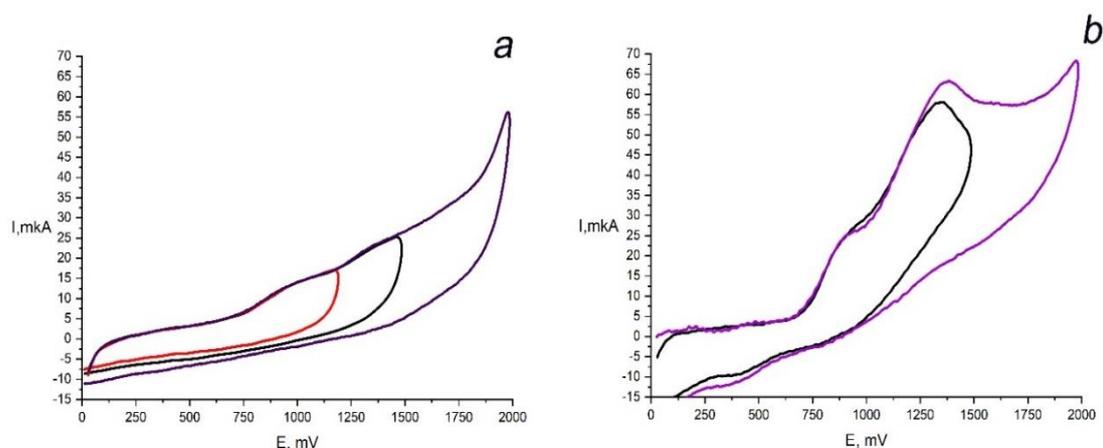
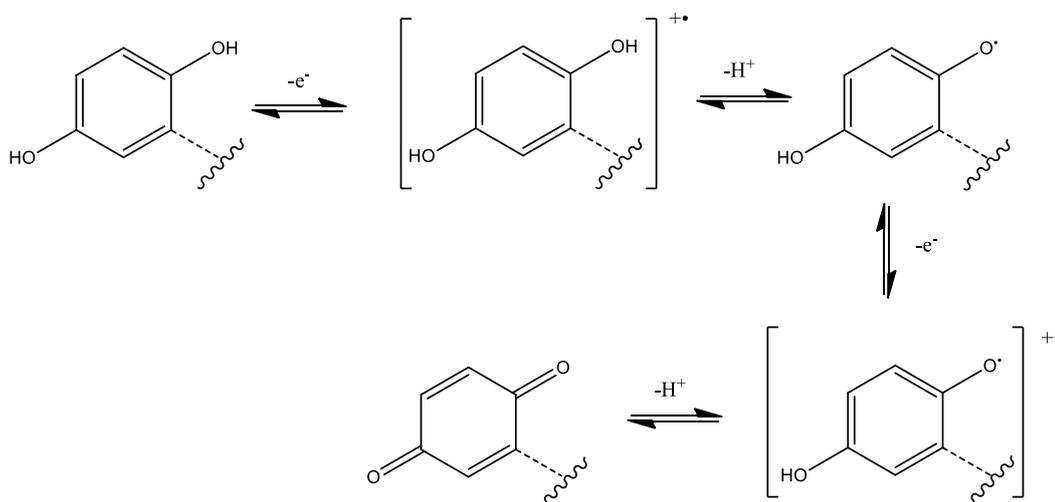


Рисунок №2. Циклические вольтамперограммы соединений **3s** (а) и **3v** (б) в ацетонитриле (СУ-электрод, 200 мВ/с, С= 1 мМ).

3.1.5. Молекулярное моделирование взаимодействия имидазолинов с активным сайтом MDM2

Важной задачей являлся анализ возможности встраивания новых имидазолиновых структур в область связывания MDM2 с p53. Нами было проведено молекулярное моделирование, позволяющее оценить геометрию связывания полученных имидазолинов в сайте MDM2 в сравнении с нутлином. Трехмерная структура белка MDM2 для проведения исследования была получена из базы данных PDB (4HG7). Моделирование на данном этапе проводили в программе AutoDock (описание метода см. экп. часть).

Для определения приоритетных для связывания конформаций мы выбрали модельные соединения **3c**, **3f**, **3j**, **3m** (рис.3).

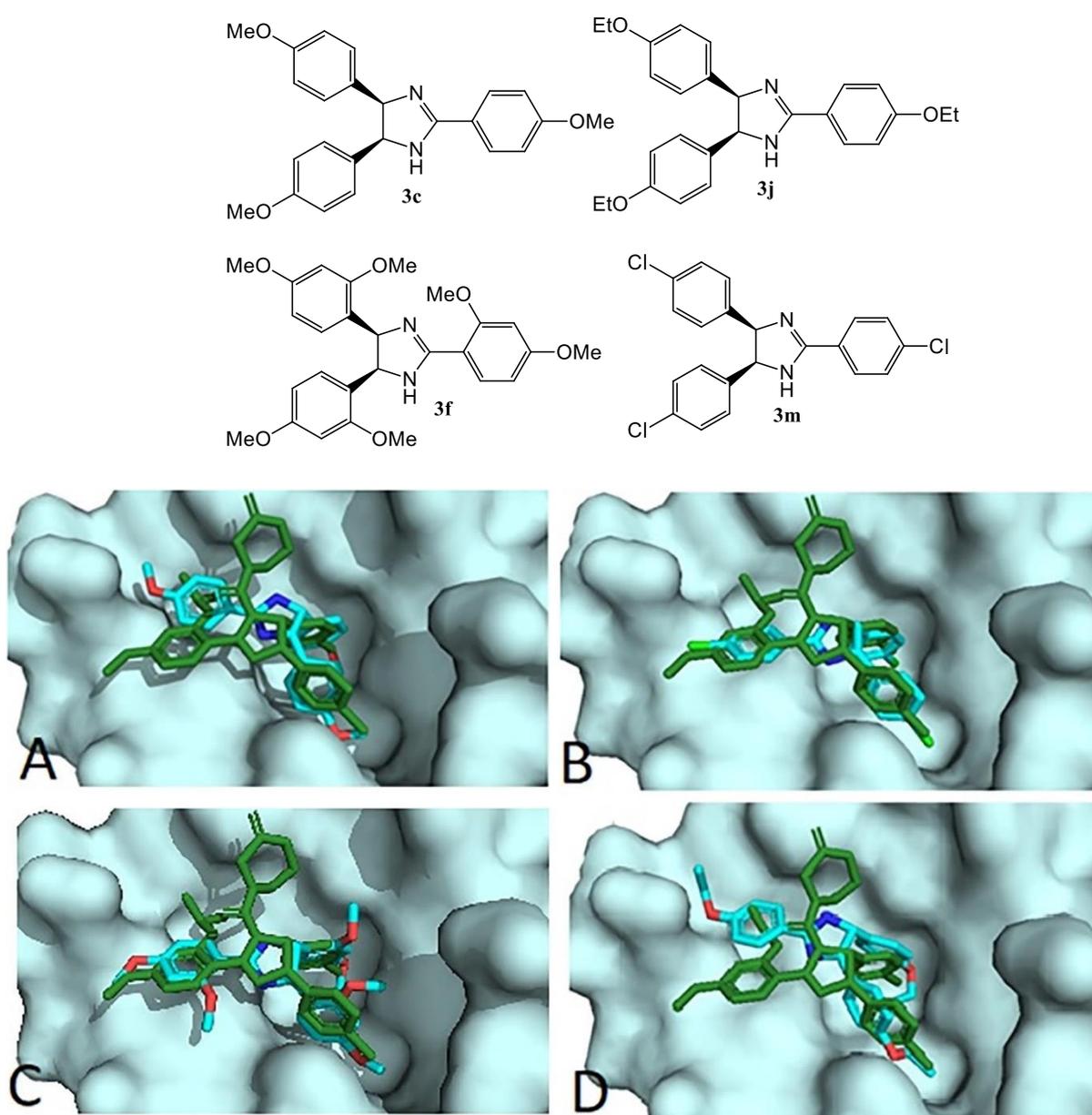


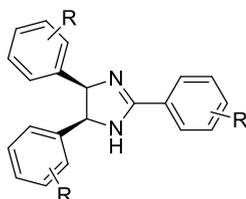
Рисунок №3. Молекулярное моделирование связывания (A) **3c**, (B) **3m**, (C) **3f** и (D) **3j** (голубой), в сравнении с нутлином-3а (зеленый) в сайте связывания p53 белка MDM2.

Результаты проведенного молекулярного моделирования показывают, что исследуемые соединения могут располагаться внутри (одного и того же с p53 и нутлином) активного сайта связывания MDM2 с расчётной энергией в диапазоне от -6 до -9 ккал/моль. Геометрия связывания полученных имидазолинов схожа с геометрией связывания нутлина [189]: *цис*-метоксифенильные кольца встроено непосредственно в два кармана сайта связывания MDM2 (Trp23 и Leu26), тогда как третий арильный заместитель встраивается в третий карман (Phe19) (рис.3).

3.1.6. Изучение биологической активности *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов

На первом этапе биологического исследования незамещенных имидазолинов была произведена оценка их цитотоксичности⁴. Цитотоксичность полученных имидазолинов в

Таблица 4. Цитотоксичность имидазолиновых производных **3a-ad** по отношению к клеточной линии A549.



Соединение	Заместитель (R)	A549 (IC ₅₀ , μM)
3a	2-МеО	27.36±0.79
3b	3-МеО	64.31±1.04
3c	4-МеО	43.90±1.87
3d	2,3-диМеО	16.18±0.29
3e	2-EtO,3-МеО	24.26±2.10
3f	2,4-диМеО	9.32±0.47
3g	3,4-диМеО	84.69±0.76
3h	2,5-диМеО	21.42±1.07
3i	3,4,5-триМеО	n.a. ¹
3j	4-EtO	13.26±0.37
3k	3-МеО,4-EtO	67.49±0.04
3l	2-Cl	10.68±0.18
3m	4-Cl	20.25±1.88
3n	2,4-диCl	164.41±13.74
3o	3,4-диCl	13.72±1.02
3p	4-Br	9.05±0.20
3q	4-F	107.83±4.65
3s	4-OH	n.a. ¹
3t	4-OH(R ¹),4-МеО(R ²)	n.a. ¹
3u	3-OH	310.60±16.67
3v	2,5-диOH	n.a. ¹
нутлин-3a		15.12

¹ n.a. отсутствие активности

⁴ Исследования выполнены совместно с к.х.н. Аникиной Л.В. (ИФАВ РАН, Черноголовка)

отношении клеточной линии карциномы легкого А549 оценивали с помощью МТТ-теста (табл. 4). Цитотоксическая активность алкоксизамещенных имидазолинов была сравнима с активностью галогензамещенных соединений - аналогов ядра нутлина (см. **3f** и **3p** табл.4). Для некоторых соединений также была дополнительно измерена цитотоксичность по отношению к клеточной линии НСТ116 как дикого типа, так и не содержащей р53. Оказалось, что цитотоксичность полученных производных для обеих клеточных линий практически не отличалась. Примечательно, что замена алкоксигруппы на гидроксигруппу в арильных заместителях в положении 4 и 5 приводила к резкому снижению цитотоксичности по отношению ко всем клеточным линиям.

Таблица 5⁵. Цитотоксичность некоторых имидазолиновых производных по отношению к клеточной линии НСТ116 и линии, не содержащей р53 НСТ116 р53-/-.

Соединение	IC50 (мкМ) НСТ116	IC50 (мкМ) НСТ116 р53-/-	Соединение	IC50 (мкМ) НСТ116	IC50 (мкМ) НСТ116 р53-/-
3w	>50	>50	3h	10,3	8,6
3v	>50	>50	3g	>50	>50
3s	>50	>50	3i	>50	>50
3c	6,0	11,2	3d	6,2	17,6

Несмотря на то, что результаты на клеточных линиях НСТ116 показали, что цитотоксичность полученных имидазолинов могла быть результатом р53-независимого пути клеточной гибели, нами была дополнительно изучена способность полученных соединений повышать уровень р53 в клетках, поскольку для нутлинов известно, что собственная цитотоксичность этих соединений не всегда напрямую сопряжена с их способностью повышать уровень р53 в клетке. Для этого были выбраны соединения **3c**, **3f**, **3j**, **3m**, показавшие наилучшие результаты при молекулярном моделировании и цитотоксичность в низкомикромолярном диапазоне концентраций. Тестирование проводилось на клеточной линии аденокарциномы легкого А549. Важно отметить, что базальный уровень р53 в клетках А549 достаточно низок. И, хотя обработка нутлинами или их аналогами приводит к существенной стабилизации уровня р53 в клетках А549, эти соединения сами по себе не индуцируют апоптоз в данных клетках [190]. Индукция апоптоза в этой клеточной линии происходит только при сочетании нутлинов с

⁵ Исследования выполнены совместно с д.м.н. Штилем А.А.

другими агентами, например, цисплатином, который повреждает ДНК [79; 191], хотя во многих других клеточных линиях нутлины вполне способны индуцировать апоптоз и сами по себе [74; 192]. Однако, индукция апоптоза приводит к каспаз- и кальпаин-зависимому расщеплению p53 и снижению его концентрации в клетке [193–195], и в этом случае не получается корректно оценить влияние нутлина на уровень p53, поскольку белок постоянно расходуется. Поэтому, для корректной оценки стабилизации уровня p53 использовали именно клеточную линию A549.

Клетки A549 обрабатывали соединениями **3c**, **3f**, **3j** и **3m** в концентрациях 10, 20, 40 и 80 мкМ⁶. Концентрации были выбраны в соответствии с определенными для них значениями IC50. После обработки в течение 24 часов определяли уровень p53 методом вестерн-блотта (рис. 4). Анализ подтвердил, что все соединения способны слегка повышать уровень p53. Производное **3f** (2,4-диMeO) в концентрации 20 мкМ продемонстрировало наилучшую эффективность для стабилизации p53. Денситометрический анализ p53, нормированных на глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД), показал, что обработка этим соединением приводила к повышению уровня p53 в 3,4 раза по сравнению с необработанными клетками. Для соединений **3c**, **3j** и **3m** также наиболее эффективной была концентрация 20 мкМ, при которой уровень p53 повышался в 1,6, 2,3 и 2,4 раза соответственно (рис. 4). Для подтверждения эффективности производного **3f** использовали также клеточную линию карциномы толстой кишки RKO. По данным вестерн-блот анализа, обработка клеток RKO соединением **3f** в концентрации 10 и 20 мкМ повышала уровень p53 в 2,8 и 3,8 раза соответственно (рис.4). В качестве положительного контроля был использован нутлин 3a, продемонстрировавший увеличение уровня p53 в 10,1-12 раз в клетках A549 и 10,6-11,5 раз в клетках RKO. Учитывая тот факт, что синтезированные нами имидазолины представляют собой базовые структуры и не включают ряд ключевых для связывания нутлина заместителей, эффективность производного **3f** на основании фрагментного подхода показалась нам достаточной для того, чтоб рассматривать его как соединение, пригодное для дальнейших целевых модификаций. Кроме того, можно видеть, что клеточные линии, чувствительные к нутлину-3a, проявляют также пропорциональное повышение уровня p53 и

⁶ Тестирование проводилось совместно с аспирантом Первушиным Н.В. и к.б.н. в.н.с. Копеиной Г.С., факультет фундаментальной медицины, МГУ

после обработки соединением **3f**. При этом важно отметить, что нутлин **3a** не индуцировал апоптоз в клетках A549 вплоть до концентрации 20 мкМ.

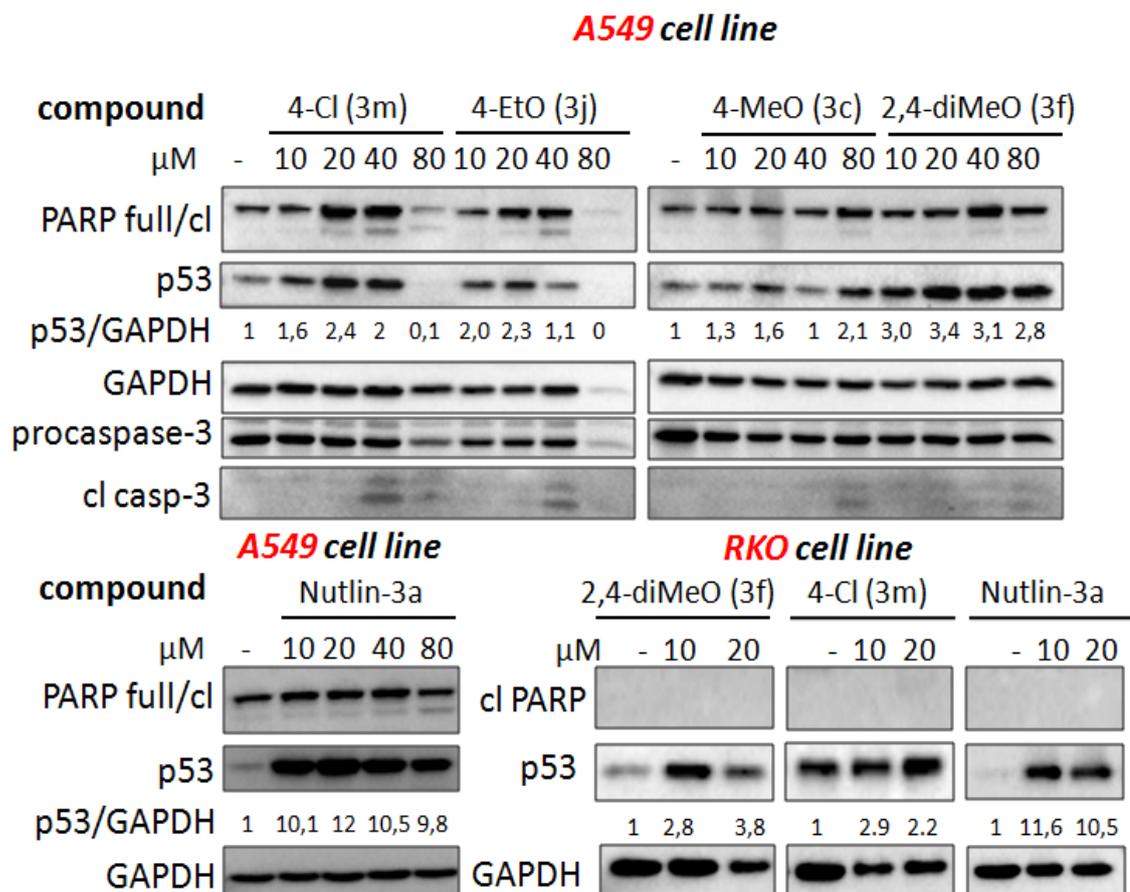


Рисунок №4. Повышение уровня p53 соединениями **3c**, **3f**, **3j** и **3m**. Вестерн-блот-анализ общих клеточных лизатов из клеток A549 или RKO после обработки указанными соединениями. GAPDH использовали в качестве контроля.

Для изучения возможности индукции апоптоза, была проанализирована активация каспазы-3 и расщепление ее субстрата – PARP. По данным вестерн блотт анализа, соединения **3j** и **3m** в концентрации 40 мкМ индуцировали накопление активного фрагмента каспазы-3 p17/19 и последующее расщепление PARP (рис. 4). Обработка этими соединениями в концентрации 80 мкМ приводила к существенной гибели клеток и полной деградации клеточных белков. В то же время обработка клеток соединениями **3c** и **3f** приводила к слабой активации каспазы-3 и незначительному расщеплению PARP даже в концентрации 80 мкМ. В совокупности 4-МеО- и 2,4-диМеО-производные **3c** и **3f** не вызывали апоптотической гибели клеток в концентрациях до 40 мкМ. Напротив, производные 4-Cl и 4-EtO (**3j** и **3m**) в концентрации 40 мкМ приводили к заметной активации каспаз и последующему апоптозу. Важно отметить, что соединения **3j** и **3m** в концентрации 80 мкМ не повышали уровень p53, но при этом вызывали выраженную гибель клеток. Таким образом, эти соединения вызывали гибель клеток из-за неспецифической токсичности, а не из-за стабилизации p53. Интересно, что

при этом повышение концентрации 2,4-диMeO-производного **3f** приводило к еще более эффективной стабилизации уровня p53, но не к апоптозу.

Поскольку для противораковой терапии предпочтительной является гибель раковых клеток путем апоптоза, а не некроза, была оценена апоптотическая и некротическая гибель клеток в результате обработки штамма A549 соединениями **3c**, **3f**, **3j** и **3m** в концентрации 10-80 мкМ в течение 24 часов. Затем клетки окрашивали аннексином (V-FITC) в сочетании с йодидом пропидия (PI) и анализировали на проточном цитометре. Двойное окрашивание (аннексин V/PI +/+) использовали для оценки популяции поздних апоптотических и вторичных некротических клеток. Ранние апоптотические клетки окрашивали только аннексином V-FITC (аннексин V/PI +/-), а некротические клетки окрашивали только PI (аннексин V/PI -/+) (рис.5). В качестве положительного контроля запуска апоптоза использовали цисплатин в концентрации 15 и 35 мкМ.

Анализ гибели клеток с использованием окрашивания аннексином (V-FITC/PI) показал, что обработка цисплатином приводила к увеличению популяций раннего и позднего апоптоза (V/PI +/- и V/PI+/+ соответственно). В отличие от цисплатина, 4-MeO- и 2,4-диMeO-производные **3c** и **3f** в концентрациях до 40 мкМ не увеличивали апоптотические или некротические популяции (рис. 5). Обработка этими соединениями в концентрациях 80 мкМ лишь слегка усиливала двойное окрашивание (V/PI +/+) клеток A549, что соответствует данным вестерн-блотт анализа по каспазе-3 и расщеплению PARP (рис. 4). При этом 4-Cl- и 4-EtO-производные **3j** и **3m** в концентрациях 40 и 80 мкМ вызывали существенное накопление некротических клеток до 70% (рис. 5). Это также согласуется с обнаруженным на вестерн-блотт анализе заметным расщеплением клеточных белков, включая PARP и каспазу-3. Таким образом, полученные результаты подтверждают неспецифическую токсичность производных 4-Cl и 4-EtO **3j** и **3m** в концентрациях выше 40 мкМ.

Таким образом по совокупности данные эксперимента показывают, что 4-МеО- и 2,4-диМеО-производные **3c** и **3f** не вызывают некротическую гибель клеток в концентрациях до 80 мкМ и способны стабилизировать p53. Напротив, 4-Cl- и 4-EtO-производные **3j** и **3m** способствуют некротической гибели клеток и менее эффективны для стабилизации p53.

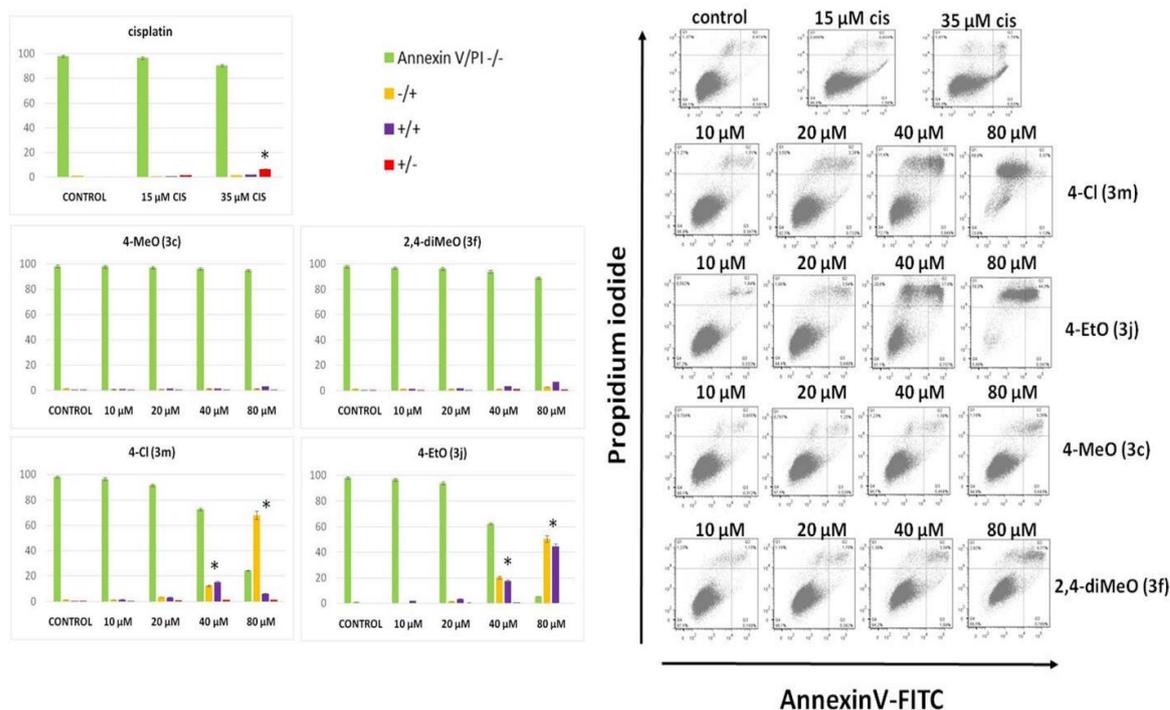
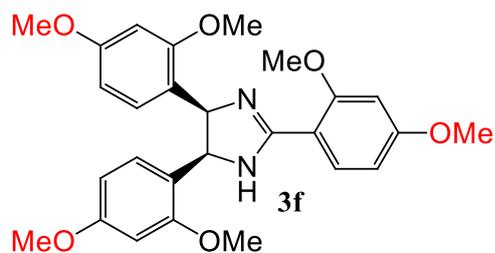


Рисунок №5. Анализ проточной цитометрией клеток A549, обработанных цисплатином, **3c**, **3f**, **3j** и **3m**. Клетки окрашивали конъюгатом аннексина V-FITC и йодида пропидия (PI). Обозначение для аннексина V/PI: -/-, жизнеспособные клетки; -/+ апоптотические клетки; +/- поздние апоптотические клетки; +/- некротические клетки.

Важность наличия метокси-группы в положении 4 по отношению к имидазолиновому ядру для стабилизации p53 была продемонстрирована на клеточной линии A549 на примере соединений **3d** и **3h** в концентрациях 10 и 20 мкМ. Эти соединения являются изомерами производных **3f** и **3c**, но при этом не имеют пара-заместителя в фенильном кольце. Оба соединения демонстрируют отсутствие влияния на уровень p53, что свидетельствует о важности наличия метокси-группы в *para*-положении арильных заместителей для проявления целевой активности.



Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено, что наиболее перспективным производным для дальнейшей модификации является соединение **3f**, причем наличие метокси-группы в *para*-положении арильного кольца по отношению к имидазолиновому циклу является определяющим для того, чтоб соединение обладало способностью повышать уровень p53.

Однако, активность полученных соединений была довольно мала в сравнении с нутлином, поэтому следующим этапом работы стало проведение модификаций полученных имидазолинов по атому азота.

3.1.7. Молекулярное моделирование взаимодействия сульфонамидных и карбамоильных производных имидазолинов с MDM2 и MDMX

Для выбора дальнейших модификаций было выполнено молекулярное моделирование для модифицированных производных, содержащих карбамоильные и сульфонамидные группы на атоме азота имидазолинового кольца. Данные заместители обычно содержат гидрофильные группы и используются для повышения растворимости молекулы нутлинов в воде. При этом заместители на основе карбамоила являются классическими для модификаций нутлинов, сульфонамидная группа была выбрана нами впервые в качестве альтернативной гидрофильной группы. На данном этапе мы использовали программный пакет Schrodinger и рассмотрели варианты взаимодействия для MDM2 и MDMX (PDB 4HG7 и 7C3Y соответственно) в динамике, с учетом воды в сайте связывания. MDMX выбран для изучения в дополнение к MDM2, так как является сходным по функциям белком, и часто в последнее время ингибиторы MDM2 тестируются на активность дополнительно с MDMX.

В литературе описано взаимодействие p53 с белком MDMX [196], в том числе в сравнении со связыванием с MDM2, кроме этого изучено взаимодействие нутлина с обоими мишенями [197]. Несмотря на структурное сходство этих двух белков, некоторые схожие аминокислотные остатки вносят разный вклад в энергию связывания нутлина. Установлено, что в связывании нутлина существенное участие принимают около 15 остатков, причем 10 из них различаются по абсолютному энергетическому вкладу от 10 до 50%. Например, Met62 в MDM2 можно примерно соотнести с Met60 в MDMX, Ile61 (MDM2) с Ile59 (MDMX), Gly58 (MDM2) с Gly56 (MDMX), а Val93 (MDM2) с Val91 (MDMX) соответственно. Но есть некоторые существенные различия, которые делают сайт связывания в MDMX меньшим по размеру и менее подходящим для нутлина. Так, замены Leu54 (MDM2) – Met52 (MDMX), Ile99 (MDM2) – Leu98 (MDMX) и, что наиболее важно, замены His96 (MDM2) – Pro95 (MDMX), создают π - π -взаимодействие нутлина

с MDM2, но не с MDMX, поскольку пролин не имеет ароматического кольца. В результате молекулярного моделирования нами было показано, что при наличии метокси-заместителей в лиганде также важной для связывания становится замена Phe91 (MDM2) – Tyr65 (MDMX), как показано на рис. 7.

Как показано на рис.6-8, все активные соединения занимают те же позиции в сайтах связывания, что и нутлин-3а. Сайт связывания MDMX в целом меньше, чем у MDM2, поэтому связывание лиганда с этим белком имеет некоторые отличия. В случае сульфонилпроизводных

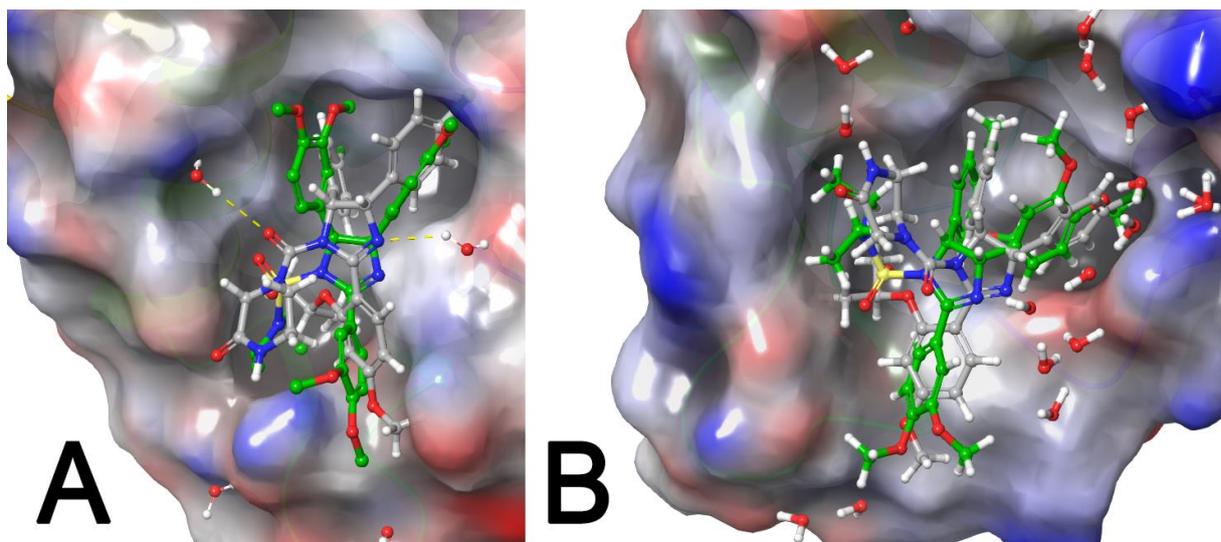


Рисунок №6. Расположение соединения **4i** (зеленый) в сайте связывания p53 белков MDMX (A) и MDM2 (B) в сравнении с нутлином-3а (серый).

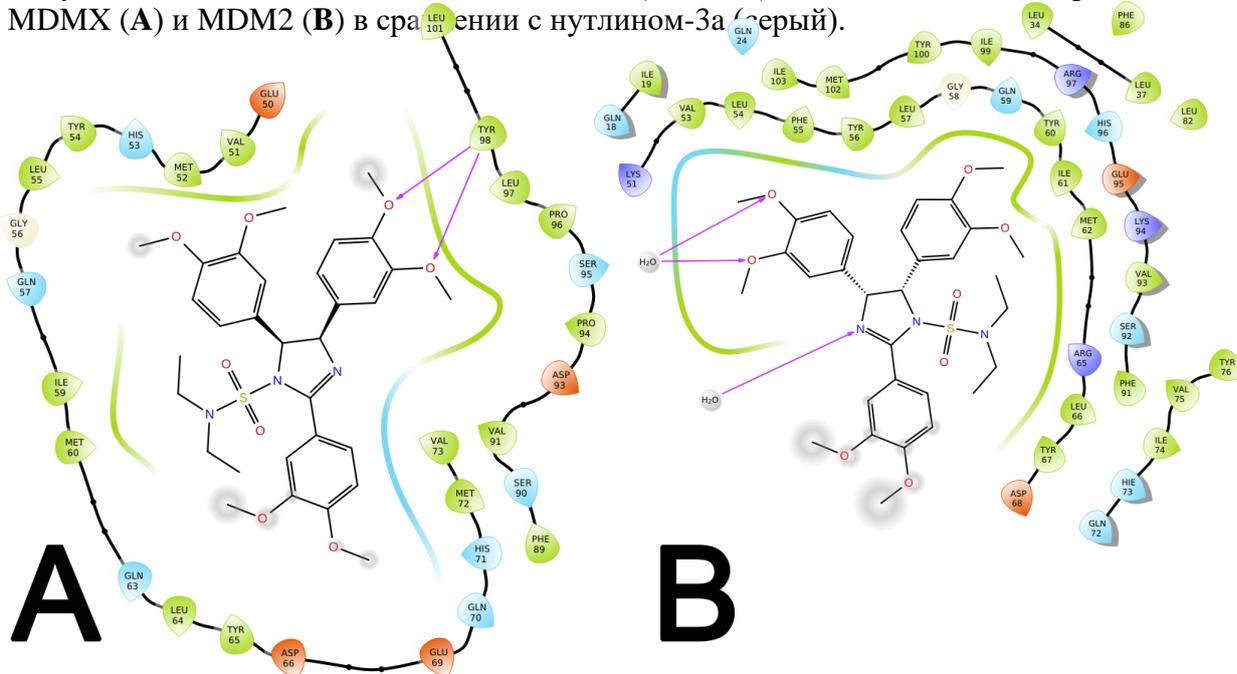


Рисунок №7. Карта взаимодействия лиганд-белок для **4i**-MDMX (A) и **4i**-MDM2 (B). Светло-зеленые линии между соединением и аминокислотными остатками соответствуют гидрофобным взаимодействиям, синие линии — полярным. Фиолетовые стрелки соответствуют водородной связи. Оранжевый цвет соответствует отрицательно заряженным остаткам; синий цвет соответствует положительно заряженным остаткам.

диэтиламинный фрагмент **4i** вносит вклад в гидрофобное взаимодействие с Phe1 и Tyr67, имитируя изопропильную группу в фрагменте нутлина-3а. Метоксифенильные группы во внешней части сайта связывания обеспечивают взаимодействие с растворителем, а алкоксиарильные группы в положениях 4 и 5 имидазолинового кольца расположены во внутренней части сайта связывания и обеспечивают гидрофобное взаимодействие с Leu57, Leu54, Phe99. Также они участвуют в водородных связях со структурной водой. Ароматическое кольцо в положении 2 способно взаимодействовать с His53, образуя π - π -связь, а также гидрофобно вступать во взаимодействия с Leu55 и Met52. Гидрофобная часть имидазолинового кольца может взаимодействовать с Phe89 и Val91.

Карбамоильные производные также способны занимать область связывания р53 в белке MDM2 подобно нутлину 3а (рис.8). Главным результатом исследования является тот факт, что данные соединения занимают те же позиции для связывания и имеют примерно ту же позицию стыковки, что и нутлин-3а, однако структурные различия позволяют им взаимодействовать с другими аминокислотными остатками, такими как Tyr67 или Phe91. Эти отличия по данным молекулярного моделирования заключаются в дополнительной водородной связи и π - π -стекинга для наших соединений, тогда как для нутлин-3а эти взаимодействия ограничены из-за его громоздкого изопропилового заместителя. С другой стороны, более крупные заместители в положении 1 и в ароматических кольцах в положениях 4 и 5 (например, -OMe в **5l** по сравнению с -Cl в нутлине-3а) могут ослаблять важное взаимодействие с His96, увеличивая расстояние между структурными ароматическими кольцами системы. Так, **5l** взаимодействует с His96 через водородную связь со структурной молекулой воды. Алкоксиарильные группы во внешней части сайта допускают взаимодействие с растворителем, тогда как внутренние метоксифенильные группы обеспечивают гидрофобные взаимодействия (например, с Val53, Phe55 и Tyr56). Кроме того, различные метоксигруппы и атом азота в положении 3 имидазолинового кольца участвуют в многочисленных водородных связях со структурной водой, что может стать существенным преимуществом предложенного скаффолда.

Полученные модели для **5k** и **5l** (рис. 8) основаны на общем большом геометрическом сходстве из-за их структуры. Соединение **5l** продемонстрировало более слабые взаимодействия с His96 и Tyr67 на расстояниях, которые нельзя рассматривать как полноценную π - π или водородную связь. Вероятно, метильный заместитель в **5l** является слишком громоздким для соответствующего гидрофобного кармана вблизи Tyr67. Эта особенность приводит к некоторой

нестабильности сайта связывания, изменению взаимодействия производного с MDM2 и незначительному изменению биологической активности.

3.1.8. Синтез *N*-сульфозамещенных *цис*-2,4,5-(алкоксифенил)имидазолинов

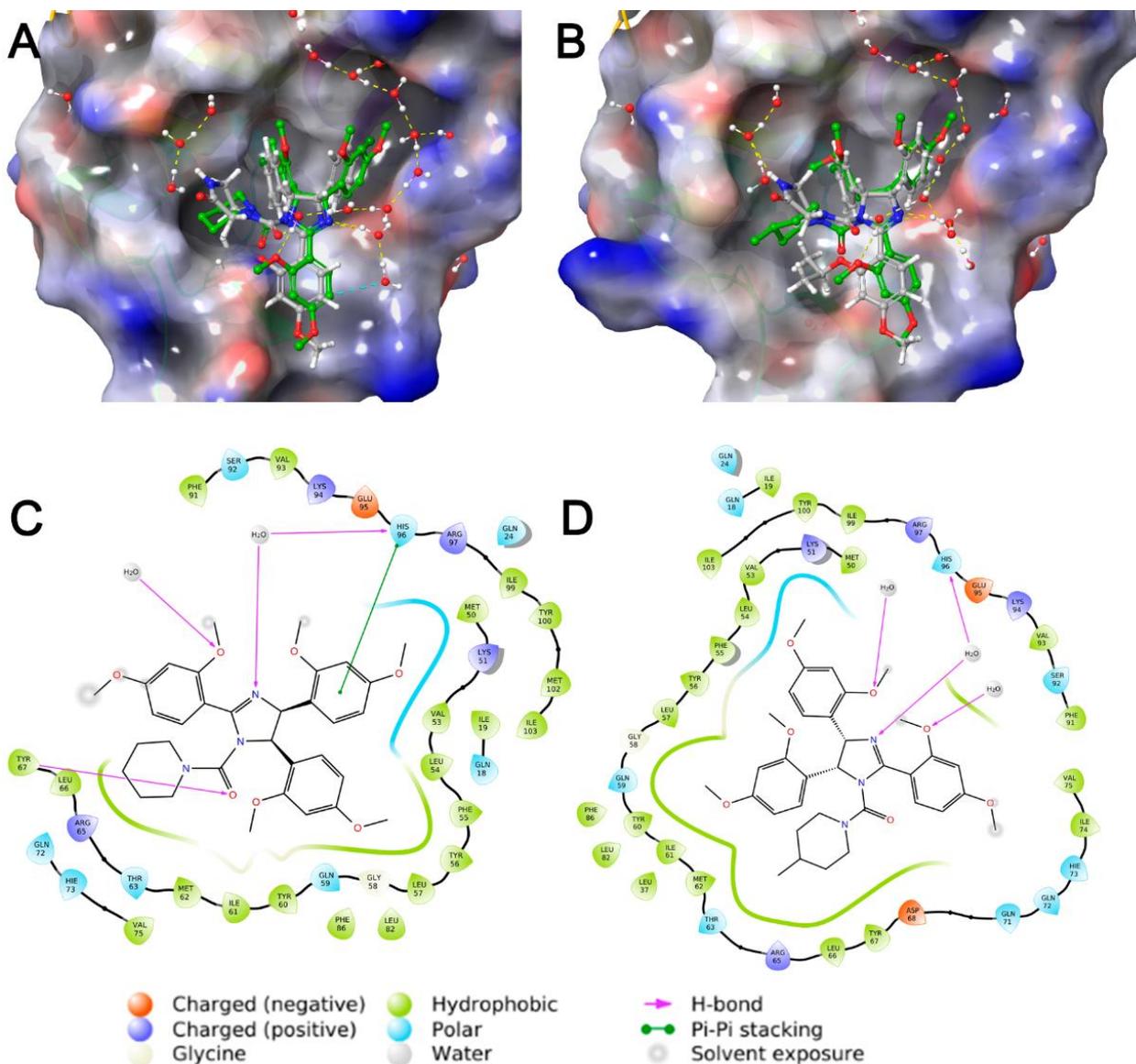


Рисунок №8. Моделирование связывания для **5k** (A) и **5l** (B) (зеленый) в сайте связывания p53 белка MDM2 по сравнению с нутлином-3а (серый). 2D Карта взаимодействия лиганд-белок для **5k** (C) и **5l** (D) в сайте связывания p53 белка MDM2.

В качестве первого варианта модификации выбран подход с использованием SO₂ группы в качестве линкера. Выбор подобной модификацией был обусловлен ее простотой, а также тем, что она должна увеличивать растворимость в воде полученных соединений, обеспечивая дополнительное связывание с MDM2 согласно результатам молекулярного моделирования. Исходные *N,N*-диалкилсульфамоилхлориды получали при кипячении сульфурилхлорида со вторичным амином с последующей очисткой путем перегонки (см.

экспериментальную часть). Синтез целевых сульфонилимидазолинов был осуществлен согласно схеме 5, причем наилучшие выходы были достигнуты в случае тозилпроизводных **4a,d,f** (табл. 6).

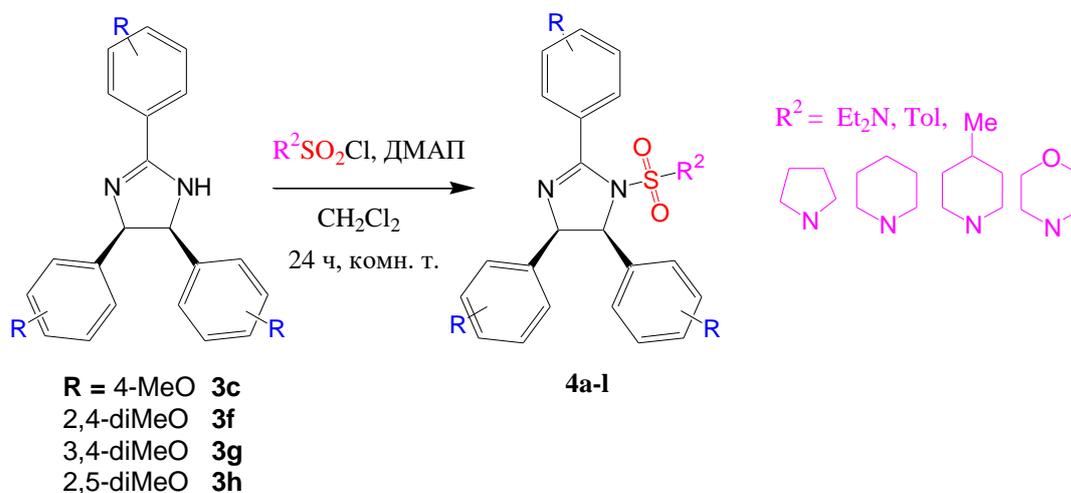


Схема №5. Модификация 2,4,5-три(метоксифенил)имидазолинов по атому азота с использованием сульфопроизводных.

Таблица №6. Выходы сульфопроизводных имидазолинов.

	R	R₂	Выход, %		R	R₂	Выход, %
4a	4-MeO	Толуил	85	4g	3,4-диMeO		31
4b	4-MeO		78	4h	3,4-диMeO		35
4c	4-MeO		76	4i	3,4-диMeO	Et ₂ N	37
4d	2,4-диMeO	Толуил	73	4j	3,4-диMeO		27
4e	2,4-диMeO		36	4k	2,5-диMeO		81
4f	3,4-диMeO	Толуил	36	4l	2,5-диMeO		76

Растворимость нутлина в воде была описана как чрезвычайно низкая (<0,1 мг/л) при нормальных условиях. Поэтому для соединений **4g**, **4h**, **4i** и **4j** измерена растворимость в дистиллированной воде и обнаружено, что введение сульфоамидной модификации сочетания с метоксизаместителями приводит к значительному улучшению растворимости имидазолинов в воде. Растворимость сульфонилимидазолинов в воде определялась гравиметрически и составляла от 60 до 100 мг/л при 20°C. Таким образом показано, что данные производные обладают гораздо более высокой растворимостью в воде, что делает целесообразным дизайн лекарственных препаратов на их основе.

3.1.9. Синтез карбамоил-замещенных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов

Стандартным методом увеличения водорастворимости нутлинов является модификация производных имидазолина по атому азота с использованием трифосгена и соответствующих аминов (схема 6, табл.7) [63; 198; 199]. Для сравнения как синтетических свойств, так и биологической активности синтезированы не только производные 2,4-диметоксифенила (**3f**), но и ряд других алкокси- и галогенпроизводных, таких как 2-метокси (**3a**), 3,4-диметокси (**3g**), 3,5-диметокси (**3r**), 4-хлор (**3m**) и 2,4-дихлор (**3n**).

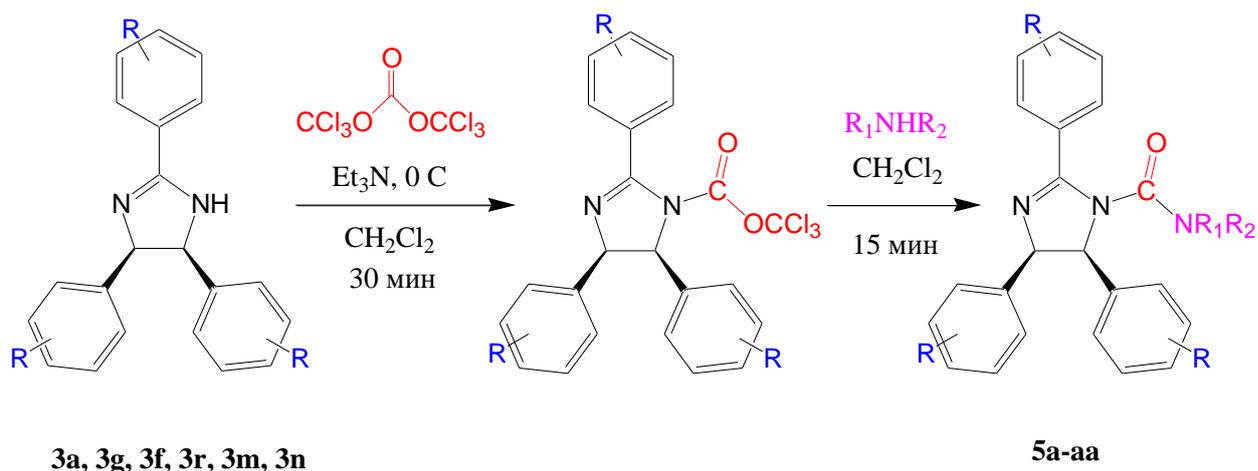
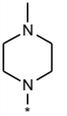
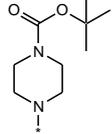
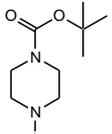
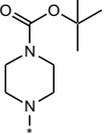


Схема №6. Синтез карбамоил-замещенных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов

Таблица №7. Выходы карбамоильных производных имидазолинов.

Соединение	R	R ₂	Выход, %	Соединение	R	R ₂	Выход, %
5a	4-MeO		37	5o	3,4-диMeO		33
5b	4-MeO		40	5p	3,4-диMeO		14
5c	4-MeO		42	5q	3,4-диMeO		30
5d	4-MeO		75	5r	3,4-диMeO		40
5e	4-MeO		40	5s	3,4-диMeO		35

5f	4-MeO		41	5t	3,4-диMeO		29
5g	4-MeO		37	5u	3,5-диMeO		47
5h	2-MeO		40	5v	3,5-диMeO		40
5i	2,4-диMeO		34	5w	3,5-диMeO		26
5j	2,4-диMeO		39	5x	4-Cl		37
5k	2,4-диMeO		66	5y	2,4-диCl		56
5l	2,4-диMeO		55	5z	2,4-диCl		40
5m	2,4-диMeO		20	5aa	2,4-диCl		70
5n	3,4-диMeO		15				

Данный метод в отличие от модификации сульфамойлхлоридами не требует синтеза промежуточных реагентов и протекает *one-pot*, что, несомненно, является преимуществом. Умеренные выходы в данной реакции могут быть оптимизированы при увеличенных загрузках. Таким образом, нами была показана возможность модификации разнообразных алкокси-содержащих имидазолинов по азоту имидазолинового цикла.

3.1.10. Синтез новых 2-замещенных производных алкокси-имидазолинов

Известно, что арильный заместитель в положении 2 имидазолинового цикла нутлинов играет важную роль в связывании с MDM2, занимая Phe карман связывания (рис. 9). Возможно, отчасти с этим связаны лучшие биологические характеристики соединения **3f** в сравнении с

другими 4-метоксипроизводными, поскольку 2,4-диметоксифенильный фрагмент имеет структурное сходство с арильным фрагментом в положении 2 нутлина (рис. 9). Поэтому следующим этапом работы стала разработка метода, позволяющего собирать имидазолины, разнообразно замещенные не только по атому азота, но и по положению 2.

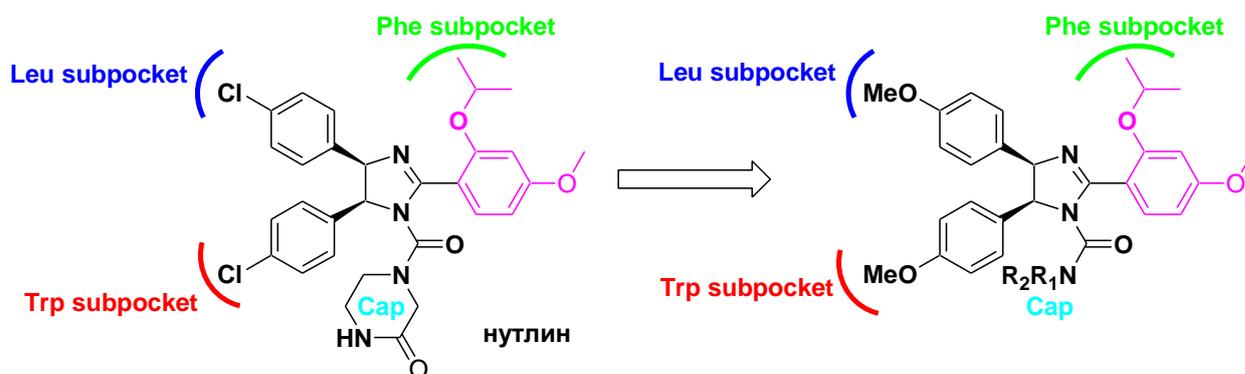


Рисунок №9. Предполагаемое направление дальнейших модификаций имидазолинов по положению 2.

Ключевой стадией синтеза подобных несимметрично замещенных имидазолинов является синтез *эритро*-1,2-диарилэтилендиаминов, содержащих необходимые метокси-группы в арильном фрагменте. Стоит отметить, что данный синтез является нетривиальной задачей. Несмотря на то, что в литературе, посвященной синтезу нутлинов, есть описание простого метода стереоселективного синтеза производного такого диамина путем сплавления бензальдегида или 4-хлорбензальдегида с ацетатом аммония с последующим гидролизом (см. схему в литобзоре №18) [185] в случае донорных заместителей в бензольном кольце этот метод перестает работать и целевые продукты могут быть получены лишь с неудовлетворительными выходами. Ключевой стадией механизма реакции с ацетатом аммония является образование имидазолина. Известно, что имидазолиновый цикл может быть восстановлен под действием металлов, например, амальгама алюминия. Однако, данная реакция также была изучена лишь на самых простейших субстратах и в случае увеличения количества метокси-групп приводила к сложным смесям продуктов. Кроме того, использование ртути не желательно в синтезе фармакологических субстанций. Поэтому нами был проведен поиск альтернативного варианта восстановления имидазолинового цикла с целью выхода к производным вицинальных диаминов.

3.1.11. Восстановление 2,4,5-триарилимидазолинов металлическим натрием

Нами было показано, что в условиях, аналогичных реакции Буво-Блана, применяемой для сложных эфиров, происходит восстановление имидазолинового цикла с образованием целевых

эритро-вицинальных диаминов. Условия реакции были нами дополнительно модифицированы под наш субстрат. Так оказалось, что при проведении реакции в этиловом или бутиловом спирте требуются большие избытки натрия из-за его быстрого расходования. Сократить требуемые количества натрия удалось, проводя реакцию в смеси тетрагидрофуран/изопропанол, добавляя изопропанол дозированно в ходе реакции.

В ходе оптимизации условий реакции нами была обнаружена интересная зависимость продуктов реакции от соотношения ТГФ и изопропилового спирта. Так, при растворении исходного вещества в 30 мл ТГФ с последующим добавлением изопропанола (концентрация имидазолина 70 мМ/л) восстановление соединений **3с**, **3х**, **3у**, **3з**, **3аа**, **3аб** приводит не к вицинальным диаминам, а к дибензиламинам, в то время как при увеличении количества исходного ТГФ до 60 мл (концентрация имидазолина 35 мМ/л) основным продуктом реакции является *эритро*-этилендиамин (схема 7). Для остальных производных (см. таблицу 8) были получены преимущественно *эритро*-диамины с умеренными выходами.

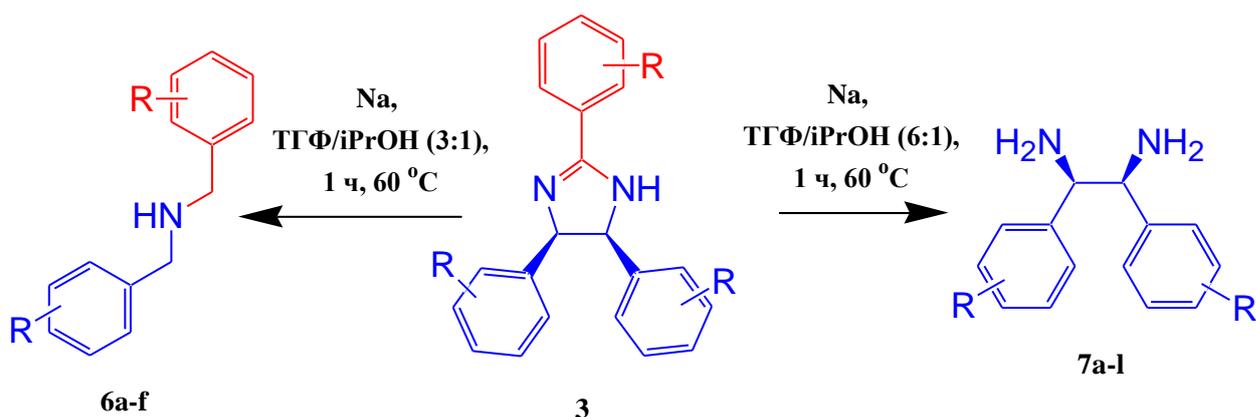


Схема 7. Восстановление 2,4,5-триарилимидазолинов металлическим натрием.

Таблица 8. Выходы продуктов восстановления имидазолинов металлическим натрием.

3	ТГФ:iPrOH 3:1 (продукт, выход %)	ТГФ:iPrOH 6:1, (продукт, выход %)
3z (2-Me)	55% (6a)	43% (7a)
3y (3-Me)	45% (6b)	40% (7b)
3x (4-Me)	62% (6c)	42% (7c)
3аа (4-Et)	53% (6d)	62% (7d)
3аб (4-iPr)	68% (6e)	- ¹
3а (2-MeO)	50% (7e)	45% (7e)
3b (3-MeO)	- ²	- ²
3с (4-MeO)	65% (6f)	86% (7f)
3j (4-EtO)	- ¹	29% (7g)
3h (2,5-диMeO)	53% (7h)	40% (7h)
3f (2,4-диMeO)	43% (7i)	58% (7i)
3g (3,4-диMeO)	- ³	40% (7j)

3ad (2,3,4-триМеО)	- ³	35% (7k)
3ac (2,4,5-триМеО)	- ²	20% (7l)
- ¹ неидентифицируемая смесь		
- ² в обоих случаях получается смесь диаминов		
- ³ испытания не проводились		

Вероятно, с увеличением количества спирта в реакционной смеси пропорционально возрастает доля образующегося в ходе реакции изопропанола с натрием основания, что сказывается на изменении механизма реакции (схема 8). В случае избытка изопропанола образующийся изопропилат может провоцировать ретро-циклизацию имидазолина до диазапентадиена с его последующим восстановлением до дибензиламина, в то время как при небольших концентрациях спирта преобладающим процессом становится одноэлектронный перенос с поверхности металла и восстановление имидазолинового цикла до имидазолидинового.

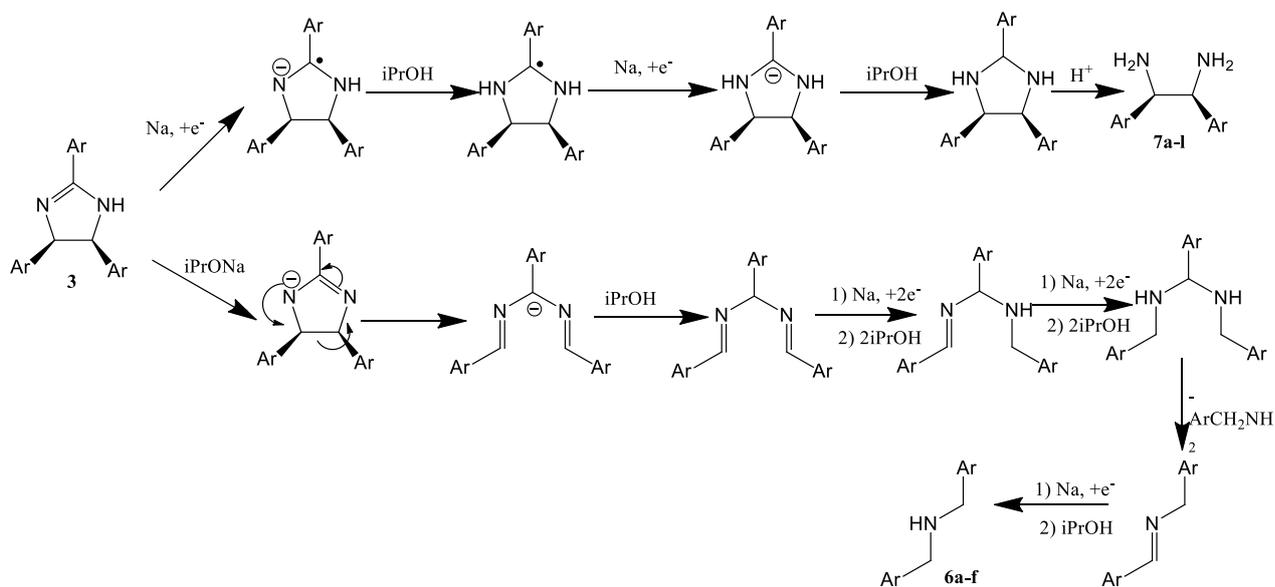


Схема 8. Предполагаемый механизм восстановления имидазолинов при различном соотношении спирта и тетрагидрофурана.

Ограничения метода показаны на схеме 9. Так, в условиях реакции происходит восстановление галогеновых заместителей, а также восстановительное элиминирование метокси-группы в стерически нагруженных полиалкоксисубстратах.

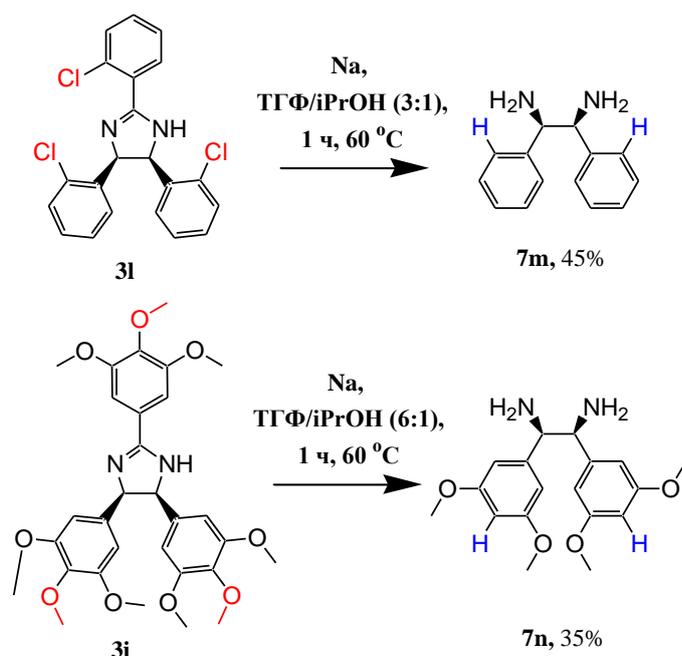


Схема 9. Нестандартные продукты восстановления 2,4,5-триарилимидазолинов металлическим натрием.

Также на данной стадии работы можно выделить следующие закономерности:

- В случае метокси-производных дибензиламинов был выделен только для *пара* изомера **3с**, в то время как для *мета*-метокси **3б** производного всегда получается смесь продуктов, а восстановление *орто*-метоксиимидазолина **3а** всегда приводит к 1,2-диарилэтилендиамину.
- В хлорпроизводном **3l** в условиях реакции происходит замещение галогенов на водород с образованием незамещенного *эритро*-1,2-дифенилэтилендиамина (схема 9).
- В случае с 3,4,5-триметокси производным **3i** восстановление приводит к 3,5-производному этилендиамина (схема 9). Структура подтверждена методами ЯМР и спектроскопии высокого разрешения.

Таким образом, нами разработан новый способ получения эритроэтилендиаминов с умеренными выходами при восстановлении натрием в тетрагидрофуране.

3.1.12. Сборка имидазолинового цикла с новым типом замещения по положению 2

Синтетический подход к синтезу имидазолинов из вицинальных диаминов подробно описан в литературном обзоре (схема 1-19 литературного обзора). Нами был выбран метод, основанный на использовании альдегида в качестве карбонильной компоненты с одновременным окислением образующегося имидазолидина. В качестве окислителя выбран молекулярный йод, как хорошо зарекомендовавший себя метод в синтезе имидазолинов [200]. Нами было показано на модельной реакции с *эритро*-1,2-(4-метоксифенил)этилендиамин **7f**, что данная реакция может быть

проведена с хорошими выходами, причем время реакции зависит от реакционной способности альдегида. Так, для альдегида, содержащего акцепторный галоген, реакция проходит за 3 ч, в то время как реакция с диалкоксиальдегидами требовала кипячения вплоть до нескольких суток (схема 10). Синтез 2-изопропокси-4-метоксибензальдегида осуществляли по стандартным методикам [63].

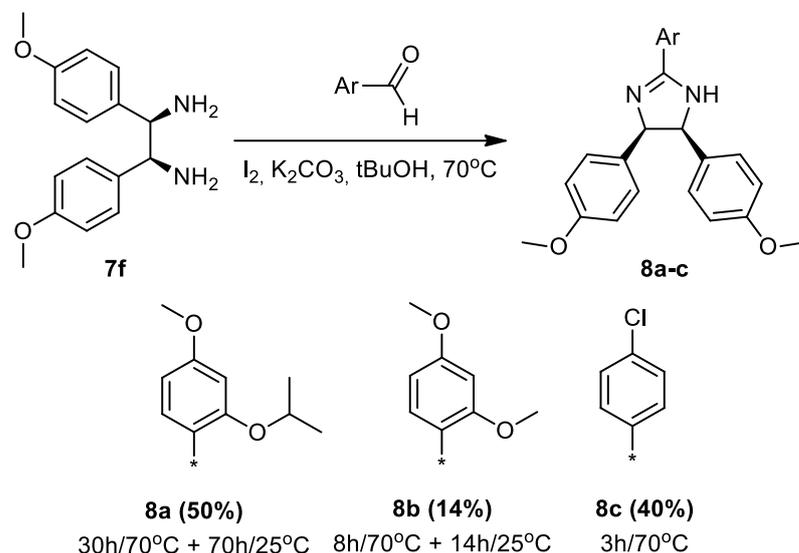


Схема №10. Синтез новых 2-замещенных 4,5-диарилимидазолинов.

Полученный имидазолин **8a** был введен в реакцию с трифосгеном и пиперидином для введения дополнительного заместителя на атом азота. Полученное соединения является близким аналогом нутлина-3а, но при этом содержит метоксигруппы вместо атомов галогена и обладает значительно лучшей растворимостью в воде, чем нутлин.

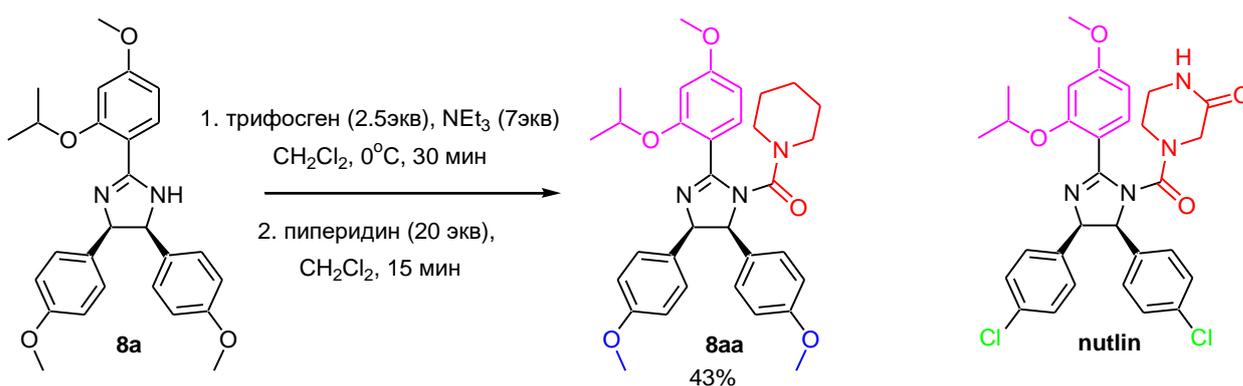


Схема 11. Синтез аналога нутлина, содержащего целевой фармакофорный фрагмент в положении 2 имидазолинового цикла

3.2. Биологическая активность замещенных 2,4,5-триарилимидазолиновых производных

На следующем этапе нашей работы была изучена биологическая активность синтезированных нами модифицированных имидазолинов. Была изучена их цитотоксичность, а также способность влиять на уровень p53 и p53-зависимых белков в клетке.

3.3.1. Биологическая активность сульфонамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов⁷

Биологическую активность сульфонамидных производных **4b**, **4c**, **4e-g**, **4i-l** изучали на трех линиях раковых клеток, экспрессирующих p53 дикого типа: аденокарциноме легкого A549, карциноме толстой кишки RKO и нейробластоме SH-SY5Y, для которых нутлин вызывает стабилизацию p53. Важно напомнить, что ингибиторы p53-MDM2 могут нарушать белок-белковые взаимодействия только в клетках, сохраняющих p53 дикого типа [21].

Методом вестерн-блот-анализа было показано, что сульфониламидные производные **4b**, **4c**, **4k**, **4l** не влияют на уровень p53 и p21, в то время как 3,4-диMeO производные **4g-j** в концентрациях 10-20 мкМ повышали уровень p53 и p21 в клетках A549 и RKO (рис. 10), причем повышение уровня p21 было значительно выше, чем влияние на p53. Так, обработка соединением **4j** в концентрации 10 мкМ приводит к незначительному повышению уровня p53 в 1,2 и 1,3 раза, но уровень экспрессии p21 при этом возрастает в 2,2 и 2,38 раза по сравнению с необработанными клетками линий RKO и A549 соответственно. Соединения **4g-i** не стабилизируют уровень p53 в клетках A549, но производные **4g** и **4i** способны индуцировать экспрессию p21 (**4g** при 20 мкМ – в 1,9 раза, **4i** при 10 мкМ – повышение уровня p21 в 1,5 раза). При этом все они вызывали повышение уровня и p53, и p21 в клетках RKO: **4g** при 20 мкМ – в 1,5 и 7,1 раза, **4h** при 20 мкМ – в 2,7 и 2,8 раза и **4i** при 10 мкМ – в 3,3 и 2,1 раза, соответственно (рис.10). Производные **4f-j** также незначительно стабилизировали уровень p53 в клетках SH-SY5Y при 10 мкМ: от 1,16 (**4f**) до 1,53-кратного (**4g**) повышения уровня p53. Точно так же они были способны индуцировать накопление p21.

Соединения **4i** и **4h**, которые были наиболее эффективны в отношении клеток RKO были также протестированы в более низких концентрациях (рис.11). Соединения способны стабилизировать уровень p53 в клетках RKO в диапазоне концентраций 500 нМ – 5 мкМ: **4i** –

⁷ Тестирование проводилось совместно с аспирантом Первушиным Н.В. и к.б.н. в.н.с. Копеиной Г.С., факультет фундаментальной медицины, МГУ

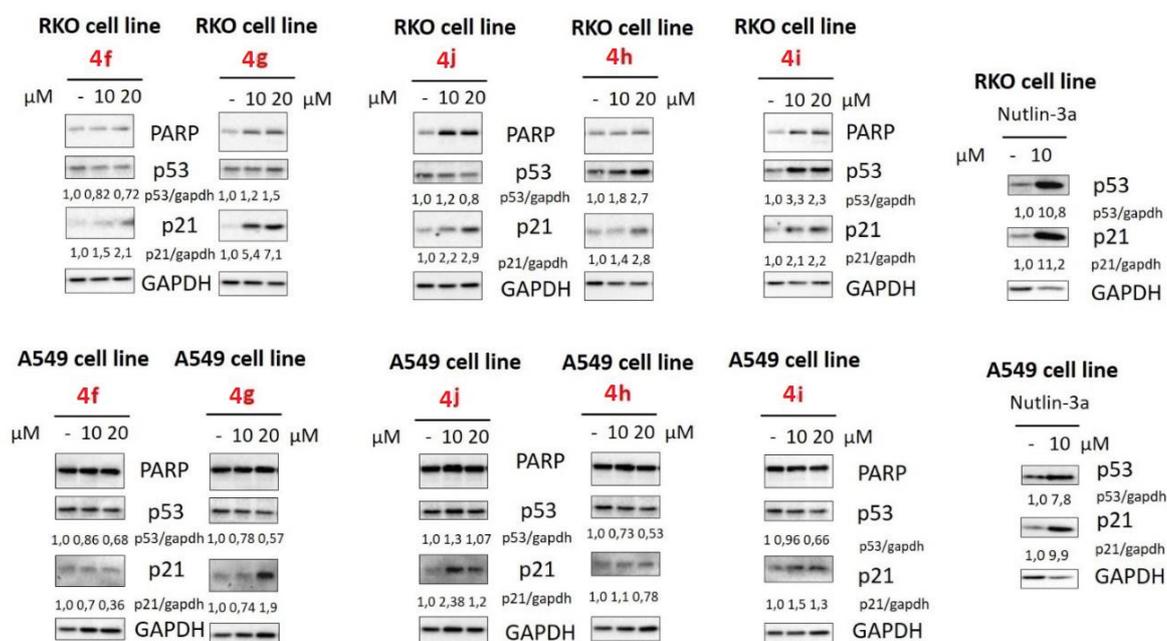


Рисунок 10. Вестерн-блот-анализ общих клеточных лизатов клеток A549 или RKO после обработки соединениями **4f-j**. GAPDH использовали в качестве контроля.

от 1,2 (500 нМ) до 2,1-кратного (5 мкМ). Эти соединения также были способны вызывать накопление белка p21: **4h** – до 3,2-кратного и **4i** – до 4,0-кратного (рис.11). Однако исследуемые соединения не вызывали повышения уровня p53 и p21 в концентрациях ниже 500 нМ. Сравнение этих соединений с низкими концентрациями нутлин-3а и RG7112 показало, что нутлин-3а также не мог эффективно стабилизировать белок p53 и повышать уровень p21 до 500 нМ в клетках RKO, как соединения **4i** и **4h**, в то время как RG7112 был способен усиливать накопление белков p53 и p21 уже при 100 нМ

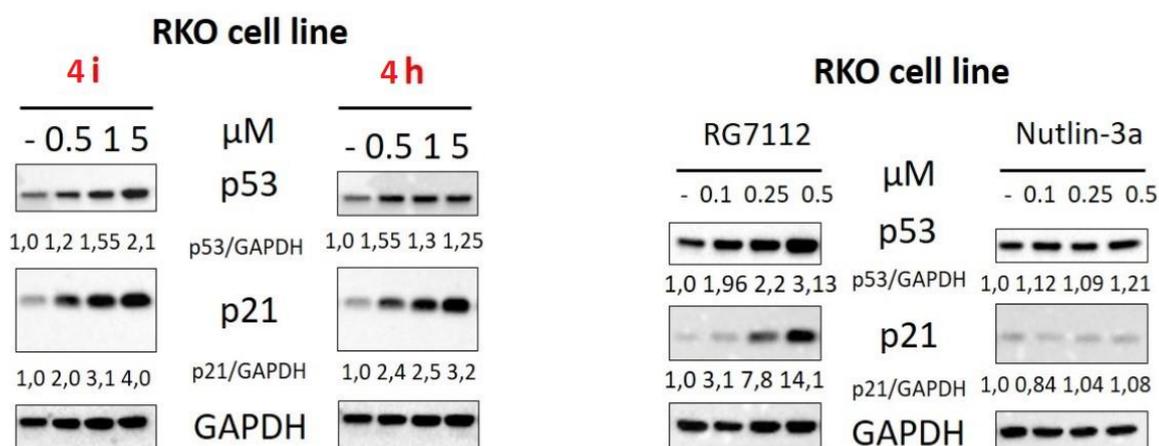


Рисунок №11. Вестерн-блот-анализ суммарных клеточных лизатов клеток RKO при обработке соединениями **4h, 4i**, Nutlin-3а и RG7112. GAPDH использовали в качестве контроля.

Кроме того, соединения **4f-j** не индуцируют апоптоз в клетках A549 и RKO в концентрации до 20 мкМ, эти соединения не вызывают расщепления PARP (рис.11), которая участвует в процессе репарации повреждений ДНК, а ее фрагмент служит известным маркером апоптоза [201]. Результаты для производных **4h** и **4i** (оба - 20 мкМ) были подтверждены данными, полученными с помощью проточного цитометрического анализа с двойным окрашиванием с использованием аннексина V-FITC в сочетании с йодидом пропидия (PI) [201]. Анализ гибели клеток с окрашиванием аннексином V-FITC/PI показал, что соединения **4h** и **4i** в указанной концентрации не снижали жизнеспособность клеток по сравнению с контрольными клетками и не индуцировали апоптоз или некроз (рис.12). Примечательно, что нутлин-3а также не запускал апоптоз в клетках A549 и RKO. Соединения семейства нутлинов способны индуцировать апоптоз только в небольшой подгруппе раковых клеток, экспрессирующих *p53* дикого типа. По этой причине нутлины обычно используются в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами [202]. Сходные результаты были показаны для SH-SY5Y: все испытанные соединения (10 мкМ) не приводили к расщеплению PARP.

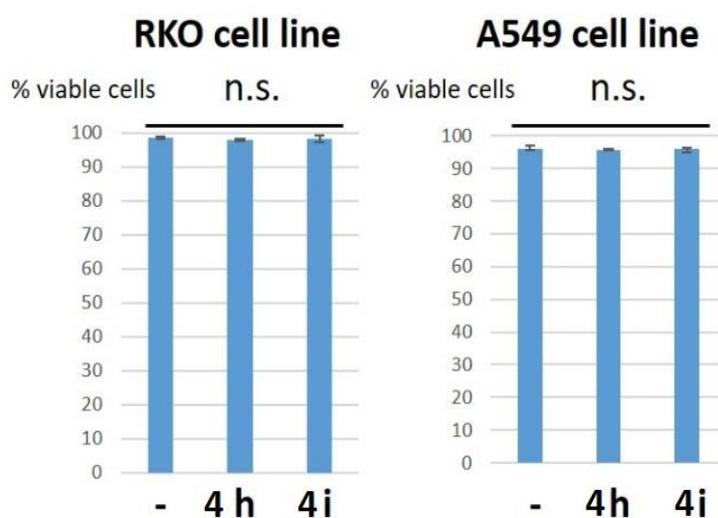


Рисунок 12. Гистограмма данных анализа проточной цитометрии клеток RKO, обработанных соединениями **4h** и **4i**.

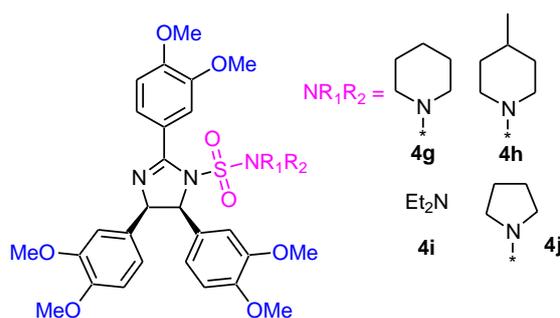
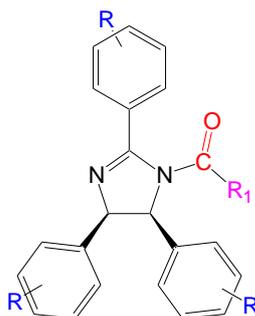


Рис. 13. Наиболее активные сульфонамидные производные

В совокупности результаты данного этапа показывают, что несколько производных, принадлежащих к сульфонамидным производным имидазолина, способны индуцировать p21, но их влияние на увеличение уровня p53 не столь значительно

(рис.13). Согласно анализу обработанных клеток A549, RKO и SH-SY5Y, наиболее эффективными соединениями оказались 3,4-диметоксизамещенные соединения **4g**, **4h**, **4i** и **4j**, которые приводят к накоплению p53 до 3,3 раз (**4i**, 10 мкМ – РКО) и **p21** до 7,1 (**4h**, 20 мкМ – РКО).

3.3.3. Биологическая активность карбамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов

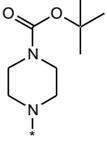
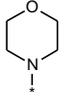
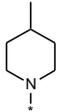
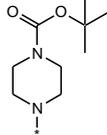


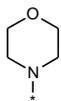
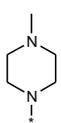
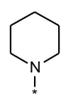
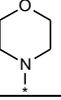
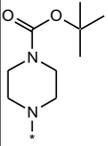
На первом этапе анализа биологической активности карбамидных производных нами проведено измерение цитотоксичности методом МТТ теста. Результаты представлены в таблице №9. Показано, что цитотоксичность сопоставима с соединением сравнения – нутлином-3а – и находится в микромолярном диапазоне.

Таблица №9. Цитотоксичность карбамоильных производных⁸.

№	Соединение	R	R1	Ингибирующая активность, (IC50, μM)		
				A549	HCT-116	MCF-7
1	5a	4-MeO		58.2±9.2	54.4±9.2	69±9
2	5b	4-MeO		165±100	>200	131,5±39
3	5c	4-MeO		53.9±7	54±6	62±8
4	5d	4-MeO		38±5	37.9±11	38,5±6
5	5e	4-MeO		124±60	115,3±21,5	167±70
6	5f	4-MeO		38,8±4,5	27,1±2,3	35,8±3,6

⁸ Исследования цитотоксичности выполнены совместно с к.х.н. Грачевой Ю.А.

7	5g	4-MeO		89,8±7,5	40,5±5,5	59,8±7,4
8	5h	2-MeO		60,4±26,3	58,8±24,2	75±40
9	5i	2,4-диMeO		35,2±6,4	30,4±7,6	31,5±13,8
10	5j	2,4-диMeO		105,7±20,2	126,3±80,5	161±100
11	5k	2,4-диMeO		30±2,5	23,3±5,5	31,3±2,4
12	5l	2,4-диMeO		17,8±2,1	16,2±2,5	17±5
13	5m	2,4-диMeO		21±3	12,6±4,5	19,4±2,5
14	5n	3,4-диMeO		105.2±25	50.7±10	64.7±15
15	5o	3,4-диMeO		123.4±41.5	131±38	115±35
16	5p	3,4-диMeO		104.4±50.5	102.6±73.2	>200
17	5q	3,4-диMeO		123.1±50	112,3±27	108.8±15
18	5r	3,4-диMeO		-	>200	151±50
19	5s	3,4-диMeO		102.1±50	77.9±7.2	84.3±12
20	5t	3,4-диMeO		>200	>200	104±35

21	5u	3,5-диMeO		24,6±6,3	9,3±4,7	29,4±9,1
22	5v	3,5-диMeO		93,6±20	97,5±12,3	94,2±10
23	5w	3,5-диMeO		104,3±36	64,6±36	100,8±75, 5
24	5x	4-Cl		16,2±3,1	11,2±2,5	14,6±4,5
25	5y	2,4-диCl		25,2±8,2	24,2±12,1	40,6±8,2
26	5z	2,4-диCl		18,7±2,5	17,7±1,5	18,1±1,7
27	5aa	2,4-диCl		86,6±45,4	21±8	74,1±40,2

Далее нами проверена способность карбамидных молекул стабилизировать p53 и индуцировать экспрессию p53-зависимых генов - CDKN1A и BBC3, кодирующих p21 и Puma (p53-активируемый модулятор апоптоза), соответственно⁹ [203; 204]. p21, ингибитор циклинзависимой киназы, играет важную роль в остановке клеточного цикла и защищает клетки от различных стрессовых воздействий, включая повреждение ДНК [205]. Кроме того, p21 принимает участие в регуляции апоптоза, формы PCD. Puma, проапоптотический белок семейства Bcl-2, способен ингибировать антиапоптотические белки этого семейства, что приводит к активации апоптоза [204; 206]. Важно отметить, что нутлин-3а ингибирует p53-MDM2 взаимодействие и приводит к стабилизации белка p53, что, в свою очередь, вызывает повышение уровней p21 и Puma.

Для анализа данной активности нами отобраны 22 соединения, которые были протестированы на клеточной линии карциномы толстой кишки RKO, экспрессирующей p53 дикого типа [207]. Ряд производных, содержащих 2,4-диметоксифенильный фрагмент, был выбран для скрининга благодаря ранее показанным многообещающим результатам [208]. Другие соединения из этой группы были выбраны для оценки взаимосвязи структура-свойство.

⁹ Тестирование проводилось совместно с аспирантом Первушиным Н.В. и к.б.н. в.н.с. Копеиной Г.С., факультет фундаментальной медицины, МГУ

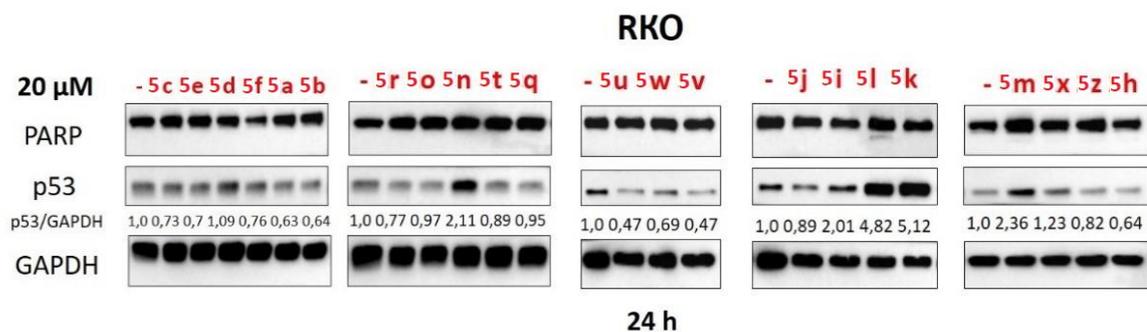


Рисунок №14. Вестерн-блот анализ тотальных клеточных лизатов клеток RKO при обработке соединениями. GAPDH использовали в качестве контроля.

Клетки RKO обрабатывали соединениями в концентрациях 20 мкМ, поскольку ранее нами было установлено, что эта концентрация оказалась наиболее эффективной для незамещенных алкоксипроизводных [208]. Через 24 часа инкубации уровни p53 в обработанных клетках оценивали с помощью вестерн-блотт-анализа. Среди всех соединений (рис. №14) два производных (**5l** и **5k**) вызывали 4,82-кратное (**5l**) и 5,12-кратное (**5k**) увеличение уровня p53 по сравнению с необработанными клетками. Цитотоксичность **5l** и **5k** при этом была сопоставима с нутлин-3а (табл. №9). В сравнении с нутлином-3а (10 мкМ) [209] и RG7388 (5 мкМ), которые использовали в качестве положительных контролей, соединения **5l** и **5k** были также способны эффективно стимулировать повышение уровня как p53, так и p21 в клетках RKO, причем в случае **5k** уровень p53 повышался до 7.7 раз, а p21 – в 4.3 раза (рис.16 А).

Соединения **5l** и **5k** в клетках RKO проявляли активность и в более низких концентрациях. Производное **5l** способно стабилизировать уровень p53 в диапазоне концентраций 500 нМ–10 мкМ, вызывая повышение от 1,31 (500 нМ) до 3,8-кратного (10 мкМ). Обработка же соединением **5k** приводила к эффективному накоплению p53 только при 5 и 10 мкМ. Оба соединения вызывали рост уровня p21, начиная с 500 нМ (рис. 15А). Примечательно, что нутлин 3а также начинает действовать лишь начиная с 500 нМ концентрации (рис.15В).

Чтобы оценить, вызывают ли синтезированные соединения гибель клеток, мы оценивали с помощью вестерн-блот анализа вызванное соединениями расщепление PARP,

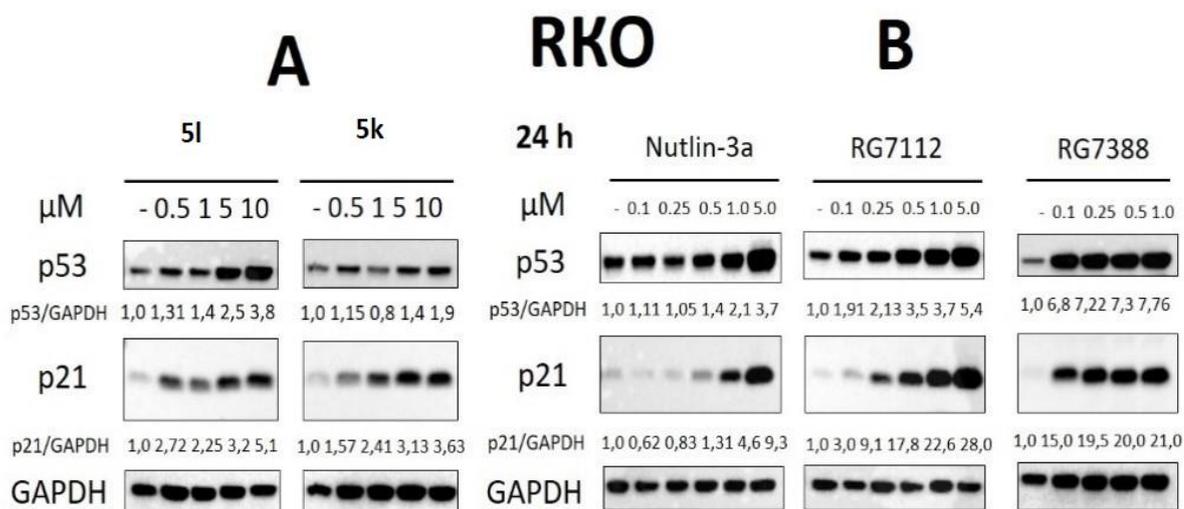


Рисунок №15. Вестерн-блот анализ общих клеточных лизатов клеток RKO после обработки **5l**, **5k** (A), нутлин-3а, RG7112 и RG7388 (B). GAPDH использовали в качестве контроля.

известного маркера апоптоза [201]. Среди всех протестированных соединений только **5l** вызывало незначительное накопление расщепленного фрагмента PARP (рис. 14). Для подтверждения полученных данных проведен проточный цитометрический анализ с использованием двойного окрашивания аннексином V-FITC и йодидом пропидия, что позволяет оценить популяцию апоптотических и некротических клеток [210]. Анализ гибели клеток с использованием окрашивания аннексином V-FITC/PI показал, что только **5l** в некоторой степени (около 15%) ослаблял жизнеспособность клеток по сравнению с необработанными клетками RKO (рис. 16C). Сходные результаты были продемонстрированы с использованием другого проточного цитометрического анализа sub-G1 (рисунок №16C), в котором процент популяции sub-G1 отражает количество апоптотических клеток [211].

Следует отметить, что в низких концентрациях контрольные соединения - нутлин-3а (10 мкМ) и RG7388 (5 мкМ) в свою очередь также не снижали жизнеспособность клеток RKO (рис. 16C). Однако, при 20 мкМ RG7112 и RG7388 приводили к выраженному накоплению расщепленного PARP. Эти данные были подтверждены проточным цитометрическим анализом с использованием окрашивания аннексином V-FITC/PI: RG7388 и RG7112 вызывали снижение популяции живых клеток до 73,3% и 57,5% соответственно.

Соединения **5l** и **5k** были также протестированы на двух клеточных линиях нейробластомы, SK-N-SH и SH-SY5Y (рис. 17). Мы обнаружили, что оба соединения значительно повышали уровни p53 (до 4,11–**5l**), p21 (до 5,47–**5l**) и Puma (до 1,7–**5k**) (рисунок №17 A, B) в SK-N-SH. Более того, показано, что в клетках SH-SY5Y оба производных также значительно повышали уровни p53 (до 6,83–**5l**), p21 (до 11,2–**5l**) и Puma (до 2,83–**5l**) (рис.17

D, E). При этом, согласно анализу sub-G1, **5l** и **5k** не снижали жизнеспособность клеток, в отличие от нутлина-3а и RG7388, в обеих клеточных линиях (рисунок №17 С, F).

Наконец, была проанализирована биологическая активность двух соединений **5l** и **5k** в линии клеток остеосаркомы SJSA-1 и линии рака предстательной железы LNCaP (рис. 18). Примечательно, что для SJSA-1 характерна амплификация гена *MDM2*. Обработка клеток производным **5l** вызвала повышение уровня p53 (до 3,1), p21 (до 13,7) и Puma (до 4,22) на обеих линиях раковых клеток. Несмотря на изначально избыточное количество MDM2 в клетках SJSA-1, **5l** тем не менее был способен повышать уровень p53 и в этой клеточной линии.

В совокупности соединение **5l** было более эффективным, чем **5k**, и вызывало высокое накопление уровней p53, p21 и Puma в исследованных линиях раковых клеток, экспрессирующих p53 дикого типа.

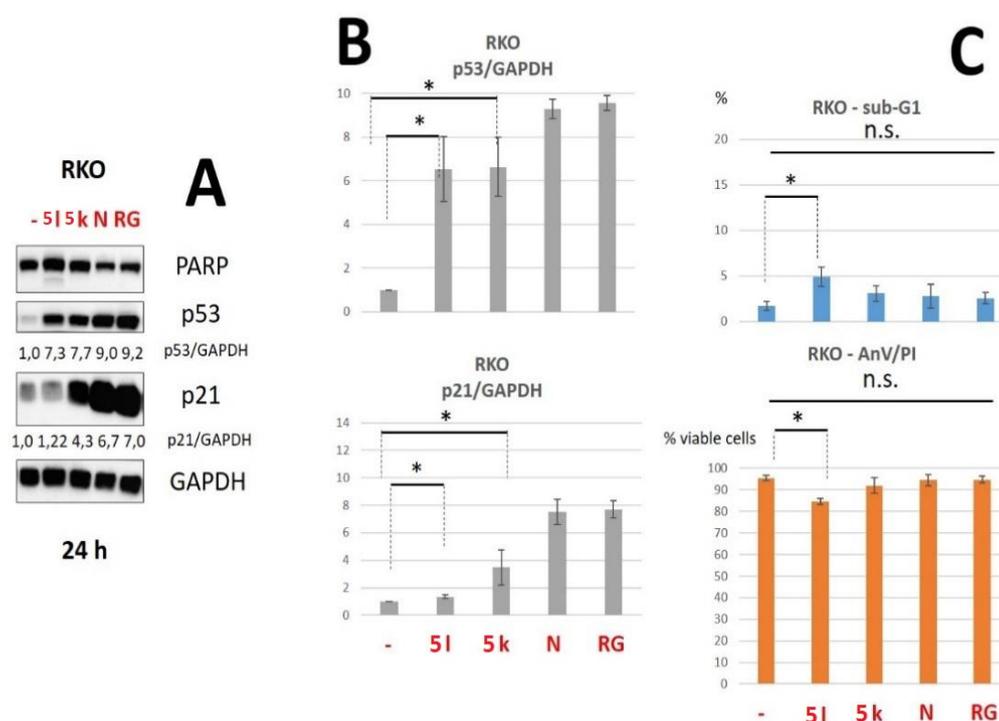


Рисунок №16. (А). Вестерн-блот анализ тотальных клеточных лизатов клеток RKO при обработке соединениями **5l**, **5k** (оба — 20 мкМ), нутлин-3а (10 мкМ) и RG7388 (5 мкМ). (В)—денситометрический анализ полос p53, нормализованных к GAPDH. Данные представлены как среднее +/- SD из трех независимых экспериментов. (С) — гистограммы данных анализа проточной цитометрии (FC) для клеток RKO: анализ sub-G1 (вверху), % — процент популяции Sub-G1 и окрашивание аннексином V-FITC/PI (внизу), % жизнеспособных клеток — клетки отрицательные как для аннексина V-FITC, так и для йодида пропидия (PI). N – нутлин-3а (10 мкМ), R – RG7388 (5 мкМ).

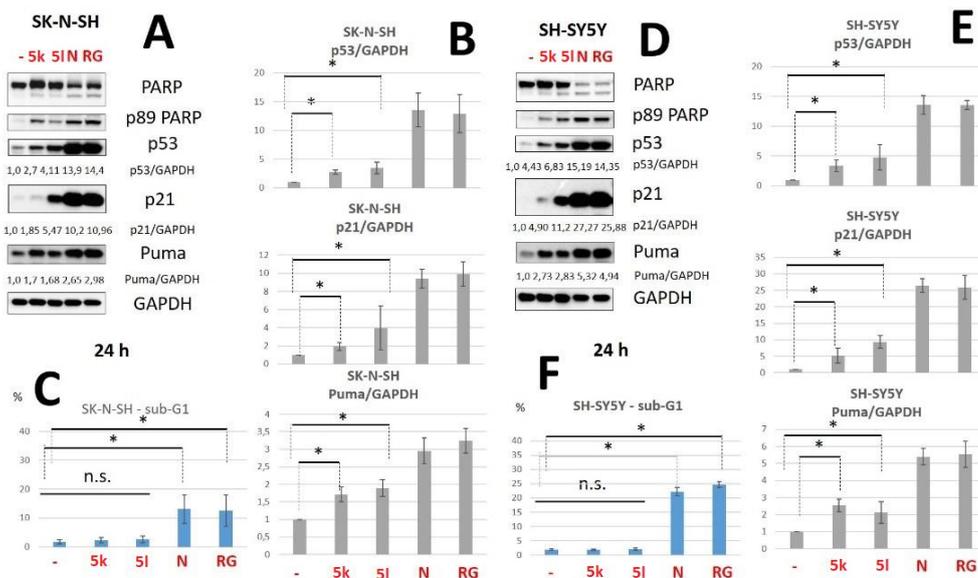


Рисунок №17. Вестерн-блот-анализ суммарных клеточных лизатов клеток SK-N-SH (A) и SH-SY5Y (Г) при обработке соединениями 5l, 5k (оба — 20 мкМ), нутлин-3а (10 мкМ) и RG7388 (5 мкМ). (B, E) — денситометрический анализ полос p53, p21 и Puma, нормализованных к GAPDH, в клетках SK-N-SH (B) и SH-SY5Y (E). Данные представлены как среднее +/- SD из трех независимых экспериментов. (C, F) - гистограмма данных анализа проточной цитометрии (FC) для клеток SK-N-SH с использованием анализа sub-G1, % - процент популяции Sub-G1. N — нутлин-3а (10 мкМ), R — RG7388 (5 мкМ).

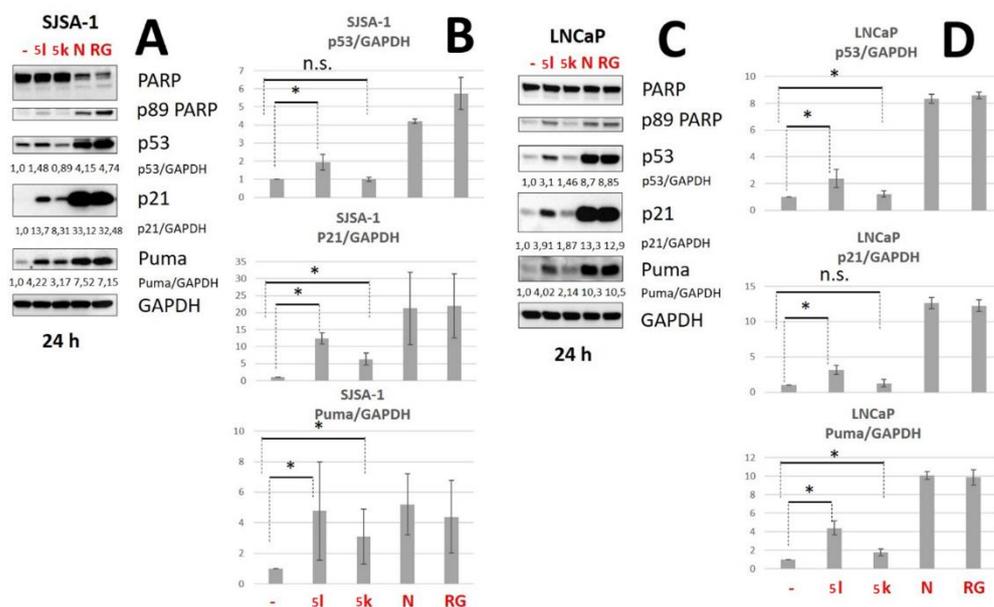


Рисунок №18. А, С. Вестерн-блот-анализ общих клеточных лизатов из клеток SJS-A-1 (A) и LNCaP (C) после обработки соединениями 5l, 5k, Nutlin-3а и RG7388. В, D - денситометрический анализ полос p53, p21 и Puma, нормализованных к GAPDH в клетках SJS-A-1 (B) и LNCaP (D). $p < 0,05$, n.s. – незначимо. PARP – поли (АДФ-рибоза)-полимераза; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; p53/GAPDH, p21/GAPDH и Puma/GAPDH – денситометрический анализ полос p53, p21 и Puma, нормированных на GAPDH, h – часы, N - нутлин-3а (10 мкМ), R – RG7388 (5 мкМ).

4. Экспериментальная часть¹⁰

4.1. Органический синтез

Исходные соединения, если не сказано иное, приобретены у компании Merck. Все растворители очищали стандартными способами. Контроль реакций осуществляли тонкослойной хроматографией (ТСХ), проводимой на пластинах Merck TLC с силикагелем (60 F254), с использованием УФ-излучения для визуализации. Очистку методом колоночной хроматографии проводили на силикагеле 60 (размер частиц 0,040–0,060 мм).

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C зарегистрированы при 298 К на спектрометре Bruker Avance 300 с рабочими частотами 400 и 100 МГц соответственно и откалиброваны по остаточному CHCl₃ (δH = 7,27 м.д.) и CDCl₃ (δC = 77,16 м.д.) или DMSO-d₅ (δH = 2,50 м.д.) и DMSO-d₆ (δC = 39,52 м.д.) в качестве внутренних стандартов. Данные ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг (δ м.д.) относительно ТМС (тетраметилсилана), (с = синглет, д = дублет, дд = дублет дублетов, т = триплет, кв = квадруплет, м = мультиплет, уш. = уширение.), константа спин-спинового взаимодействия (J) выражена в Герцах (Гц). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) измеряли на приборе Thermo Scientific LTQ Orbitrap с использованием ионизации наноэлектрораспылением (нано-ESI).

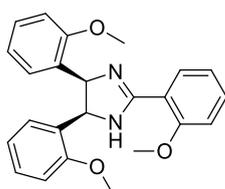
4.1.1. Синтез незамещенных 2,4,5-триарилимидазолинов (3a-ad)

К 4-метоксибензальдегиду (1 г, 7.5 ммоль) или 4-метилбензальдегиду (1 г, 8.5 ммоль) добавляли 30 мл 25%-го водного раствора NH₃. Перемешивали реакционную смесь в течение суток. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и оставляли сушиться. Для остальных арилальдегидов: растворяли 1 г (значения в молях в описаниях продукта) твердого арилальдегида в 50 мл ТГФ. Насыщали растворитель газообразным аммиаком в течение 20 минут, оставляли при перемешивании на сутки. На следующий день повторяли процедуру насыщения аммиаком и оставляли еще на сутки, после чего упаривали растворитель. Полученные твердые или маслообразные вещества использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. Растворяли полученный после упаривания остаток в 30 мл ТГФ, добавляли 1 г (9 ммоль) трет-бутилата калия (пока реакционная смесь не переставала окрашиваться в синий цвет). После чего реакцию останавливали добавлением 100 мл воды и

¹⁰ Основные результаты данного раздела опубликованы в следующих работах автора: D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Bioorg. and Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 16, 2364-2368; D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Med. Chem. Res.*, 2021, 30, 2216-2227; D.R. Bazanov, N.V. Pervushin, N.A. Lozinskaya et al., *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 4, 444; .Р.Базанов, Н.А. Максимова, Н.А. Лозинская et al., *Rus. J. of Org. Chem.*, 2021, 57, 11, 1834-1840; Д.Р.Базанов, В.Ю. Савицкая, Н.А. Лозинская et al., *Mend. Comm.*, 2022, 32, 680-682; материалы Международных научных конференций студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020, 2019, 2015 и 2021»

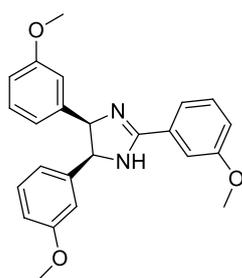
оставляли перемешиваться на сутки. Полученное вещество отфильтровывали и промывали водой в случае выпадения осадка. В случае выпадения вещества в виде масла, экстрагировали его этилацетатом 2x50 мл, сушили над CaCl₂ и упаривали растворитель. 2,4,5-Трис(арил)имидазолины выделяли методом колоночной хроматографии с использованием смеси ПЭ:ЭА (1:1) постепенно повышая содержание ЭА до 100%.

Цис-2,4,5-трис(2-метоксифенил)имидазолин (3a)



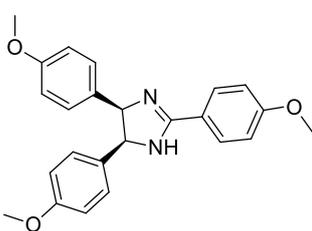
Из 1.0 г (7.4 ммоль) 2-метоксибензальдегида получено 0.6 г желтого вязкого масла (63%). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 3.63 (с, 6H), 3.93 (с, 3H), 5.87 (с, 2H), 6.56 (д, J = 8.1 Гц, 2H), 6.65 (т, J = 7.5 Гц, 2H), 6.98-7.12 (м, 6H), 7.47 (дд, J = 1.8 Гц, J = 7.8 Гц, 1H), 8.37 (дд, J = 1.6 Гц, J = 7.7 Гц, 1H); ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 54.92, 55.77, 62.69, 109.05, 111.41, 119.46, 121.28, 127.55, 128.45, 131.71, 132.08, 156.58, 157.75, 163.44. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₄H₂₅N₂O₃ 389.1860, найдено: 389.1867 [M+H]⁺.

Цис-2,4,5-трис(3-метоксифенил)имидазолин (3b)



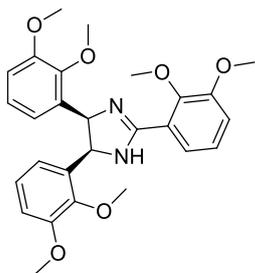
Из 1.0 г (7.4 ммоль) 3-метоксибензальдегида получено 0.65 г желтого вязкого масла 3b (68%). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 3.60 (с, 6H), 3.88 (с, 3H), 5.41 (с, 2H), 6.49 (с, 2H), 6.59 (м, 4H), 6.98 (т, J = 7.9 Гц, 2H), 7.08 (дд, J = 7.5 Гц, J = 2.5 Гц, 1H), 7.38 (т, J = 8.1 Гц, 1H), 7.48 (д, J = 7.6 Гц, 1H), 7.58 (м, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 55.10, 55.53, 112.12, 112.81, 113.03, 117.61, 119.37, 120.05, 128.61, 129.66, 131.36, 140.54, 159.13, 159.82, 164.49. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₄H₂₅N₂O₃ 389.1860, найдено 389.1852 [M+H]⁺.

Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)имидазолин (3c)



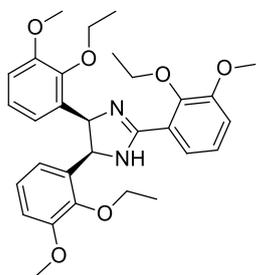
Из 1.0 г (7.4 ммоль) 4-метоксибензальдегида получено 0.9 г белого твердого вещества (95%). Т. пл. 86°C (85-87°C [185]); ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 3.68 (с, 6H), 3.87 (с, 3H), 5.32 (с, 2H), 6.59 (д, J = 8.6 Гц, 4H), 6.86 (д, J = 8.7 Гц, 4H), 6.97 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.91 (д, J = 8.7 Гц, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 55.11, 55.43, 69.95, 113.08, 113.94, 122.13, 128.57, 128.99, 131.15, 158.36, 161.93, 164.00.

Цис-2,4,5-трис(2,3-диметоксифенил)имидазолин (3d)



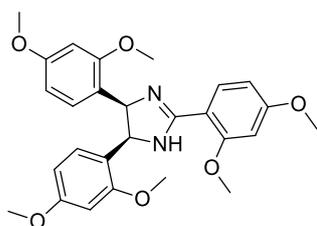
Из 2.0 г (12.0 ммоль) 2,3-диметоксибензальдегида получено 1.2 г желтого вязкого масла (67%); ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 3.73 (с, 6H), 3.74 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 3.91 (с, 6H), 5.79 (д, $J = 10.4$ Гц, 1H), 5.90 (д, $J = 10.4$ Гц, 1H), 6.51 (с, 1H), 6.63 (д, $J = 7.2$ Гц, 2H), 6.74-6.79 (м, 2H), 7.04 (д, $J = 7.0$ Гц, 1H), 7.15 (дд, $J = 7.9$ Гц, $J = 15.9$ Гц, 2H), 7.89 (д, $J = 7.8$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.81, 55.98, 59.34, 60.39, 60.73, 61.54, 66.77, 111.26, 111.46, 112.12, 114.47, 120.50, 122.13, 122.55, 122.81, 124.33, 133.23, 146.81, 148.07, 151.98, 152.89, 163.37. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ 477.2020, найдено ($\text{M}+\text{H}$): 477.2010 [$\text{M}-2\text{H}$] $^+$ (ароматизация имидазолина).

Цис-2,4,5-трис(3-метокси-2-этоксифенил)имидазолин (3e)



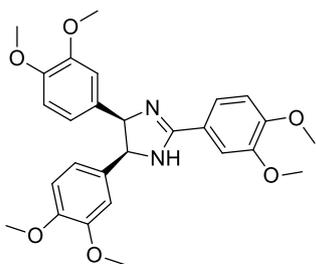
Из 1.0 г (5.6 ммоль) 3-метокси-2-метоксибензальдегида получено 0.8 г желтого вязкого масла (83%). ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 1.27 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H), 1.41 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H), 3.71 (с, 6H), 3.89 (с, 3H), 4.00 (кв, $J = 13.0$ Гц, 4H), 4.12 (кв, $J = 13.6$ Гц, 2H), 5.87 (кв, 2H), 6.62 (дд, $J = 1.4$ Гц, $J = 7.6$ Гц, 4H), 6.75 (т, $J = 7.8$ Гц, 2H), 6.85 (д, $J = 7.6$ Гц, 2H), 7.03 (дд, $J = 1.5$ Гц, $J = 8.1$ Гц, 1H), 7.15 (т, $J = 8.1$ Гц, 1H), 7.88 (дд, $J = 1.5$ Гц, $J = 7.9$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 15.48, 15.87, 55.78, 68.62, 70.05, 111.25, 114.41, 122.53, 122.65, 124.20, 133.31, 146.05, 146.98, 152.12, 152.98, 163.60. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$ 521.2490, найдено: 519.2478 [$\text{M}-2\text{H}$] $^+$ (ароматизация имидазолина).

Цис-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)имидазолин (3f)



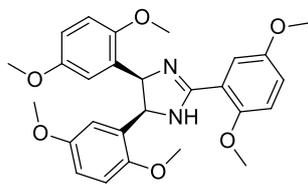
Из 3.0 г (18.1 ммоль) 2,4-диметоксибензальдегида получено 2.2 г желтого вязкого масла (76%). ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 3.60 (с, 6H), 3.70 (с, 6H), 3.88 (с, 3H), 3.89 (с, 3H), 5.69 (с, 2H), 6.15 (д, $J = 2.3$ Гц, 2H), 6.20 (дд, $J = 8.5$ Гц, $J = 2.3$ Гц, 2H), 6.53 (д, $J = 2.2$ Гц, 1H), 6.64 (дд, $J = 8.7$ Гц, $J = 2.3$ Гц, 1H), 6.94 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H), 8.39 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 54.98, 55.22, 55.58, 55.77, 61.96, 97.26, 98.73, 103.20, 105.47, 120.65, 128.88, 133.19, 157.53, 159.49, 162.96, 163.12. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ 479.2177, найдено: 479.2166 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)имидазолин (3g)



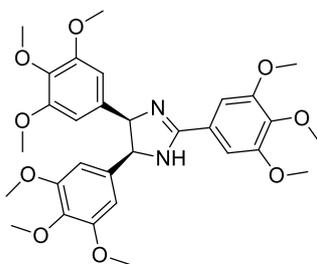
Из 2.0 г (12.0 ммоль) 3,4-диметоксибензальдегида получено 1.0 г желтого вязкого масла (53%), ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 3.77 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.85 (с, 6H), 3.88 (с, 6H), 6.74 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H), 6.79 (дд, $J = 1.7$ Гц, $J = 8.2$ Гц, 2H), 6.85 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H), 6.90 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 7.32 (д, $J = 1.8$ Гц, 2H), 7.38 (дд, $J = 1.8$ Гц, $J = 8.2$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.91, 56.10, 67.87, 108.86, 110.36, 119.36, 123.87, 126.77, 129.19, 130.06, 135.03, 149.22, 149.53, 151.62, 154.41, 160.24. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ 479.2177, найдено: 479.2166 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-трис(2,5-диметоксифенил)имидазолин (3h)



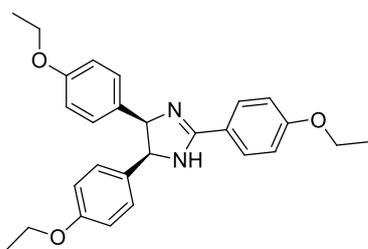
Из 2.0 г (12.0 ммоль) 2,5-диметоксибензальдегида получено 1.2 г желтого порошка (62%). Т. пл. 103°C. ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 3.55 (с, 6H), 3.58 (с, 6H), 3.85 (с, 3H), 3.90 (с, 3H), 5.76 (с, 1H), 5.88 (с, 1H), 6.50 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.55 (дд, $J = 2.5$ Гц, $J = 9.0$ Гц, 2H), 6.67 (д, $J = 15.2$ Гц, 2H), 6.96 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H), 7.03 (дд, $J = 3.2$ Гц, $J = 8.9$ Гц, 1H), 7.87 (дд, $J = 3.0$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.56, 55.70, 56.04, 56.32, 110.23, 112.75, 112.95, 114.80, 118.80, 129.31, 151.10, 152.09, 152.89, 153.78, 163.60. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ 479.2177, найдено: 479.2163 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-трис(3,4,5-триметоксифенил)имидазолин (3i)



Из 2.0 г (10.2 ммоль) 3,4,5-триметоксибензальдегида получено 1.6 г желтого порошка (84%). Т. пл. 108°C ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 3.63 (с, 12H), 3.69 (с, 6H), 3.91 (с, 9H), 5.44 (с, 1H), 5.54 (с, 1H), 6.12 (с, 4H), 7.21 (с, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 56.02, 56.38, 60.76, 60.98, 104.49, 105.21, 125.25, 134.54, 152.59, 153.34, 164.55. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_9$ 569.2495, найдено: 569.2484 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

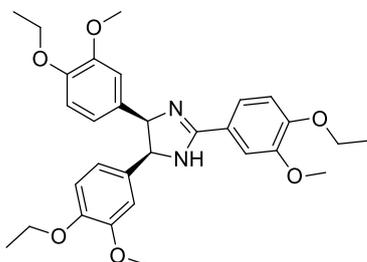
Цис-2,4,5-трис(4-этоксифенил)имидазолин (3j)



Из 2.0 г (13.3 ммоль) 4-этоксифенальдегида получено 0.8 г желтого вязкого масла (38%). ^1H ЯМР (CDCl_3), δ 1.33 (т, $J = 6.9$ Гц, 6H), 1.36 (т, $J = 6.9$ Гц, 3H), 3.88 (кв, $J = 7.0$ Гц, 4H), 4.10 (кв, $J = 6.9$ Гц, 2H), 5.23 (с, 2H), 6.56 (с, $J = 8.7$ Гц, 4H), 6.77 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 6.97 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 8.03 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 14.28, 27.53, 29.89, 35.45, 62.71, 32.82, 65.55, 113.44, 114.50, 115.37, 127.05, 128.04,

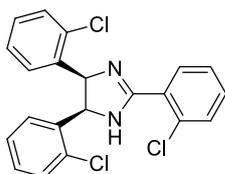
130.87, 157.82, 162.95, 164.26, 179.87. HRMS (ESI): m/z вычислено для $C_{27}H_{31}N_2O_3$ 431.2329, найдено: 431.2320 $[M+H]^+$.

Цис-2,4,5-трис(3-метокси-4-этоксифенил)имидазолин (3k)



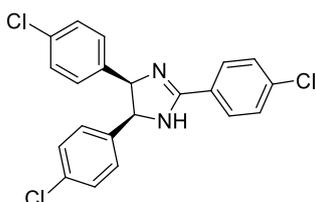
Из 1.0 г (5.6 ммоль) 3-метокси-4-метоксибензальдегида получено 0.7 г желтого вязкого масла (73%). 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 1.28 (т, $J = 6.3$ Гц, 3H), 1.4 (т, $J = 6.2$ Гц, 6H), 3.45 (с, 6H), 3.80 (с, 3H), 3.85 (кв, $J = 13.8$ Гц, 4H), 4.04 (кв, $J = 13.4$ Гц, 2H), 5.12 (с, 2H), 6.22 (с, 2H), 6.47 (дд, $J = 7.7$ Гц, $J = 20.8$ Гц, 4H), 6.76 (д, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.33 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.56 (с, 1H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ 14.65, 30.79, 55.62, 56.01, 64.10, 64.28, 110.55, 111.46, 111.80, 119.68, 120.02, 122, 50, 131.77, 147.05, 148.56, 149.11, 150.70. HRMS (ESI): m/z вычислено для $C_{30}H_{37}N_2O_6$ 521.2646, найдено: 521.2634 $[M+H]^+$.

Цис-2,4,5-трис(2-хлорфенил)имидазолин (3l)



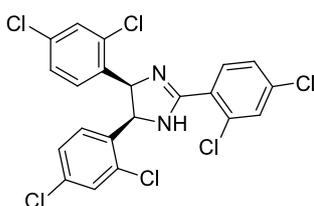
Из 3.0 г (21.3 ммоль) 2-хлорбензальдегида получено 2.7 г белого порошка (93%). Т.пл. 133°C (лит. 132-134°C [212]). 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 6.02 (с, 2H), 6.95-7.01 (м, 4H), 7.08-7.15 (м, 2H), 7.21-7.26 (м, 2H), 7.33-7.53 (м, 3H), 7.96 (дд, $J=7.6$ Гц, $J=1.8$ Гц, 1H).

Цис-2,4,5-трис(4-хлорфенил)имидазолин (3m)



Из 1.0 г (7.1 ммоль) 4-хлорбензальдегида получено 0.7 г белого порошка (72%). Т.пл. 199°C (лит. 199-200°C [213]). 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 5.15 (с, 2H), 6.61 (дд, $J=1.0$ Гц, $J=7.2$ Гц, 4H), 6.73 (дд, $J=1.3$ Гц, $J=8.2$ Гц, 4H), 7.14 (дд, $J=1.4$ Гц, $J=8.3$ Гц, 2H), 7.73 (дд, $J=1.1$ Гц, $J=8.5$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ 127.51, 128.42, 128.77, 129.05, 132.04, 136.88, 137.28, 163.79.

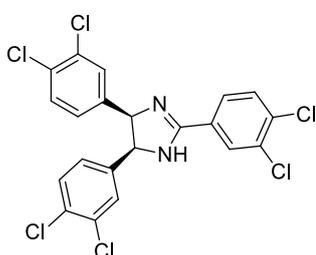
Цис-2,4,5-трис(2,4-дихлорфенил)имидазолин (3n)



Из 1.0 г (5.7 ммоль) 2,4-дихлорбензальдегида получено 0.9 г белого порошка (93%). Т.пл. 130-133°C, 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 5.93 (с, 2H), 6.96-7.30 (м, 2H), 7.11 (д, $J=8.2$ Гц, 2H), 7.17 (с, 2H), 7.34 (д, $J = 8.1$ Гц, 1H), 7.48 (с, 1H), 7.86 (д, $J=8.3$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ 126.13, 127.03, 128.26, 128.53, 129.78, 130.51, 131.63, 132.81, 132.86,

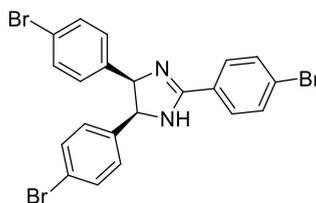
133.45, 134.91, 136.20, 162.91. HRMS (ESI): m/z вычислено для $C_{21}H_{13}N_2Cl_6$ 502.9205, найдено: 502.9190 $[M+H]^+$.

Цис-2,4,5-трис(3,4-дихлорфенил)имидазолин (3o)



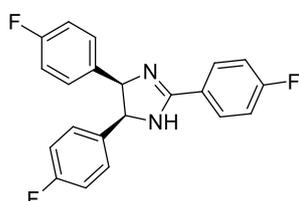
Из 1.0 г (5.7 ммоль) 3,4-дихлорбензальдегида получено 0.8 г белого порошка (87%), т.пл. 170-175, 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 5.40 (с, 2H), 6.78 (дд, $J=1.9$ Гц, $J=8.3$ Гц, 2H), 7.03 (д, $J=1.9$ Гц, 2H), 7.11 (д, $J=8.2$ Гц, 2H), 7.51 (д, $J=8.4$ Гц, 1H), 7.90 (дд, $J=1.9$ Гц, $J=8.4$ Гц, 2H), 8.18 (д, $J=2.1$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$) δ 127.14, 127.34, 129.29, 129.39, 129.76, 129.87, 130.58, 131.74, 132.55, 139.37, 163.22. HRMS (ESI): m/z вычислено для $C_{21}H_{13}N_2Cl_6$ 502.9210, найдено: 502.9190 $[M+H]^+$.

Цис-2,4,5-трис(4-бромфенил)имидазолин (3p)



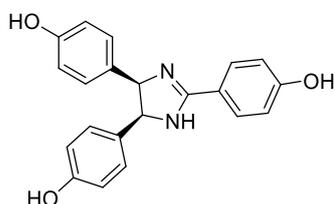
Из 3.0 г (16.2 ммоль) 4-бромбензальдегида получено 1.7 г белого порошка (60%). Т.пл. 120°C (лит. 120-122°C [214]), 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 3.00 (с, 1H), 5.40 (с, 2H), 6.90 (д, $J=11.0$ Гц, 4H), 7.20 (д, $J=8.2$ Гц, 4H), 7.65 (д, $J=8.3$ Гц, 2H), 8.00 (д, $J=8.4$ Гц, 2H).

Цис-2,4,5-трис(4-фторфенил)имидазолин (3q)



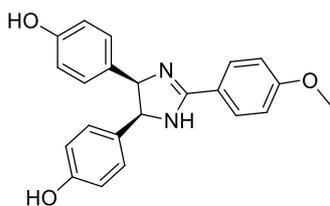
Из 1.0 г (8.1 ммоль) 4-фторбензальдегида получено 0.79 г белого порошка (80%). Т. пл. 102°C (лит. 102-104°C [215]); 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 3.00 (с, 1H), 5.38 (с, 2H), 6.74 (д, $J=3.0$ Гц, 4H), 6.85-6.89 (м, 4H), 7.14 (т, $J=3.0$ Гц, 2H), 7.91-7.96 (м, 2H).

Цис-2,4,5-трис(4-гидроксифенил)имидазолин (3s)



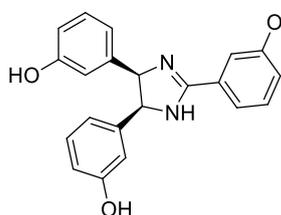
1.0 г (2.6 ммоль) цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)имидазолина (**3c**) растворяли в сухом хлористом метиле (30 мл), смесь охлаждали в ледяной бане и при интенсивном перемешивании медленно добавляли 1.55 мл (16.4 ммоль) $VBBr_3$. Через 24 часа реакцию останавливали добавлением 10 мл $MeOH$ и растворители удаляли в вакууме, получая 0.6 г (1.7 ммоль) твердого вещества розового цвета (65%). т.пл. 216 °C; ЯМР 1H (D_2O) δ 5.71 (с, 2H), 6.54 (д, $J=8.6$ Гц, 4H), 6.82 (д, $J=8.6$ Гц, 4H), 7.05 (д, $J=8.7$ Гц, 2H), 8.04 (д, $J=8.7$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР ($DMCO-d_6$) δ 64.93, 112.08, 114.80, 116.26, 125.32, 128.80, 131.34, 156.87, 163.57, 164.09. HRMS (ESI): m/z вычислено для $C_{21}H_{19}N_2O_3$ 347.1390, найдено 347.1329 $[M+H]^+$.

Цис-2-(4-метоксифенил)-4,5-бис(4-гидроксифенил)имидазолин (3t)



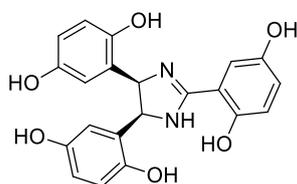
1.0 г (2.6 ммоль) Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)имидазолина (**3c**) растворяли в сухом хлористом метиле (30 мл), смесь охлаждали в ледяной бане и при интенсивном перемешивании медленно добавляли 1.55 (16.4 ммоль) мл VBr_3 . Через 4 часа реакцию останавливали добавлением 10 мл MeOH и фильтровали осадок, получая 0.9 г белого твердого вещества **3t** (95%). Т.пл. 106°C ; ^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ 3.90 (с, 3H), 5.72 (с, 2H), 6.53 (д, $J = 8.1$ Гц, 4H), 6.82 (д, $J = 8.2$ Гц, 4H), 7.27 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 8.13 (д, $J = 8.5$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (DMCO-d_6) δ 56.05, 64.06, 113.76, 114.81, 115.03, 125.25, 128.84, 131.17, 156.92, 163.94, 164.44. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$ 361.1547, найдено: 361.1387 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

*Цис-2,4,5-трис(3-гидроксифенил)имидазолин (**3u**)*



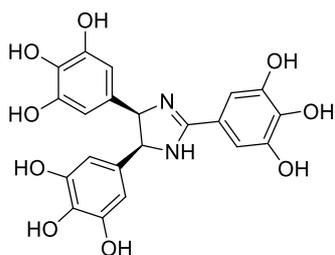
1.0 г (2.6 ммоль) Цис-2,4,5-трис(3-метоксифенил)имидазолина растворяли в сухом хлористом метиле (30 мл), смесь охлаждали в ледяной бане и при интенсивном перемешивании медленно добавляли 1.55 мл (16.4 ммоль) VBr_3 . Через 24 часа реакцию останавливали добавлением 10 мл MeOH и растворители удаляли на вакууме, получая 0.96 г (2.4 ммоль) твердого вещества розового цвета (95%); т.пл. 193°C ; ^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ 5.81 (с, 1H), 6.47 (с, 2H), 6.46-6.52 (м, 4H), 6.94 (т, $J=8.1$ Гц, 2H), 7.26 (д, $J=7.7$ Гц, 1H); 7.51-7.58 (м, 3H), 9.32 (с, 1H), 10.29 (с, 1H), 11.08 (с, 1H). ЯМР ^{13}C (DMCO-d_6) δ 64.80, 67.48, 114.87, 115.41, 115.82, 118.73, 119.83, 122.48, 123.46, 129.37, 131.27, 136.47, 157.38, 158.49, 165.65. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$ 348.1390, найдено 348.1347 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

*Цис-2,4,5-три(2,5-дигидроксифенил)имидазолин (**3v**)*



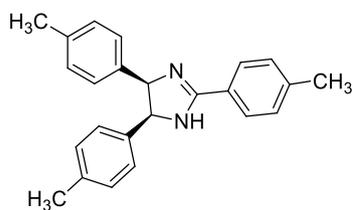
1.0 г (2.1 ммоль) цис-2,4,5-трис(2,5-диметоксифенил)имидазолина растворяли в сухом метиленхлориде (30 мл), смесь охлаждали в ледяной бане и при интенсивном перемешивании медленно добавляли 3.05 мл (33 ммоль) VBr_3 . Через 24 часа реакцию останавливали добавлением 10 мл MeOH и растворители удаляли в вакууме, получая 0.7 г (1.9 ммоль) твердого вещества розового цвета (88%). Т.пл. 143°C ; ^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ 5.74 (с, 2H), 6.38 (м, 4H), 6.46 (с, 2H), 7.02 (м, 2H), 7.25 (с, 1H), 10.12 (с, 6H). ЯМР ^{13}C (DMCO-d_6) δ 59.79, 108.89, 115.34, 115.58, 118.46, 122.66, 147.85, 149.26, 150.29, 151.28, 163.41. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6$ 395.1237, найдено 395.1259 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

*Цис-2,4,5-трис(3,4,5-тригидроксифенил)имидазолин (**3w**)*



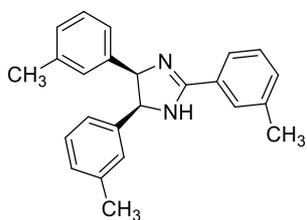
1.00 г (1.7 ммоль) *цис*-2,4,5-трис(3,4,5-тригидроксифенил)имидазолина **3c** растворяли в сухом хлористом метиле (30 мл), смесь охлаждали в ледяной бане и при интенсивном перемешивании медленно добавляли 5.00 мл (53 ммоль) VBr_3 . Через 24 часа реакцию останавливали добавлением 10 мл MeOH и растворители удаляли на вакууме, получая 0.65 г (1.47 ммоль) темно-красного твердого вещества (87%). ^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ 5.41 (с, 2H, C-H, имидазолин), 5.96 (с, 4H, C-H, Ar), 7.08 (с, 2H, C-H, Ar), 7.98 (уш. с, 2H, OH), 8.67 (уш. с, 4H, OH), 9.64 (уш. с, 3H, OH), 10.48 (уш. с, 2H, OH). ^{13}C ЯМР (DMCO-d_6) δ 64.75, 107.04, 108.85, 111.72, 125.61, 132.80, 140.78, 146.07, 146.66, 164.99. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6$ 443.1085, найдено 443.1081 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-трис(4-метилфенил)имидазолин (**3x**)



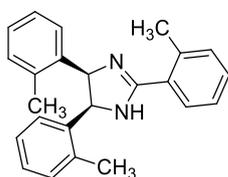
Из 5.0 г 4-метилбензальдегида было получено 3.9 г (78%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.18 (с, 6H), 2.43 (с, 3H), 5.39 (с, 2H), 6.85 (с, 8H), 6.86 (с, 1H), 7.28 (д, 2H, $J = 8.2$ Гц), 7.86 (д, 2H, $J = 8.2$ Гц) [213].

Цис-2,4,5-трис(3-метилфенил)имидазолин (**3y**)



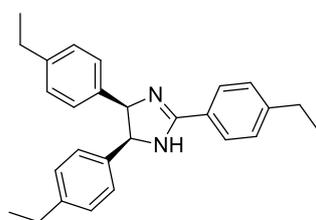
Из 3 г 3-метилбензальдегида было получено 1.8 г (63%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.11 (с, 6H), 2.41 (с, 3H), 5.32 (с, 2H), 6.70 (д, $J = 11.6$ Гц, 4H), 6.81 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 6.91 (т, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.36 (дд, $J = 3.9, 1.7$ Гц, 2H), 7.80 (дт, $J = 3.9, 2.0$ Гц, 1H), 7.91 (с, 1H) [215].

Цис-2,4,5-трис(2-метилфенил)имидазолин (**3z**)



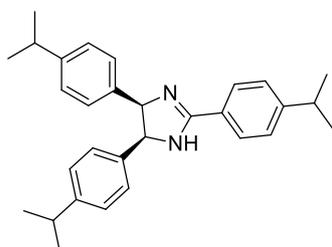
Из 3 г 2-метилбензальдегида было получено 2 г (72%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.23 (с, 6H), 2.71 (с, 3H), 5.71 (с, 2H), 6.95 (м, $J = 6.6, 2.0$ Гц, 4H), 7.11 (дд, $J = 7.4, 1.9$ Гц, 2H), 7.29-7.40 (м, 5H), 7.73 (дд, $J = 7.6, 1.6$ Гц, 1H) [215].

Цис-2,4,5-трис(4-этилфенил)имидазолин (**3aa**)



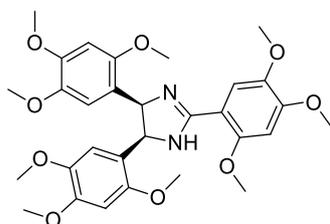
Из 5 г 4-этилбензальдегида было получено 3 г (62%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.07 (т, $J = 7.6$ Гц, 6H), 1.28 (т, $J = 7.6$ Гц, 3H), 2.45 (кв, 4H), 2.72 (кв, $J = 7.6$ Гц, 2H), 6.83 (с, 8H), 5.32 (с, 2H), 7.29 (д, $J = 7.9$ Гц, 2H), 7.87 (д, $J = 7.8$ Гц, 2H).

Цис-2,4,5-трис(4-изопропилфенил)имидазолин (3ab)



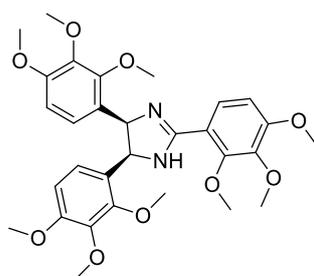
Из 5 г 4-изопропилбензальдегида было получено 3.3 г (67%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.10 (д, $J = 7.0$ Гц, 12H), 1.31 (д, $J = 7.0$ Гц, 6H), 2.72 (п, $J = 6.9$ Гц, 2H), 3.00 (п, $J = 7.0$ Гц, 1H), 6.88-6.79 (м, 8H), 5.40 (с, 2H), 7.35 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H), 7.91 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H).

Цис-2,4,5-трис(2,4,5-триметоксифенил)имидазолин (3ac)



Из 1.0 г (10.2 ммоль) 2,4,5-триметоксибензальдегида получено 0.7 г желтого порошка (74%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.58 (с, 6H); 3.59 (с, 6H); 3.77 (с, 6H); 3.91 (с, 3H); 3.95 (с, 3H); 3.96 (с, 3H); 5.71 (с, 2H); 6.23 (с, 2H); 6.56 (с, 1H); 6.62 (с, 2H); 8.01 (с, 1H); ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.94; 55.98; 56.09; 56.13; 56.15; 56.18; 56.59; 56.63; 56.65; 56.70; 96.63; 96.67; 96.79; 96.83; 113.09; 113.12; 113.81; 142.37; 143.75; 148.66; 151.21; 163.21.

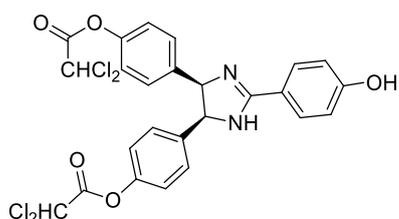
Цис-2,4,5-трис(2,3,4-триметоксифенил)имидазолин (3ad)



Из 1.0 г (10.2 ммоль) 2,3,4-триметоксибензальдегида получено 1.4 г желтого порошка (74%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.54 (с, 6H); 3.62 (с, 6H); 3.70 (с, 6H); 3.79 (с, 3H); 3.81 (с, 3H); 3.89 (с, 3H); 5.55 (с, 2H); 6.29 (д, 2H, $J=9.0$ Гц); 6.60 (д, 2H, $J=8.6$ Гц); 6.70 (д, 1H, $J=9.0$ Гц); 7.94 (д, 1H, $J=8.6$ Гц); ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.79; 55.81; 55.98; 60.31; 60.40; 60.42; 60.77; 61.66; 106.21; 107.39; 107.77; 116.26; 122.95; 124.07; 125.48; 125.72; 141.26; 141.95; 151.31; 152.27; 152.71; 155.71; 162.89.

4.1.2. Синтез дихлорацетил производных 2,4,5-триарилимидазолинов (3s, 3u')

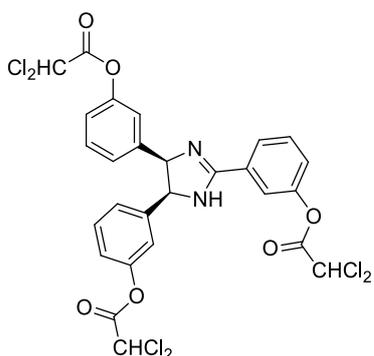
Цис-4,5-бис[4-(дихлорметилкарбонилокси)фенил]-2-(4-гидроксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол (3s')



100 мг (0.289 ммоль) *цис*-2,4,5-трис(4-гидроксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазола (**3s**) растворяли в 2 мл дихлоруксусной кислоты (24.2 ммоль), добавляли 176 мг ДЦК (0.867 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов, после чего выливали в 5% водный раствор

NaHCO₃. Выпавший осадок дициклогексилмочевины (ДЦМ) отфильтровывали. Водный раствор экстрагировали этилацетатом (3 раза по 15 мл), органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, оставляли на несколько часов при температуре 4°C, осадок (Na₂SO₄ и ДЦМ) отфильтровывали. Фильтрат упаривали. Выход 94 мг (0.16 ммоль), 57%, светло-желтое масло. ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ, м.д.: 5.83 уш. с (2H, 2CH), 5.89 с (2H, 2CHCl₂), 6.52 д (4H, J=8.3 Гц, CH_{фенил}), 6.77 д (4H, J=8.3 Гц, CH_{фенил}), 7.03 д (2H, J=8.4 Гц, CH_{фенил}), 8.04 д (2H, J=8.4 Гц, CH_{фенил}), 9.57 уш. с (1H, OH). ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆), δ, м.д.: 60.22, 69.15, 115.24, 116.75, 125.67, 129.17, 131.72, 139.17, 148.10, 157.41, 164.58, 165.86. HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₅H₁₉Cl₄N₂O₅ 568.0013, найдено 568.0021.

Цис-2,4,5-трис[3-(дихлорметилкарбонилокси)фенил]-4,5-дигидро-1H-имидазол (**3u'**)



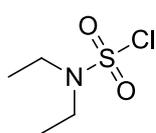
50 мг (0.145 ммоль) *цис*-2,4,5-трис(3-гидроксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазола (**3u**) и 10 мг (0.082 ммоль) 4-диметиламинопиридина растворяли в 7 мл ДМФА. К раствору по каплям прибавляли 0.08 мл (0.85 ммоль) дихлорацетил хлорида. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов, растворитель удаляли в вакууме. К маслообразному остатку приливали 10 мл 5% водного раствора NaHCO₃, экстрагировали

этилацетатом (3 раза по 10 мл). Органическую вытяжку сушили над безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме. Выход 34 мг (0.05 моль), 35%, желтое масло. ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ, м.д.: 5.78 с (2H, 2CH), 6.35 с (3H, 3CHCl₂), 6.48-6.47 м (3H, 3CH_{фенил}), 6.50-6.53 м (3H, 3CH_{фенил}), 6.94 т (2H, J=7.9 Гц, 2CH_{фенил}), 7.25 д (1H, J=7.8 Гц, CH_{фенил}), 7.47-7.57 м (4H, 4CH_{фенил}). HRMS (ESI): m/z вычислено для C₂₇H₁₈Cl₆N₂O₆ 676.9340, найдено 676.9285.

4.1.3. Синтез сульфомоилхлоридов (а-е)

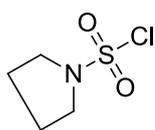
Общая методика: SO₂Cl₂ (0.4 моль) по каплям добавляли к охлажденному до 0°C соответствующему амину (0.27 моль). Смесь осторожно нагревали до 60°C, до прекращения выделения HCl. После 5 ч перемешивания выделение хлористого водорода прекращалось. Реакцию останавливали, добавляя воду со льдом (200 мл), выпавшее масло экстрагировали три раза диэтиловым эфиром по 150 мл., органическую фазу промывали водой, водным 5%

раствором NaHCO₃ и снова водой, а затем сушили над Na₂SO₄. Диэтиловый эфир удаляли на вакууме роторного испарителя и продукт перегоняли при пониженном давлении.



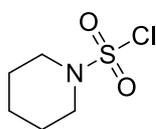
N,N-диэтилсульфамойлхлорид (**a**)

Бесцветная жидкость, выход 50%. Т.кип.70-71° (5 мм. рт. ст.), (лит 70° [216] 5 мм. рт. ст.) ЯМР ¹H (CDCl₃): δ 1.32 (т, J = 7.2, 6H), 3.43 (кв, J = 7.2, 4H).



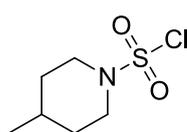
Пирролидин-1-сульфонилхлорид (**b**)

Бесцветная жидкость, выход 20%. ЯМР ¹H (CDCl₃): δ 1.96-2.06 (м, 4H), 3.43-3.52 (м, 4H) [217].



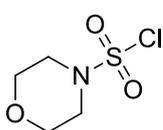
Пиперидин-1-сульфонилхлорид (**c**)

Бесцветная жидкость, выход 85%, Т.кип.75-76° (1 мм. рт. ст.), (лит 71° [218] 1 мм. рт. ст.) ЯМР ¹H (CDCl₃): δ 1.50–1.65 (м, 2H), 1.70–1.85 (м, 4H), 3.20–3.40 (м, 4H).



4-метилпиперидин-1-сульфонилхлорид (**d**)

Бесцветная жидкость, выход 40%. ЯМР ¹H (CDCl₃): δ 1.01 (д, J = 6.4, 3H), 1.36-1.47 (м, 2H), 1.50-1.65 (м, 1H), 1.77-1.87 (м, 2H), 2.75- 2.85 (м, 2H), 3.80-3.90 (м, 2H) [219].



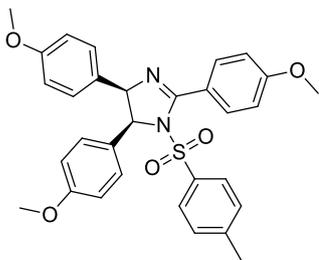
Морфолин-4-сульфонилхлорид (**e**)

Бесцветная жидкость, выход 80%, Т.кип. 66-67° (1 мм. рт. ст.), (лит 65° [218] 1 мм. рт. ст.) ЯМР ¹H (CDCl₃): δ 3.33 (псевдо-т, J = 3.7, 4H), 3.86 (псевдо-т, J = 4.8, 4H).

4.1.4. Синтез сульфонамидных производных 2,4,5-триарилимидазолинов (4a-l)

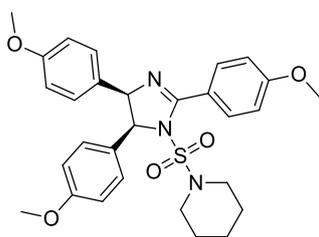
Раствор сульфохлорида (**a-e** или тозилхлорида) (2.4 ммоль) в дихлорметане по каплям добавляли к раствору соответствующего имидазолина (**3**) (1.5 ммоль, масса рассчитывалась индивидуально), ДМАП (0.266 г, 2.2 ммоль) и Et₃N (0.3 мл, 2.2 ммоль) в CH₂Cl₂ при 0°C. Смесь перемешивали 24 часа при комнатной температуре. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме и очищали колоночной хроматографией с использованием EtOAc в качестве элюента (Rf 0.9). Вещества выделены в виде рацемической смеси.

Цис-2,4,5-[трис(4-метоксифенил)]-1-[(4-метилфенил) сульфонил]-4,5-дигидро-1H-имидазол (**4a**)



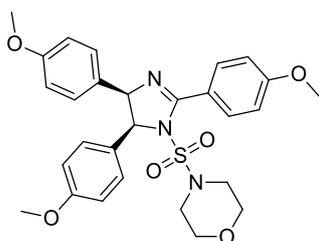
Желтое твердое вещество, 0.814 г (85%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 2.42 (с, 3H), 3.63 (с, 3H), 3.67 (с, 3H), 3.87 (с, 3H), 4.98 (д, $J = 9.0$, 1H), 5.51 (д, $J = 9.0$, 1H), 6.52 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.59 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.75 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.83 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.97 (д, $J = 8.6$, 2H), 7.27 (д, $J = 8.2$, 2H), 7.55 (д, $J = 7.8$, 2H), 7.88 (д, $J = 8.6$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 21.63, 55.06, 55.11, 55.41, 68.95, 73.56, 109.99, 113.06, 113.41, 122.77, 127.26, 128.41, 128.92, 129.16, 129.84, 131.57, 136.25, 144.51, 158.40, 158.74, 159.97, 162.26. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 543.1947, найдено 543.1995 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}пиперидин (4b)



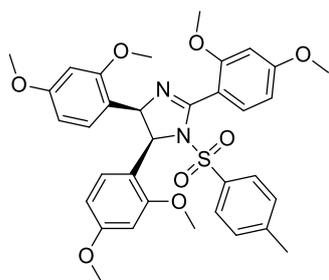
Желтое твердое вещество, 0.626 г (78%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.40 (уш. с, 4H), 1.48-1.64 (м, 2H), 3.02-3.09 (м, 4H), 3.65 (с, 3H), 3.67 (с, 3H), 3.85 (с, 3H), 5.48 (д, $J = 9.0$, 1H), 5.71 (д, $J = 9.0$, 1H), 6.56 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.60 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.83 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.87 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.96 (д, $J = 8.2$, 2H), 7.90 (д, $J = 7.0$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 23.42, 25.16, 25.53, 47.02, 55.10, 55.38, 69.05, 74.05, 113.09, 113.33, 123.22, 128.27, 129.02, 129.31, 129.45, 131.03, 158.69, 160.28, 161.90. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ 536.2214, найдено 536.2211 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}морфолин (4c)



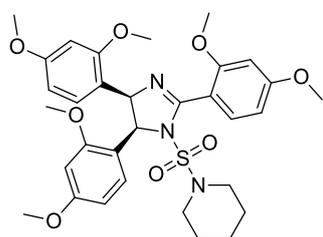
Желтое твердое вещество, 0.610 г (76%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 3.10-3.13 (м, 4H), 3.50-3.53 (м, 4H), 3.69 (с, 3H), 3.71 (с, 3H), 3.89 (с, 3H), 5.51 (д, $J = 8.9$, 1H), 5.74 (д, $J = 8.9$, 1H), 6.60 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.64 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.85 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.90 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.99 (д, $J = 8.8$, 2H), 7.91 (д, $J = 8.8$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 45.74, 54.69, 55.01, 65.60, 68.74, 73.64, 112.74, 113.09, 127.68, 128.59, 130.60, 158.05, 158.46, 159.40, 161.63. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ 538.2007, найдено 538.1997 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-[трис(2,4-диметоксифенил)]-1-[(4-метилфенил)сульфонил]-4,5-дигидро-1H-имидазол (4d)



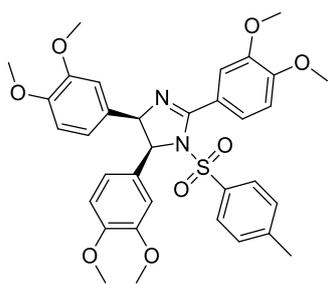
Жёлтое масло, 0.690 г (73%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 2.36 (с, 3H), 3.47 (с, 3H), 3.63 (с, 3H), 3.64 (с, 3H), 3.69 (с, 3H), 3.72 (с, 3H), 3.84 (с, 3H), 5.63 (д, $J = 10.2$, 1H), 5.95-6.15 (м, 4H), 6.25 (дд, $J = 2.3$, $J = 8.6$, 1H), 6.41 (с, 1H), 6.48 (д, $J = 7.8$, 1H), 6.75 (уш. с, 1H), 7.10 (уш. с, 3H), 7.30 (уш. с, 3H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 21.51, 54.91, 55.13, 55.19, 55.29, 55.43, 67.36, 96.79, 97.27, 102.87, 104.08, 127.00, 127.58, 128.94, 130.21, 131.96, 136.81, 143.38, 151.89, 159.46, 159.54., 162.75. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ 633.2265, найдено 633.2266 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}пиперидин (4e)



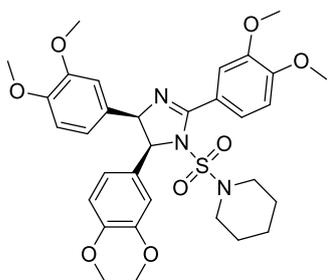
Жёлтое масло, 0.340 г (36%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.20-1.30 (м, 2H), 1.34 (уш. с, 4H), 2.94 (уш. с, 4H), 3.48 (с, 3H), 3.63 (с, 3H), 3.68. (с, 6H), 3.81 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 5.93 (уш. с, 1H), 6.04 (д, $J = 1.9$, 1H), 6.05-6.20 (м, 2H), 6.25 -6.30 (м, 1H), 6.44-6.51 (м, 3H), 6.76 (уш. с, 1H), 7.46 (дд, $J = 0.7$, $J = 8.2$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 23.63, 20.07, 25.19, 46.40, 46.61, 55.14, 55.17, 55.34, 55.36, 55.38, 60.65, 67.76, 96.72, 97.18, 98.23, 98.35, 102.92, 103.72, 104.02, 104.25, 114.22., 119.45, 128.27, 131.76, 131.97, 159.18, 159.43, 160.11. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 626.2531, найдено 626.2526 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-[трис(3,4-диметоксифенил)]-1-[(4-метилфенил)сульфонил]-4,5-дигидро-1H-имидазол (4f)



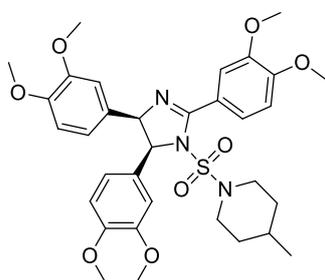
Желтое твердое вещество, 0.340 г (36%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 2.43 (с, 3H), 3.51 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.73 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.89 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 5.04 (д, $J = 8.7$, 1H), 5.58 (д, $J = 8.7$, 1H), 6.21 (д, $J = 1.7$, 1H), 6.32 (с, 1H), 6.51 -6.61 (м, 4H), 6.94 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.26 (д, $J = 1.2$, 1H), 7.28 (с, 1H), 7.39 (д, $J = 1.9$, 1H), 7.54- 7.57 (м, 3H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 21.61, 55.57, 55.63, 55.71, 55.75, 56.00, 56.02, 69.11, 73.97, 110.11, 110.14, 110.46, 110.60, 111.10, 112.41, 119.50, 120.41, 122.67, 123.59, 127.26, 129.20., 129.35, 129.80, 136.36, 144.58, 148.09, 148.34, 148.41, 148.44, 151.92, 160.12. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ 633.2265, найдено 633.2271 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}пиперидин (4g)



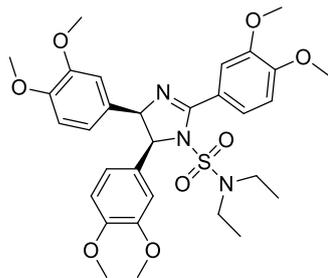
Желтое твердое вещество, 0.290 г (31%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.40-1.50 (м, 4H), 3.05-3.15 (м, 4H), 3.55 (с, 3H), 3.61 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 5.51 (д, $J = 8.8$, 1H), 5.71 (д, $J = 8.8$, 1H), 6.31 (д, $J = 1.8$, 1H), 6.35 (д, $J = 1.8$, 1H), 6.58-6.70 (м, 4H), 6.97 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.56 (д, $J = 1.5$, 1H), 7.64 (дд., $J = 1.9$, $J = 8.3$, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 22.88, 24.77, 46.79, 55.25, 55.30, 55.33, 55.34, 55.66, 55.82, 69.21, 109.79, 110.08, 110.67, 112.14, 118.85, 120.11, 147.79, 147.87, 148.13, 148.25. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 626.2531, найдено 626.2522 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-метил-1-[[Цис-(2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)сульфонил] пиперидин (4h)



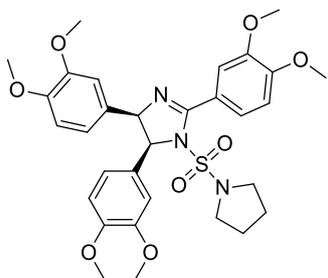
Желтое твердое вещество, 0.335 г (35%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 0.84 (д, $J = 6.5$, 3H), 1.41-1.84 (м, 5H), 2.52-2.80 (м, 4H), 3.55 (с, 3H), 3.61 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 5.50 (д, $J = 8.8$, 1H), 5.71 (д, $J = 8.8$, 1H), 6.31 (д, $J = 1.5$, 1H), 6.36 (д, $J = 1.5$, 1H), 6.58-6.69 (м, 4H), 6.97 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.54 (д, $J = 1.5$, 1H), 7.64 (дд., $J = 1.7$, $J = 8.3$, 1H). HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 640.2687, найдено 640.2681 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N,N-диэтил-Цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-сульфонамид (4i)



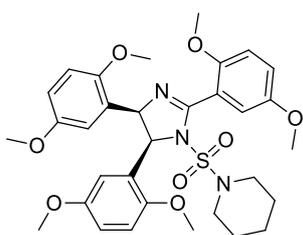
Желтое твердое вещество, 0.340 г (37%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.06 (т, $J = 7.2$, 3H), 3.04-3.19 (м, 4H), 3.55 (с, 3H), 3.61 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.94 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 5.50 (д, $J = 8.9$, 1H), 5.68 (д, $J = 8.9$, 1H), 6.32 (д, $J = 1.8$, 1H), 6.37 (д, $J = 1.7$, 1H), 6.58-6.70 (м, 4H), 6.96 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.51 (д, $J = 1.9$, 1H), 7.61 (дд., $J = 1.9$, $J = 8.4$, 1H). HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 614.2531, найдено 614.2531 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-1-(пирролидин-1-сульфонил)-4,5-дигидро-1H-имидазол (4j)



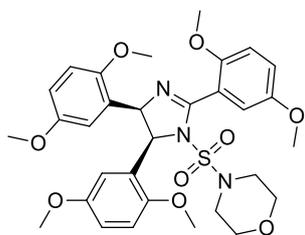
Желтое твердое вещество, 0.250 г (27%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.65-1.78 (м, 4H), 3.14-3.25 (м, 4H), 3.57 (с, 3H), 3.62 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.97 (с, 3H), 3.98 (с, 3H), 5.54 (д, $J = 9.5$, 1H), 5.79 (д, $J = 9.5$, 1H), 6.37 (д, $J = 1.7$, 2H), 6.60-6.71 (м, 4H), 6.98 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.62 (уш. с, 1H), 7.61 (д, $J = 8.8$, 1H). HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 612.2374, найдено 612.2369 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(2,5-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}пиперидин
(4k)



Желтое твердое вещество, 0.760 г (81%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.35 (уш. с, 6H), 2.96 (уш. с, 4H), 3.48 (уш. с, 6H), 3.69 (с, 3H), 3.72 (с, 3H), 3.80 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 6.12 (уш. с, 2H), 6.39 (д, $J = 8.9$, 1H), 6.52 (уш. с, 2H), 6.56 (дд, $J = 3.1$, $J = 8.9$, 2H), 6.91 (д, $J = 9.0$, 1H), 6.97 (дд, $J = 2.9$, $J = 8.9$, 1H), 7.15 (д, $J = 2.9$, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 23.59, 22.15, 46.65, 55.26, 55.66, 55.72, 55.85, 55.87, 61.05, 67.95, 109.84, 110.01, 111.67, 112.44, 113.91, 114.26, 116.07, 116.22, 117.03, 152.07, 152.61., 153.08, 211.98. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ 626.2531, найдено 626.2539 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

{[Цис-2,4,5-трис(2,5-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]сульфонил}морфолин
(4l)



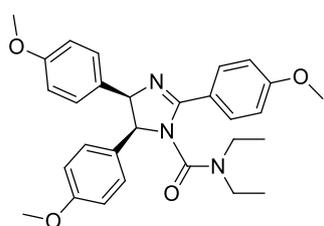
Желтое твердое вещество, 0.716 г (76%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 2.92-3.05 (м, 4H), 3.30-3.45 (м, 4H), 3.51 (с, 6H), 3.69 (с, 3H), 3.72 (с, 3H), 3.80 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 6.14 (уш. с, 2H), 6.42 (д, $J = 8.9$, 1H), 6.53 (уш. с, 3H), 6.58 (дд, $J = 3.1$, $J = 9.0$, 1H), 6.92 (д, $J = 9.0$, 1H), 7.00 (дд, $J = 3.0$, $J = 8.9$, 1H), 7.14 (д, $J = 3.0$, 1H), 7.31 (уш. с, 1H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 45.77, 55.67, 55.84, 60.89, 66.02, 68.17, 109.80, 110.15, 111.74, 111.42, 111.89, 114.28, 116.20, 116.30, 117.11, 151.96, 152.64, 212.03. HRMS (ESI): m/z вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ 628.2324, найдено 628.2313 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.1.5. Синтез производных карбамидов 2,4,5-триарилимидазолинов (серия 5a-aa)

Трифосген в количестве 0.8 г (2.6 ммоль) растворили в CH_2Cl_2 (10 мл) и медленно добавили по каплям к охлажденному до 0 °С раствору производного имидазолина (**3**) (1 ммоль, масса для каждого рассчитывалась индивидуально) и триэтиламина 0.98 мл (7 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Твердый остаток растворили в CH_2Cl_2 (10 мл), добавили по каплям к раствору вторичного амина (19.4 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл) и перемешивали в

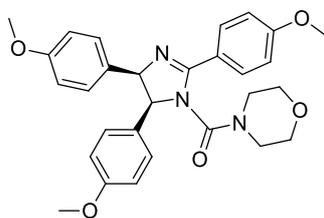
течение 15 мин. Реакционную смесь промывали раствором NaHCO_3 , затем водой и насыщенным раствором хлорида натрия (по 30 мл каждого). Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием EtOAc / петролейный эфир (фракция 50-70) (1:1) (или EtOAc /легкий петролейный эфир (фракция 50-70) (1:2) для 3,5-диметоксипроизводных) в качестве элюента. Вещества выделены в виде рацемической смеси.

Цис-N,N-диэтил-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-карбоксамид (5a)

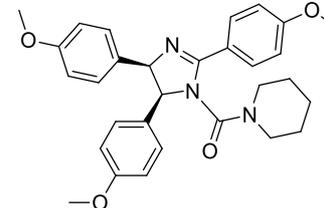


Белое твердое вещество, 0.180 г (37%). Rf $\text{EtOAc}/\text{Et}_3\text{N}$ (99:1) 0.62. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 0.89 (т, $J = 5.9$ Гц, 6H), 3.04–3.13 (м, 2H), 3.22–3.31 (м, 2H), 3.65 (с, 3H), 3.67 (с, 3H), 3.82 (с, 3H), 5.42 (д, $J = 9.2$ Гц, 1H), 5.59 (д, $J = 9.2$ Гц, 1H), 6.57 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.62 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.76 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.85 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 6.96 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.83 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 12.60, 41.10, 55.03, 55.07, 55.35, 70.40, 113.13, 113.89, 128.73, 128.80, 130.07, 158.51, 158.81, 162.11, 162.11, 163.11 ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$ 488.2544, найдено: 488.2545 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-[[Цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1ил]карбонил]морфолин (5b)



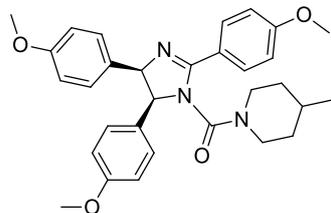
Белое твердое вещество, 0.200 г (40%). Rf $\text{EtOAc}/\text{Et}_3\text{N}$ (99:1) 0.50. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 3.19–3.24 (м, 4H), 3.30–3.38 (м, 4H), 3.68 (с, 3H), 3.69 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 5.48 (д, $J = 9.3$, 1H), 5.52 (д, $J = 9.3$, 1H), 6.58 (д, $J = 8.8$, 2H), 6.62 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.73 (д, $J = 8.7$, 2H), 6.83 (д, $J = 8.8$, 2H), 6.98 (д, $J = 8.8$, 2H), 7.76 (д, $J = 8.8$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 47.08, 54.96, 55.01, 55.32, 65.96, 66.45, 70.31, 113.13, 113.28, 113.92, 127.35, 128.47, 128.66, 129.05, 129.98, 155.40, 158.51, 158.82, 162.16, 162.76. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5$ 502.2337, найдено: 502.2342 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Пиперидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5c)

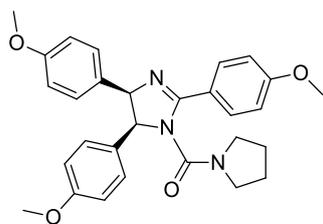
Белое твердое вещество, 0.210 г (42%). Rf $\text{EtOAc}/\text{Et}_3\text{N}$ (99:1) 0.60. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1.22–1.30 (м, 4H), 1.39–1.45 (м, 2H), 3.15–3.17 (м, 4H), 3.68 (с, 3H), 3.69 (с, 3H), 3.85 (с, 3H), 5.47 (д, $J = 9.4$, 1H), 5.52 (д, $J = 9.4$, 1H), 6.57 (д, $J = 8.8$, 2H), 6.62 (д, $J = 8.8$, 2H), 6.74 (д, $J = 8.6$, 2H), 6.84 (д, $J = 8.8$, 2H), 6.97 (д, $J = 9.0$, 2H), 7.79 (д, $J = 8.8$, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3): 23.91, 25.21, 46.09, 55.01, 55.07, 55.37, 70.43, 71.38, 113.15, 113.22, 113.87, 127.70, 128.52, 128.74, 129.35, 130.07, 155.34, 158.51, 158.75, 162.08, 163.03. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$ 500.2544, найдено: 500.2533 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(4-метилпиперидин-1-ил)(цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5d)



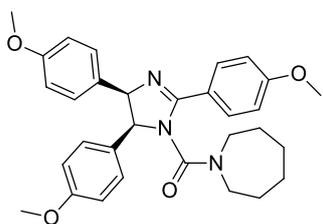
Белое твердое вещество, 0.385 г (75%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.75. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 0.80 (д, J = 6.3, 3H), 1.31-1.39 (м, 1H), 1.39-1.49 (м, 2H), 2.38-2.55 (м, 2H), 3.68 (с, 3H), 3.70 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 3.74-3.94 (м, 4H), 5.49 (д, J = 9.4, 1H), 5.53 (д, J = 9.4, 1H), 6.58 (д, J = 8.7, 2H), 6.63 (д, J = 8.6, 2H), 6.74 (д, J = 8.6, 2H), 6.84 (д, J = 8.6, 2H), 6.97 (д, J = 8.8, 2H), 7.80 (д, J = 8.7, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 21.50, 30.37, 33.19, 33.41, 45.23, 45.68, 55.03, 55.08, 55.40, 70.47, 113.20, 113.24, 113.96, 127.29, 128.63, 128.69, 129.02, 130.25, 154.88, 158.58, 158.84, 162.33, 163.23. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₁H₃₆N₃O₄ 514.2701, найдено: 514.2686 [M+H]⁺.

Пирролидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5e)



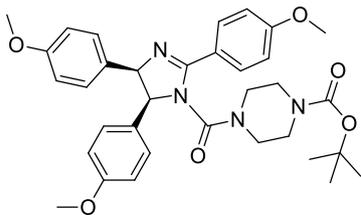
Белое твердое вещество, 0.194 г (40%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.45. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.62-1.70 (м, 4H), 3.09-3.24 (м, 4H), 3.68 (с, 3H), 3.69 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 5.47-5.56 (м, 2H), 6.57 (д, J = 8.8, 2H), 6.62 (д, J = 8.6, 2H), 6.74 (д, J = 8.2, 2H), 6.83 (д, J = 8.0, 2H), 6.97 (д, J = 9.0, 2H), 7.82-7.85 (м, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 25.46, 47.83, 55.02, 55.08, 55.38, 69.73, 71.13, 113.18, 113.22, 113.94, 127.53, 128.44, 128.76, 130.07, 154.17, 158.60, 158.74, 162.35, 163.08. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₂₉H₃₂N₃O₄ 486.2387, найдено: 486.2379 [M+H]⁺.

Азепан-1-ил(цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5f)



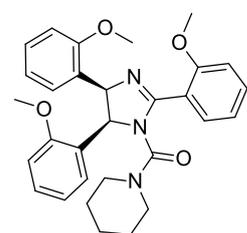
Белое твердое вещество, 0.210 г (41%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.60. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.34-1.58 (м, 8H), 3.00-3.25 (м, 4H), 3.66 (с, 3H), 3.68 (с, 3H), 3.84 (с, 3H), 5.43 (д, J = 9.2, 1H), 5.51 (д, J = 9.2, 1H), 6.56 (д, J = 8.6, 2H), 6.62 (д, J = 8.6, 2H), 6.74 (д, J = 8.6, 2H), 6.83 (д, J = 8.6, 2H), 6.94 (д, J = 8.7, 2H), 7.78 (д, J = 8.7, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 27.34, 27.89, 47.61, 55.01, 55.07, 55.35, 70.25, 71.53, 113.15, 113.20, 113.92, 127.57, 128.76, 128.82, 129.37, 129.95, 158.59, 158.79, 162.16, 163.50. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₁H₃₆N₃O₄ 514.2701, найдено: 514.2689 [M+H]⁺.

Трет-бутил-4-(цис-2,4,5-трис(4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-карбонил)пиперазин-1-карбоксилат (5g)



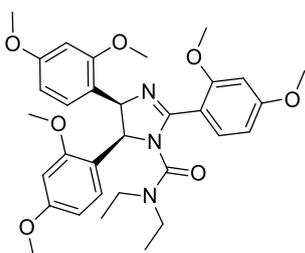
Белое твердое вещество, 0.222 г (37%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.64. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.40 (с, 9H), 3.07-3.15 (м, 4H), 3.17-3.24 (м, 4H), 3.68 (с, 3H), 3.70 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 5.53 (д, J = 9.5, 1H), 5.62 (д, J = 9.3, 1H), 6.57 (д, J = 8.6, 2H), 6.62 (д, J = 8.6, 2H), 6.73 (д, J = 8.4, 2H), 6.82 (д, J = 8.5, 2H), 6.97 (д, J = 8.7, 2H), 7.81 (д, J = 8.6, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 28.23, 43.21, 44.99, 55.02, 55.06, 55.35, 70.41, 72.27, 80.23, 113.14, 113.34, 113.90, 127.83, 128.37, 128.75, 129.39, 129.86, 154.22, 156.04, 158.49, 158.78, 161.95, 162.40. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₄H₄₁N₄O₆ 601.3021, найдено: 601.3014 [M+H]⁺.

Пиперидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(2-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5h)



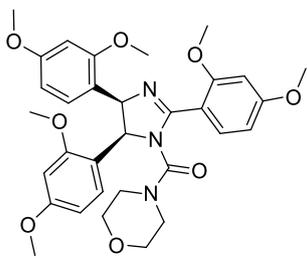
Белое твердое вещество, 0.200 г (40%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.68. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.01-1.16 (м, 4H), 1.29-1.39 (м, 2H), 3.01-3.09 (м, 4H), 3.47 (с, 3H), 3.71 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 5.89 (д, J = 10.6, 1H), 6.22 (ш. с, 1H), 6.44 (д, J = 8.1, 1H), 6.5 (уш. с, 1H), 6.59 (уш. с, 1H), 6.73 (уш. с, 1H), 6.79 (т, J = 7.5, 1H), 6.93-6.98 (м, 2H), 7.01-7.07 (м, 2H), 7.31 (уш. с, 1H), 7.44 (т, J = 8.2, 1H), 7.75 (д, J = 7.3, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 23.95, 25.05, 46.41, 54.48, 55.02, 55.40, 64.89, 108.90, 109.35, 110.64, 119.01, 119.44, 120.53, 127.80, 128.12, 130.71, 158.92, 157.34. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₀H₃₄N₃O₄ 500.2544, найдено: 500.2530 [M+H]⁺.

Цис-N,N-диэтил-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-карбоксамид (5i)



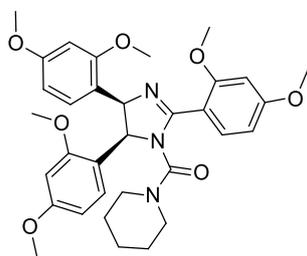
Белое твердое вещество, 0.196 г 34%. Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.50. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 0.75-0.86 (м, 6H), 2.91-3.00 (м, 2H), 3.26-3.35 (м, 4H), 3.54 (с, 3H), 3.59 (с, 3H), 3.65 (с, 3H), 3.69 (с, 3H), 3.81-3.83 (м, 6H), 5.76 (д, J = 10.0, 1H), 5.91 (д, J = 8.9, 1H), 6.08-6.14 (м, 3H), 6.24 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.40-6.44 (м, 2H), 6.53 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.40-6.44 (м, 2H), 6.53 (дд, J = 8.5, J = 2.1, 1H), 6.83 (д, J = 8.7, 1H), 7.09 (уш. с, 1H), 7.70 (д, J = 8.4, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 0.94, 12.40, 40.73, 54.75, 54.91, 55.10, 55.17, 55.41, 55.47, 97.09, 97.20, 98.48, 103.16, 103.18, 104.76, 128.80, 131.95, 158.39, 159.66. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₄₀N₃O₇ 578.2856, найдено: 578.2867 [M+H]⁺.

4-[[Цис-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]карбонил}морфолин (5j)



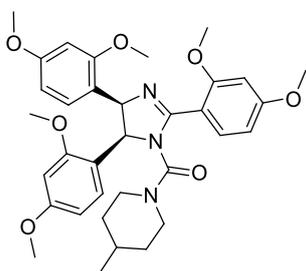
Белое твердое вещество, 0.230 г (39%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.34. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 3.07-3.17 (м, 4H), 3.22-3.29 (м, 4H), 3.48 (с, 3H), 3.64-3.68 (м, 6H), 3.48 (с, 3H), 3.66 (с, 3H), 3.70 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 3.84 (с, 3H), 5.73 (д, J = 10.1, 1H), 6.00 (уш. с, 1H), 6.05-6.13 (м, 2H), 6.17 (уш. с, 1H), 6.29 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.47 (д, J = 2.1, 1H), 6.58 (дд, J = 8.5, J = 2.1, 1H), 6.68 (уш. с, 1H), 7.11 (уш. с, 1H), 7.72 (д, J = 8.4, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 45.75, 54.65, 55.06, 55.15, 55.45, 66.08, 66.14, 97.18, 97.30, 98.40, 103.17, 103.22, 103.98, 104.22, 104.76, 128.47, 131.93, 158.59, 159.70. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₃₈N₃O₈ 592.2654, найдено: 592.2664 [M+H]⁺.

Пиперидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5k)



Белое твердое вещество, 0.390 г (66%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.60. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.08-1.20 (м, 4H), 1.29-1.37 (м, 2H), 2.99-3.08 (м, 4H), 3.46 (с, 3H), 3.64 (с, 6H), 3.68 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.82 (с, 3H), 5.70 (д, J = 10.2, 1H), 5.97 (уш. с, 1H), 6.05 (д, J = 1.8, 1H), 6.14 (уш. с, 1H), 6.27 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.40-6.45 (м, 2H), 6.53 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.67 (уш. с, 1H), 7.10 (уш. с, 1H), 7.67 (д, J = 8.2, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 24.10, 25.21, 46.37, 45.80, 54.65, 55.06, 55.15, 55.33, 55.41, 65.09, 97.11, 97.21, 103.13, 104.49, 118.26, 120.04, 128.66, 131.69, 157.31, 157.75, 158.58, 159.51, 160.53, 162.48. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₃H₄₀N₃O₇ 590.2861, найдено: 590.2875 [M+H]⁺.

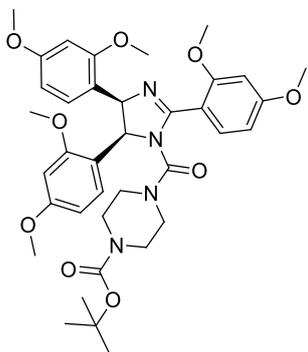
(4-метилпиперидин-1-ил)(цис-2,4,5-трис(2,4-метоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5l)



Белое твердое вещество, 0.330 г (55%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.50. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 0.50-0.66 (м, 2H), 0.75 (д, J = 6.4, 3H), 1.22-1.39 (м, 5H), 2.22-2.44 (м, 2H), 3.47 (с, 3H), 3.66 (с, 6H), 3.70 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 5.71 (д, J = 10.1, 1H), 6.00 (уш. с, 1H), 6.07 (д, J = 2.2, 1H), 6.16 (уш. с, 1H), 6.29 (дд, J = 8.4, J = 2.3, 1H), 6.36-6.46 (м, 3H), 6.55 (дд, J = 8.4, J = 2.3, 1H), 6.68 (уш. с, 1H), 7.11 (уш. с, 1H), 7.67 (д, J = 8.5 Гц, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 21.69, 30.45, 33.10, 33.63, 45.66, 45.80, 54.65, 55.16, 55.24, 55.35, 55.43, 97.15, 97.22, 98.23, 103.15, 103.95, 104.07, 104.61, 128.62, 129.12, 131.78, 131.90, 158.64, 159.58. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₄H₄₂N₃O₇ 604.3017, найдено: 604.3038 [M+H]⁺.

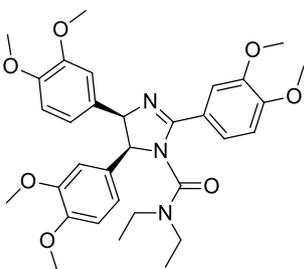
Трет-бутил

4-(*цис*-2,4,5-трис(2,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-карбонил)пиперазин-1-карбоксилат (**5m**)



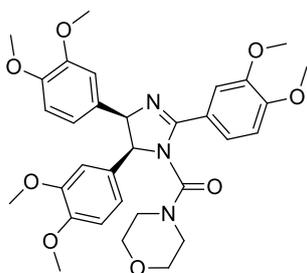
Белое твердое вещество, 0.140 г (20%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.45. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 1.41 (с, 9H), 2.98-3.14 (м, 8H), 3.49 (с, 3H), 3.66 (с, 3H), 3.70 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 3.84 (с, 3H), 5.74 (д, J = 10.1, 1H), 6.08 (д, J = 1.8, 1H), 6.30 (д, J = 7.3, 1H), 6.45 (д, J = 2.1, 1H), 6.58 (д, J = 2.1, J = 8.4, 1H), 7.44-7.48 (м, 2H), 7.57-7.62 (м, 1H), 7.63-7.67 (м, 2H), 7.72-7.77 (м, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 28.24, 42.92, 45.40, 54.67, 55.07, 55.16, 55.45, 80.08, 97.20, 98.39, 103.15, 103.23, 104.79, 112.32, 118.76, 129.03, 132.05, 132.69, 154.26, 158.54, 159.73. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₇H₄₇N₄O₉ 691.3337, найдено: 691.3335 [M+H]⁺.

Цис-*N,N*-диэтил-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-карбоксамид (**5n**)



Белое твердое вещество, 0.087 г (15%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.20. ¹H ЯМР (CDCl₃): 0.92 (т, J = 7.1, 6H), 3.08-3.18 (м, 2H), 3.21-3.31 (м, 2H), 3.50 (с, 3H), 3.55 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.92 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 5.30 (д, J = 9.0, 1H), 5.57 (д, J = 9.1, 1H), 6.22 (д, J = 1.5, 1H), 6.32 (с, 1H), 6.56 (дд, J = 8.3, J = 1.7, 1H), 6.57-6.59 (м, 2H), 6.63-6.64 (м, 1H), 6.791 (д, J = 8.5, 1H), 7.38 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 7.52 (д, J = 1.9, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 12.70, 41.09, 55.47, 55.60, 55.66, 55.84, 55.99, 70.41, 110.12, 110.19, 110.46, 110.75, 111.08, 119.96, 120.02, 121.37, 128.00, 129.82, 148.04, 148.19, 148.31, 148.83, 151.68, 164.05. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₄₀N₃O₇ 578.2861, найдено: 578.2863 [M+H]⁺.

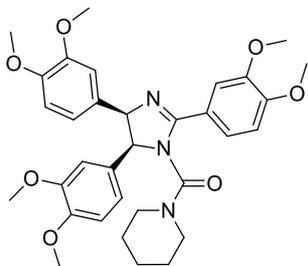
4-[[*Цис*-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил]карбонил]морфолин (**5o**)



Белое твердое вещество, 0.195 г (33%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.15. ¹H ЯМР (CDCl₃): 3.24-3.29 (м, 4H), 3.36-3.41 (м, 4H), 3.51 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.94 (с, 6H), 5.42 (д, J = 9.1, 1H), 5.54 (д, J = 9.1, 1H), 6.20 (д, J = 1.7, 1H), 6.31 (д, J = 1.6, 1H), 6.55 (дд, J = 8.3, J = 1.7, 1H), 6.60-6.67 (м, 3H), 6.93 (д, J = 8.4, 1H), 7.35 (дд, J = 8.4, J = 1.9, 1H), 7.49 (д, J = 1.9, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 45.47, 55.53, 55.65, 55.72, 55.92, 56.08, 66.15, 70.54, 110.30, 110.48, 110.53, 111.04, 111.16, 119.85, 119.91,

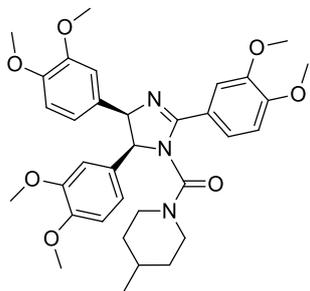
121.33, 127.94, 129.65, 148.16, 148.41, 148.43, 148.48, 148.97, 151.81, 163.19. ESI-HRMS(m/z): вычислено для C₃₂H₃₈N₃O₈ 592.2654, найдено: 592.2657 [M+H]⁺.

Пиперидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5p)



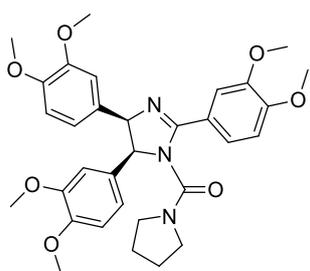
Белое твердое вещество, 0.080 г (14%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.20. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.30 (уш. с, 4H), 1.39-1.48 (м, 2H), 3.20 (ш. с, 4H), 3.51 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.94 (с, 3H), 3.97 (с, 3H), 5.60 (уш. с, 2H), 6.23 (с, 1H), 6.33 (д, J = 1.2, 1H), 6.57-6.61 (м, 2H), 6.64-6.67 (м, 2H), 6.94 (д, J = 8.5, 1H), 7.42 (дд, J = 8.5, J = 1.9, 1H), 7.57 (с, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 23.76, 25.25, 46.01, 55.45, 55.48, 55.58, 55.66, 55.89, 56.09, 70.60, 110.17, 110.31, 110.55, 110.70, 111.05, 111.24, 119.73, 120.23, 121.81, 129.23, 148.13, 148.23, 148.34, 148.42, 148.84, 152.08, 163.78. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₃H₄₀N₃O₇ 590.2861, найдено: 590.2862 [M+H]⁺.

(4-метилпиперидин-1-ил)(цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5q)



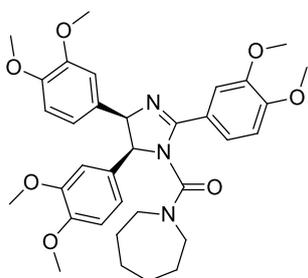
Белое твердое вещество, 0.182 г (30%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.25. ¹H ЯМР (CDCl₃): 0.78 (д, J = 6.4, 3H), 1.31-1.39 (м, 1H), 1.39-1.49 (м, 2H), 2.40-2.54 (м, 2H), 3.49 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.74 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.78-3.90 (м, 4H), 3.91 (с, 6H), 5.38 (д, J = 9.1), 1H), 5.49 (д, J = 9.1, 1H), 6.19 (д, J = 1.5, 1H), 6.33 (д, J = 1.5, 1H), 6.54 (дд, J = 8.3, J = 1.7, 1H), 6.58 (с, 1H), 6.58-6.60 (м, 2H), 6.64 (д, J = 8.3, 1H), 6.91 (д, J = 8.4, 1H), 7.35 (дд, J = 8.3, J = 1.8, 1H), 7.43 (д, J = 1.7, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 21.50, 30.36, 33.36, 33.48, 45.16, 45.57, 55.43, 55.45, 55.58, 55.66, 55.86, 55.97, 70.54, 72.58, 110.21, 110.42, 110.47, 110.93, 111.09, 119.86, 119.95, 121.26, 122.69, 128.26, 129.94, 147.98, 148.24, 148.28, 148.79, 151.47, 155.92, 163.26. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₄H₄₂N₃O₇ 604.3017, найдено: 604.3010 [M+H]⁺.

Пирролидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5r)



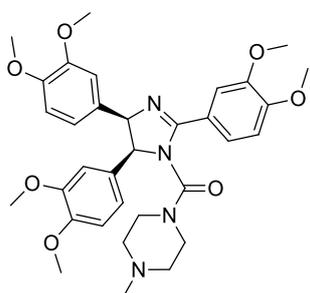
Белое твердое вещество, 0.230 г (40%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.20. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.68 (уш. с, 4H), 3.20 (уш. с, 4H), 3.51 (с, 3H), 3.54 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 5.50 (д, J = 8.8, 1H), 5.57 (д, J = 8.9, 1H), 6.23 (д, J = 1.2, 1H), 6.29 (д, J = 1.1, 1H), 6.55-6.69 (м, 4H), 6.92 (д, J = 8.4, 1H), 6.96 (с, 1H), 7.41 (дд, J = 8.2, 1H), 7.41 (дд, J = 8.3, J = 1.8, 1H), 7.7 (с, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 30.20, 34.10, 47.40, 55.51, 55.64, 55.73, 55.91, 56.13, 56.14, 69.80, 110.30, 110.52, 111.13, 111.21, 119.76, 119.95, 121.41, 125.38, 128.11, 135.66, 148.15, 148.26, 148.28, 148.41, 148.91, 151.38, 163.23. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₃₈N₃O₇ 576.2705, найдено 576.2701 [M+H]⁺.

Азепан-1-ил(цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5s)



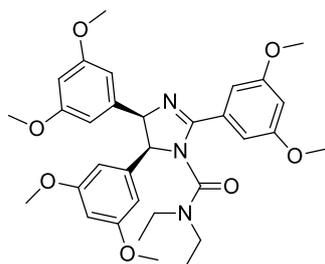
Белое твердое вещество, 0.210 г (35%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.25. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.35-1.62 (м, 8H), 3.07-3.34 (м, 4H), 3.49 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.92 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 5.43 (д, J = 9.1, 1H), 5.55 (д, J = 9.1, 1H), 6.21 (с, 1H), 6.34 (д, J = 1.4, 1H), 6.55-6.67 (м, 4H), 6.90 (д, J = 8.4, 1H), 7.39 (дд, J = 8.3, J = 1.9, 1H), 7.50 (д, J = 1.5, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 27.36, 27.92, 47.64, 55.48, 55.61, 55.70, 55.89, 56.05, 70.32, 110.12, 110.27, 110.48, 110.73, 110.98, 111.09, 120.02, 121.34, 129.86, 148.07, 148.16, 148.26, 148.35, 148.85, 151.71, 163.79. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₄H₄₂N₃O₇ 604.3017, найдено 604.3023 [M+H]⁺.

(4-метилпиперазин-1-ил)(цис-2,4,5-трис(3,4-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)метанон (5t)



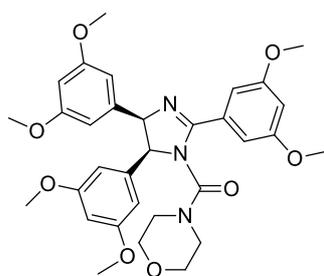
Белое твердое вещество, 0.176 г (29%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.03. ¹H ЯМР (CDCl₃): 2.10-2.16 (ш. с, 3H), 2.52-2.60 (м, 4H), 3.24-3.32 (м, 4H), 3.50 (с, 3H), 3.56 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.76 (с, 3H), 3.91 (с, 3H), 3.92 (с, 3H), 5.30 (д, J = 8.8, 1H), 5.50 (д, J = 8.8, 1H), 6.18 (д, J = 2.0, 1H), 6.34 (д, J = 1.8, 1H), 6.54 (дд, J = 8.4, J = 2.0, 1H), 6.58-6.62 (м, 2H), 6.64 (д, J = 8.2, 1H), 6.91 (д, J = 8.4, 1H), 7.34 (дд, J = 8.2, J = 2.0, 1H), 7.43 (д, J = 2.0, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 44.52, 45.53, 54.10, 55.55, 55.53, 55.64, 55.71, 55.88, 55.99, 70.51, 73.91, 110.27, 110.36, 110.38, 110.52, 110.86, 111.22, 119.60, 120.07, 120.96, 123.36, 128.62, 130.14, 148.02, 148.31, 148.35, 148.40, 148.91, 151.40, 156.70, 162.77. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₃H₄₁N₄O₇ 605.2970, найдено 605.2983 [M+H]⁺.

*Цис-*N,N*-диэтил-2,4,5-трис(3,5-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-карбоксамид (5u)*



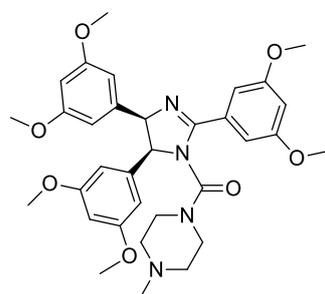
Белое твердое вещество, 0.272 г (47%). R_f EtOAc/Et₃N (99:1) 0.75. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 0.94 (т, J = 7.0, 6H), 3.10-3.20 (м, 2H), 3.26-3.37 (м, 2H), 3.56 (с, 6H), 3.58 (с, 6H), 3.84 (с, 6H), 5.44 (ш. с, 1H), 5.65 (д, J = 8.8, 1H), 6.09 (с, 2H), 6.13-6.15 (м, 2H), 6.17-6.20 (м, 2H), 6.61 (д, J = 2.0, 1H), 7.05 (с, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 12.70, 14.13, 21.00, 41.22, 55.15, 55.57, 60.33, 70.61, 99.81, 100.04, 104.13, 105.58, 105.84, 106.23, 139.21, 155.57, 160.20, 160.21, 160.70, 164.88. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₄₀N₃O₇ 578.2861, найдено 578.2863 [M+H]⁺.

*4-{[Цис-2,4,5-трис(3,5-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил]карбонил}морфолин (5v)*



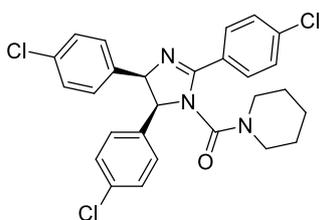
Белое твердое вещество, 0.235 г (40%). R_f EtOAc/Et₃N (99:1) 0.55. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 3.27-3.33 (м, 4H), 3.37-3.44 (м, 4H), 3.56 (с, 6H), 3.59 (с, 6H), 3.83 (с, 6H), 5.42 (д, J = 9.4, 1H), 5.55 (д, J = 9.4, 1H), 6.04 (д, J = 2.2, 2H), 6.12 (д, J = 2.2, 2H), 6.18-6.22 (м, 2H), 6.61-6.63 (м, 1H), 6.97-6.99 (м, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 45.55, 55.10, 55.14, 55.53, 66.11, 70.59, 99.56, 99.86, 103.42, 105.27, 105.89, 106.17, 138.15, 139.39, 156.11, 160.18, 160.36, 160.75, 163.29. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₂H₃₈N₃O₈ 592.2654, найдено 592.2665 [M+H]⁺.

*(4-метилпиперазин-1-ил)(цис-2,4,5-трис(3,5-диметоксифенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)метанон (5w)*



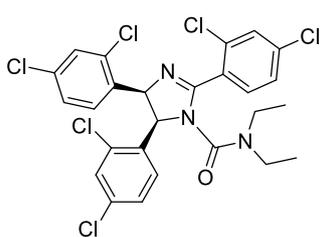
Белое твердое вещество, 0.157 г (26%). R_f EtOAc/Et₃N (99:1) 0.60. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 2.16-2.28 (м, 7H), 3.31-3.42 (м, 4H), 3.56 (с, 6H), 3.58 (с, 6H), 3.82 (с, 6H), 5.33 (д, J = 9.1, 1H), 5.53 (д, J = 9.1, 1H), 6.04 (д, J = 2.3, 2H), 6.12 (д, J = 2.3, 2H), 6.17 (д, J = 2.3, 1H), 6.19 (д, J = 2.3, 1H), 6.59 (т, J = 2.3, 1H), 6.96 (д, J = 2.3, 2H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 44.56, 45.53, 54.02, 55.14, 55.52, 70.58, 74.32, 99.53, 99.74, 103.16, 105.12, 105.91, 106.03, 132.64, 138.60, 139.70, 156.49, 160.15, 160.36, 160.73, 163.09. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₃H₄₁N₄O₇ 605.2970, найдено 605.2982 [M+H]⁺.

*Пиперидин-1-ил(цис-2,4,5-трис(4-хлорфенил)-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)метанон (5x)*



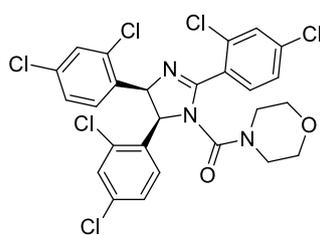
Белое твердое вещество, 0.190 г (37%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.82. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆): δ 1.04-1.33 (м, 4H), 1.35-1.52 (м, 2H), 3.12-3.43 (м, 4H), 6.10 (д, J = 11.4, 1H), 6.31 (д, J = 11.2, 1H), 7.09 (д, J = 7.9, 2H), 7.22 (д, J = 7.8, 2H), 7.24-7.34 (м, 4H), 7.80 (д, J = 7.8, 2H), 7.94 (д, J = 8.0, 2H). ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆): 13.05, 23.14, 24.94, 45.79, 69.29, 68.91, 127.99, 129.15, 129.48, 130.20, 131.12, 130.80, 132.55, 133.15, 133.44, 138.90, 149.74, 165.98. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₂₇H₂₅Cl₃N₃O 512.1058, найдено 512.1043 [M+H]⁺.

Цис-N,N-диэтил-2,4,5-трис(2,4-дихлорфенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-карбоксамид (5y)



Белое твердое вещество, 0.336 г (56%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.90. ¹H ЯМР (CDCl₃): 0.84 (т, J = 7.0, 6H), 2.94-3.07 (м, 2H), 3.37-3.50 (м, 2H), 6.11 (д, J = 10.6, 1H), 6.27 (д, J = 10.6, 1H), 6.99 (дд, J = 8.4, J = 1.9, 1H), 7.06 (д, J = 8.4, 1H), 7.10 (дд, J = 8.4, J = 1.7, 1H), 7.19 (д, J = 1.7, 2H), 7.28-7.35 (м, 2H), 7.48 (д, J = 1.7, 1H), 7.64 (д, J = 8.3, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 12.48, 41.14, 63.98, 69.81, 126.56, 126.66, 127.27, 128.68, 129.19, 129.89, 130.30, 130.71, 131.20, 132.68, 133.97, 134.32, 136.62, 162.01. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₂₆H₂₂Cl₆N₃O 601.9889, найдено 601.9878 [M+H]⁺.

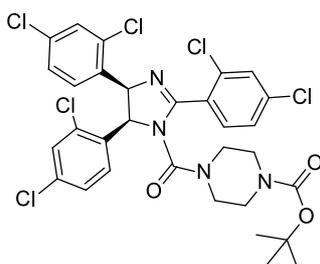
4-{[Цис-2,4,5-трис(2,4-дихлорфенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]карбонил}морфолин (5z)



Белое твердое вещество, 0.246 г (40%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.90. ¹H ЯМР (CDCl₃): 3.13-3.34 (м, 4H), 3.36-3.51 (м, 4H), 6.11 (д, J = 10.6, 1H), 6.31 (д, J = 10.6, 1H), 6.93-6.99 (м, 2H), 7.14 (д, J = 8.0, 1H), 7.19 (д, J = 1.8, 1H), 7.24 (д, J = 1.8, 1H), 7.28-7.39 (м, 2H), 7.51 (д, J = 1.2, 1H), 7.74 (д, J = 8.0, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 45.78, 47.57, 63.85, 66.23, 66.64, 126.70, 127.49, 128.89, 129.46, 130.07, 130.44, 133.89, 134.35. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₂₆H₂₀Cl₆N₃O₂ 615.9681, найдено 615.9669 [M+H]⁺.

Трет-бутил

4-(цис-2,4,5-трис(2,4-дихлорфенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-карбонил)пиперазин-1-карбоксилат (5aa)



Белое твердое вещество, 0,500 г (70%). Rf EtOAc/Et₃N (99:1) 0.90. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.43 (с, 9H), 3.08-3.28 (м, 8H), 6.10 (д, J = 10.6, 1H), 6.26 (д, J = 10.6, 1H), 6.93-6.96 (м, 1H), 7.10 (м, 1H), 7.18 (д, J = 1.8, 1H), 7.21 (д, J = 1.0, 1H), 7.24-7.29 (м, 1H), 7.46-7.50 (м, 2H), 7.58-7.68 (м, 1H), 7.69 (д, J = 8.4, 1H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 30.89, 45.78, 47.57

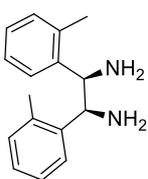
63.85, 66.23, 66.64, 80.06, 126.70, 126.83, 127.49, 128.89, 129.46, 130.07, 130.44, 133.89, 134.35. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₃₁H₂₉Cl₆N₄O₃ 715.0366, найдено 715.0353 [M+H]⁺.

4.1.6. Восстановление 2,4,5-триарилимидазолинов натрием

Метод *a*: 0.5 г (0.9-1.5 ммоль) ,4,5-трис(арил)имидазолина **3** растворяли в 15 мл ТГФ. К полученному раствору добавляли 0.5 г (~ 20 ммоль) натрия, смесь доводили до кипения, одновременно добавляя по 1 мл изопропилового спирта каждые 10 минут в течение часа, а затем по 2 мл каждые 5 минут до полного растворения натрия. Реакционную смесь упаривали. Полученную массу растворяли в 10 мл воды, добавляли соляную кислоту до pH ~ 1. Выпавший осадок (если таковой имелся) отфильтровывали и растворяли в 20 мл концентрированного раствора NH₃. Водный раствор экстрагировали хлористым метиленом три раза по 15 мл, органические фазы объединяли и сушили над CaCl₂, хлористый метилен удаляли при пониженном давлении, выделяя 1,2-диарил-1,2-этилендиамины без дополнительной очистки. В случае отсутствия осадка после подкисления кислый раствор экстрагировали хлористым метиленом два раза по 15 мл (в органическую фазу уходят примеси), водный слой отделяли, добавляли концентрированный водный раствор аммиака до щелочной реакции, затем экстрагировали хлористым метиленом и далее выделение проводили аналогично вышеописанной методике.

Метод *b* отличается от *a* лишь количеством ТГФ, вместо 15 мл. использовали двухкратный объем - 30 мл. По умолчанию выход для эритро-1,2-дифенил-1,2-диаминов указан по методу *b*.

Эритро-1,2-ди(2-метилфенил)-1,2-диаминоэтан (**7a**)



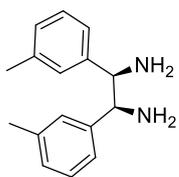
Из 0.50 г (1.5 ммоль) имидазолина **3z** было получено 0.15 г (43%) белого порошка.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2.31 (с, 6H), 4.44 (с, 2H), 7.13 (дд, J = 7.5, 1.8 Гц, 2H), 7.17 (тд, J = 7.3, 1.5 Гц, 2H), 7.22 (тд, J = 7.5, 1.8 Гц, 2H), 7.39 (дд, J = 7.5, 1.3 Гц, 2H).

¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 19.61, 56.95, 126.18, 126.27, 126.98, 130.30, 136.62, 141.19. ESI-

HRMS (m/z): вычислено для C₁₆H₂₁N₂ 241.1699, найдено 241.1700 [M+H]⁺.

Эритро-1,2-ди(3-метилфенил)-1,2-диаминоэтан (**7b**)



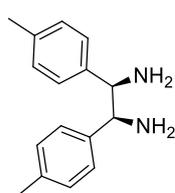
Из 0.50 г (1.5 ммоль) исходного имидазолина **3y** было получено 0.14 г (40%)

белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2.37 (с, 6H), 3.96 (с, 2H), 7.12 (дд, J = 7.0, 0.5 Гц, 4H), 7.21-7.28 (м, 6H). ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 21.41, 62.89,

124.71, 128.35, 138.10, 143.03. ESI-HRMS (m/z): вычислено для C₁₆H₂₁N₂

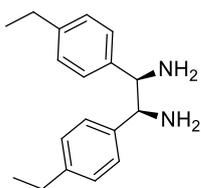
241.1699, найдено 241.1703 [M+H]⁺.

Эритро-1,2-ди(4-метилфенил)-1,2-диаминоэтан (7c)



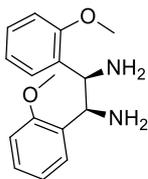
Из 0.50 г (1.5 ммоль) исходного имидазолина **3x** было получено 0.24 г (68%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.36 (с, 6H), 3.96 (с, 2H), 7.17 (д, $J = 7.8$ Гц, 4H), 7.30 (д, $J = 8.1$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 20.72, 62.18, 127.10, 128.76, 136.79, 139.64. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2$ 241.1699, найдено 241.1700 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(4-этилфенил)-1,2-диаминоэтан (7d)



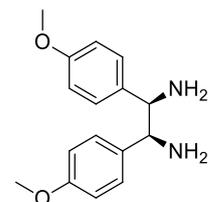
Из 0.50 г (1.3 ммоль) исходного имидазолина **3aa** было получено 0.22 г (62%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.26 (т, $J = 7.6$ Гц, 6H), 2.66 (кв, $J = 7.6$ Гц, 4H), 3.97 (с, 2H), 7.20 (д, $J = 8.0$ Гц, 4H), 7.35 (д, $J = 8.0$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 15.59, 28.53, 62.68, 127.56, 127.96, 140.35, 143.58. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2$ 269.2012, найдено 269.2012 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(2-метоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7e)



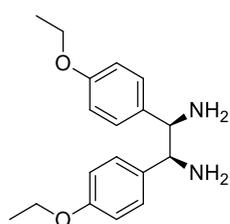
Из 0.50 г (1.3 ммоль) исходного имидазолина **3a** было получено 0.14 г (40%) желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.72 (с, 6H), 4.48 (с, 2H), 6.82 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 6.91 (тд, $J = 7.4, 0.5$ Гц, 2H), 7.19 (тд, $J = 8.1, 1.7$ Гц, 2H), 7.31 (дд, $J = 7.5, 1.8$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 25.28, 55.24, 110.51, 120.54, 127.97, 128.10, 131.40, 157.42. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ 273.1598, найдено 273.1599 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(4-метоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7f)



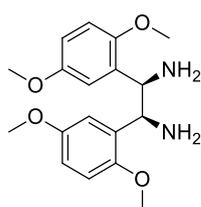
Из 5 г (13 ммоль) исходного имидазолина **3c** было получено 3 г (86%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.81 (с, 6H), 3.93 (с, 2H), 6.89 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 7.31 (д, $J = 8.8$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 54.87, 61.86, 113.40, 128.20, 134.65, 158.60. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ 273.1598, найдено 273.1600 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(4-этоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7g)



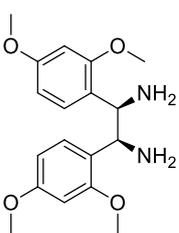
Из 0.50 г (1.2 ммоль) исходного имидазолина **3j** было получено 0.1 г (29%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.33 (т, $J = 7.0$ Гц, 6H), 3.92 (с, 2H), 4.03 (кв, $J = 7.0$ Гц, 4H), 6.88 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 7.39 (д, $J = 8.6$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 14.87, 62.27, 63.41, 114.36, 128.57, 134.91, 158.37. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ 301.1911, найдено 301.1910 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(2,5-диметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7h)



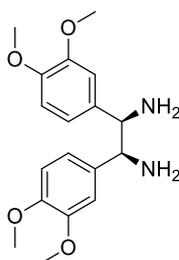
Из 0.50 г (1 ммоль) исходного имидазолина **3h** было получено 0.14 г (40%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.74 (с, 6H), 3.75 (с, 6H), 4.42 (с, 2H), 6.72-6.80 (м, 4H), 6.90 (д, $J = 2.9$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 25.32, 55.29, 55.31, 98.51, 104.11, 123.93, 128.73, 158.45, 159.73. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ 333.1809, найдено 333.1813 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(2,4-диметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7i)



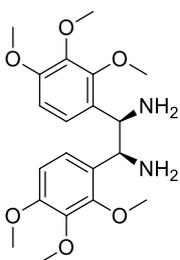
Из 0.50 г (1 ммоль) исходного имидазолина **3f** было получено 0.2 г (58%) желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.74 (с, 6H), 3.78 (с, 6H), 4.36 (с, 2H), 6.42 (д, $J = 2.3$ Гц, 2H), 6.46 (дд, $J = 8.3, 2.4$ Гц, 2H), 7.20 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 25.33, 55.74, 55.94, 111.68, 112.43, 114.34, 132.68, 151.81, 153.71. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ 333.1809, найдено 333.1813 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(3,4-диметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7j)



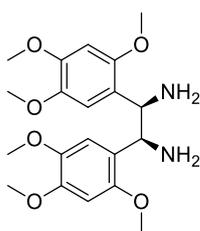
Из 0.50 г (1 ммоль) исходного имидазолина **3g** было получено 0.14 г (40%) белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.88 (с, 6H), 3.88 (с, 6H), 3.92 (с, 2H), 6.83-6.86 (м, 2H), 6.93-6.97 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.89, 55.91, 62.62, 110.16, 110.86, 119.89, 135.47, 148.42, 148.99. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ 333.1809, найдено 333.1813 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(2,3,4-триметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7k)

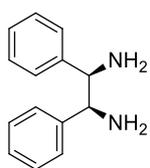


Из 0.50 г (0.9 ммоль) исходного имидазолина **3ad** было получено 0.12 г (35%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.84 (с, 6H), 3.85 (с, 6H), 3.91 (с, 6H), 4.30 (с, 2H), 6.67 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.04 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.32, 55.99, 60.61, 60.98, 107.47, 122.14, 129.18, 142.04, 152.16, 152.76. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$ 393.2020, найдено 393.2024 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Эритро-1,2-ди(2,4,5-триметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7l)

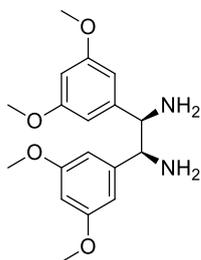


Из 0.50 г (0.9 ммоль) исходного имидазолина **3ac** было получено 0.07 г (20%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.76 (с, 6H), 3.82 (с, 6H), 3.86 (с, 6H), 4.37 (с, 2H), 6.50 (с, 2H), 6.90 (с, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 55.72, 56.20, 56.41, 56.67, 97.79, 112.27, 123.20, 143.19, 148.53, 151.85. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$ 393.2020, найдено 393.2023 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Эритро-1,2-дифенил-1,2-диаминоэтан (7m)

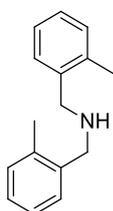
Из 0.50 г (1.3 ммоль) исходного имидазолина **3i** было получено 0.16 г (45%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 4.03 (с, 2H), 7.27-7.40 (м, 10H) [172].



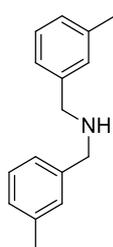
Эритро-1,2-ди(3,5-диметоксифенил)-1,2-диаминоэтан (7n)

Из 0.50 г исходного имидазолина (0.9 ммоль) было получено 0.16 г (35%) желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.79 (с, 12H), 3.92 (с, 2H), 6.40 (т, $J=2.4$, 2H), 6.58 (д, $J=2.1$, 4H). ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ 333.1809, найдено 333.1815 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ди(2-метилбензил)амин (6a)



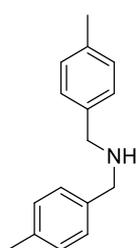
Из 0.50 г (1.5 ммоль) исходного имидазолина **3z** было получено 0.2 г (55%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.35 (с, 6H), 3.86 (с, 4H), 7.17-7.23 (м, 6H), 7.30-7.32 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 18.40; 43.63; 125.78; 126.42; 126.59; 129.87; 135.06; 140.61.



Ди(3-метилбензил)амин (6b)

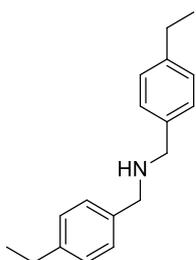
Из 0.50 г (1.5 ммоль) исходного имидазолина **3y** было получено 0.17 г (45%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.38 (с, 6H); 3.81 (с, 4H); 7.09-7.11 (м, 2H), 7.15-7.19 (м, 4H), 7.25 (т, $J=7.5$ Гц, 2H) [220].

Ди(4-метилбензил)амин (6c)



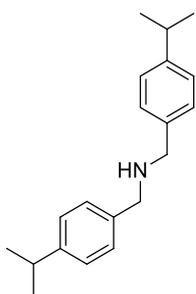
Из 0.50 г (1.5 ммоль) исходного имидазолина **3x** было получено 0.2 г (62%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 2.38 (с, 6H), 3.80 (с, 4H), 7.17 (д, $J = 7.8$ Гц, 4H), 7.26 (д, $J = 8.0$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 24.08, 33.82, 52.98, 126.42, 128.12, 137.80, 147.52. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}$ 226.1590, найдено 226.1590 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ди(4-этилбензил)амин (6d)



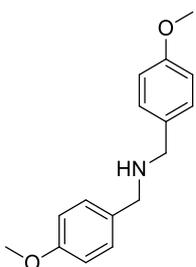
Из 0.50 г (1.3 ммоль) исходного имидазолина **3aa** было получено 4.5 г (68%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.27 (т, $J=7.58$, 6H), 2.67 (кв, $J=7.6$ Гц, 4H), 3.81 (с, 4H) 7.20 (д, $J = 7.9$ Гц, 4H), 7.29 (д, $J = 7.9$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 15.30; 28.16; 52.52; 127.49; 127.77; 137.23; 142.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ди(4-изопропилбензил)амин (6e)



Ди(4-метоксибензил)амин (**6f**)

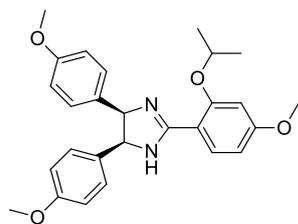
Из 0.5 (1.1 ммоль) г исходного имидазолина **2e** было получено 0.25 г (45%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1.27 (д, $J = 6.3$ Гц, 12H), 2.93 (м, 2H), 3.81 (с, 4H), 7.22 (д, $J = 7.8$ Гц, 4H), 7.30 (д, $J = 7.8$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 21.08, 52.84, 128.11, 129.06, 136.42, 137.36. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}$ 282.2216, найдено 282.2219 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Из 10 г (26 ммоль) исходного имидазолина **3c** было получено 4.5 г (65%) коричневого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 3.74 (с, 4H), 3.81 (с, 6H), 6.88 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 7.27 (д, $J = 8.6$ Гц, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 52.36, 55.29, 113.79, 129.41, 132.25, 158.64. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_2$ 258.1489, найдено 258.1266 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

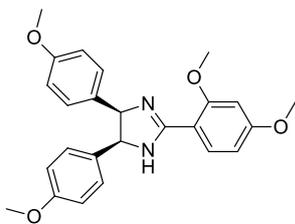
4.1.7. Синтез и модификация несимметричного 2,4,5-триарилимидазолина

Цис-2-(2-изопропокси-4-метоксифенил)-4,5-бис(4-метоксифенил)имидазолин (**8a**)



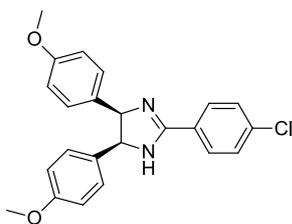
К раствору 0.19 г (1 ммоль) 2-изопропокси-4-метоксибензальдегида в 10 мл трет-бутанола добавляли 0,30 г (1.1 ммоль) **7f**. Полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 30 минут, после чего добавляли 0.42 г (3 ммоль) карбоната калия и 0.32 г (1.25 ммоль) йода. Реакционную смесь перемешивали при 70°C до обесцвечивания раствора. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. По окончании реакции реакционную смесь разбавляли хлороформом (20 мл), промывали насыщенными растворами $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, NaHCO_3 и NaCl и сушили над CaCl_2 . Полученный продукт **8a** очищали методом колоночной хроматографии, аналогично методике получения имидазолинов. Из 0.19 г исходного 2-изопропокси-4-метоксибензальдегида было получено 0.22 г (50%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 8.24 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H), 6.89 (д, $J = 8.8$ Гц, 4H), 6.62-6.57 (м, 5H), 6.54 (д, $J = 2.3$ Гц, 1H), 5.29 (с, 2H), 4.70 (м, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.68 (с, 6H), 1.38 (д, $J = 6.1$ Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 163.35, 162.33, 157.82, 156.84, 132.63, 131.40, 130.50, 128.21, 112.53, 112.13, 104.96, 100.17, 70.81, 55.10, 54.70, 21.75. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4$ 447.2278, найдено 447.2279 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Цис-2-(2,4-диметоксифенил)-4,5-бис(4-метоксифенил)имидазолин (**8b**)



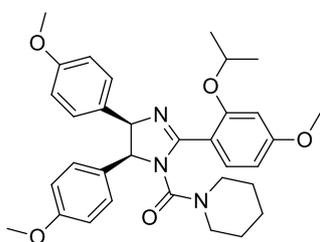
Получен по методике для **8a**, из 0,17 г (1 ммоль) исходного 2,4-диметоксибензальдегида было получено 0,06 г (14%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 8.50 (д, $J = 8.9$ Гц, 1H), 6.69 (д, $J = 8.8$ Гц, 4H), 6.62 (дд, $J = 8.9, 2.3$ Гц, 1H), 6.51 (д, $J = 2.3$ Гц, 1H), 6.47 – 6.42 (м, 4H), 5.32 (с, 2H), 3.79 (с, 3H), 3.62 (с, 3H), 3.55 (с, 6H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 163.52, 163.00, 159.09, 158.11, 133.31, 129.85, 128.53, 128.23, 112.74, 105.36, 98.43, 67.88, 55.51, 55.27, 54.73.

Цис-2-(4-хлорфенил)-4,5-бис(4-метоксифенил)имидазолин (**8c**)



Получен по методике для **8a**, из 0,14 г (1 ммоль) исходного 4-хлорбензальдегида было получено 0,16 г (40%) желтоватого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7.87 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.42 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.84 (д, $J = 8.8$ Гц, 4H), 6.59 (д, $J = 8.9$ Гц, 4H), 5.33 (с, 2H), 3.68 (с, 6H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 163.04, 158.26, 157.98, 136.68, 130.48, 128.80, 128.43, 128.19, 128.12, 112.71, 69.72, 54.69. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}_2$ 393.1364, найдено 393.1366 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пиперидин-1-ил(цис-2-(2-изопропокси-4-метоксифенил)-4,5-бис(4-метоксифенил)имидазолин-1-ил)метанон (**8aa**)



Синтез проведен аналогично общей методике модификации имидазолинов трифосгеном и вторичным амином. Из 0.22 г (0.5 ммоль) исходного имидазолина **8a** было получено 0.12 г (43%) желтого порошка. ^1H ЯМР (CDCl_3) δ 7.50 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H), 6.94 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.81 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.62 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.55 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 6.53-6.46 (м, 2H), 5.58 (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 5.38 (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 4.60 (п, $J = 6.0$ Гц, 1H), 3.81 (с, 3H), 3.68 (с, 3H), 3.66 (с, 3H), 3.13-3.02 (м, 4H), 1.41 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 1.37 (д, $J = 6.0$ Гц, 3H), 1.34 (т, $J = 5.9$ Гц, 2H), 1.20-1.06 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3) δ 162.30, 160.64, 158.39, 158.31, 157.15, 155.47, 131.69, 130.60, 129.21, 129.09, 128.40, 114.56, 113.07, 112.90, 104.11, 100.02, 71.75, 70.58, 69.37, 55.47, 55.12, 55.06, 46.46, 25.29, 24.10, 22.10. ESI-HRMS (m/z): вычислено для $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_5$ 558.2962, найдено 558.2957 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.2. Антиоксидантная активность

4.2.1. Метод хемилюминесценции (модельная система гемоглобин-люминол- H_2O_2).

Общую антиоксидантную активность определяли путем измерения кинетики хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин- H_2O_2 -люминол [221], где люминол

используется в качестве реагента для обнаружения радикалов кислорода. Для калибровки использовали тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-хроман-2-карбоновую кислоту). Инкубационная смесь содержала 10 мкм люминола, 0,5 мм гемоглобина (все реагенты фирмы Sigma-Aldrich) в 0,05 М PBS pH 7.4 и исследуемый образец. Реакцию начинали добавлением H_2O_2 (конечная концентрация 58 мкМ) и регистрировали кинетическую кривую хемилюминесценции с помощью хемилюминометра Lum-1200 (DISoft, Россия). Присутствие антиоксиданта приводит к ингибированию вызванного свободными радикалами окисления люминола. Удаление гидроксильного радикала приводит к появлению задержки между добавлением H_2O_2 и началом излучения люминесценции. Подавление супероксиданион-радикала приводит к снижению максимальной интенсивности люминесценции. Таким образом, антиоксидантный потенциал оценивали с помощью времени задержки и максимальной интенсивности люминесценции при различных концентрациях. Результаты для активности по отношению к гидроксилу были выражены в эквивалентных концентрациях тролокса, рассчитанных на основе стандартной кривой тролокса, а по отношению к супероксид-аниону – в процентах ингибирования окисления свободного люминола.

4.2.2. Спектрофотометрические измерения (тест ДФПГ).

Исследования проводили на планшетном спектрофотометре "Zenyth 200rt" (Австрия). Измерения проводились при 25°C каждые 20 секунд в течение 30 минут при длине волны 517 нм. Начальная концентрация ДФПГ C_0 во всех случаях составляла 100 мкм. Поглощение контрольного раствора (ДФПГ в этаноле) определяли отдельно для каждого вещества. Значения оптической плотности раствора в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера были пересчитаны по концентрации для построения кривых в координатах C (ДФПГ)- t (коэффициент экстинкции $\epsilon_{517} = 1,16 \cdot 10^4$ л/(моль см)). Значения эффективных концентраций определялись методом аппроксимации.

4.2.3. Электрохимические измерения

Электрохимические потенциалы соединений измеряли в трехэлектродной ячейке MICRO-CELL K0264 с использованием цифрового потенциостата-гальваностата IPC Pro%M (Volta, Россия). Рабочий электрод: неподвижный стеклоуглеродный электрод диаметром 2 мм. Кислород удаляли из ячейки путем продувки сухим аргонном. Потенциалы измеряли относительно насыщенного хлорсеребряного электрода. В качестве вспомогательного электрода использовался Pt-электрод. Фоновый электролит 0,5М Bu_4NBF_4 . Концентрация растворов исследуемых соединений в ацетонитриле составляла $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

4.3. Биологические испытания

4.3.1. Определение антипролиферативных свойств (МТТ-тест)

Антипролиферативные свойства заявляемых соединений были определены по МТТ-тесту. Культуры клеток человека А549 (ATCC®CCL-185™) и НСТ116 выращивали в среде DMEM (НЛП ПанЭко), а клеток MCF7 (ATCC® HTB-22™) - в среде EMEM (НЛП ПанЭко). В ростовую среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2 ммоль L-глутамин (НЛП ПанЭко), 1% гентамицина (ОАО Биохимик) в качестве антибиотика и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Клетки сеяли в 96-луночный планшет (CELLTREAT™ в количестве 1×10^4 клеток/200 мкл и культивировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли растворы тестируемых соединений различных концентраций (от 100 до 0,0012 мкмоль/л) и далее клетки культивировали в тех же условиях в течение 72 ч. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторностях. Все соединения растворяли в ДМСО (PANREAC QUIMICA S.L.U). Конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1% и не была токсична для клеток. В контрольные лунки добавляли растворитель в количестве 0,1%. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора 5 мг МТТ [бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия] (SigmaAldrich) в 1 мл ДМСО и дополнительно инкубировали в течение 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм, за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), оценивали на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0. Результаты определения концентраций заявляемых соединений, вызывающих 50%-ное ингибирование роста популяции клеток, приведены в таблице, представленной выше.

4.3.2. Вестерн-блот анализ

В исследовании использовались клеточная линия остеосаркомы SJSA-1, клеточная линия предстательной железы LNCaP, клеточные линии рака толстой кишки RKO и НСТ116, а также клеточные линии нейробластомы SH-SY5Y и SK-N-SH. Клетки выращивали в инкубаторе CO₂ (5% CO₂) при 37 °C в стерильных условиях, в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы или RPMI1640 (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco) и смеси антимикотиков и антибиотиков (Gibco). Клетки взяты для экспериментов в логарифмической

фазе роста. Синтезированные соединения, а также Нутлин-3а (Sigma) и RG7388 (Roche) в выбранных концентрациях добавляли в свежую культуральную среду.

После культивирования клеток в необходимых условиях, указанных в описании эксперимента, клетки отделяли от поверхности чашек Петри с помощью 0,15% раствора трипсина или скребком и переносили в кондиционированную среду. Затем клетки центрифугировали (1000 gcf, 5 мин, +4°C), отделяли надосадочную жидкость и промывали холодным раствором PBS (ПанЭко). Процедуру центрифугирования повторяли и вновь удаляли надосадочную жидкость. Образовавшийся клеточный осадок ресуспендировали в 20-100 µl RIPA-буфера и инкубировали на льду в течение 20 минут. После центрифугирования (13200 gcf, 15 мин, +4°C) часть супернатанта была взята для определения количества белка в лизатах с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Другую часть супернатанта использовали для Вестерн-блот анализа. Объем клеточного лизата с содержанием белка 20-40 мкг смешивали с 4-5 мкл 5X Лэмбли буфера и водой (в количестве, необходимом для получения конечного объема пробы 20-25 мкл). Полученные пробы прогревали при 95°C в течение 5 мин. Затем образцы разделяли в ПААГ геле (4% – концентрирующий, 12% – разделяющий, в качестве буфера для проведения гель-электрофореза использовали 1X электродный буфер) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с помощью приборов Trans-Blot TurboTransfer System (Bio-Rad) или камер для переноса Mini Trans-Blot (Bio-Rad). В качестве буфера для переноса использовали соответствующий 1X буфер. Дальнейшие процедуры выполняли в условиях перемешивания на качающемся шейкере (ELMI S-4). Для определения загрузки геля при помощи реагента Ронсеау S мембраны помещали в соответствующий раствор на 1 минуту, затем дважды отмывали в растворе TBS (по 5 минут). Мембраны блокировали в течение 40 минут в 5% растворе обезжиренного молока, разведенного в TBS. При покраске антителами на фосфорилированные формы белков для блокировки использовали 2,5% раствор BSA (Amresco) в TBS. Далее мембрану четырежды отмывали в растворе TBS и инкубировали с первичными антителами, разведенными в соответствующем буфере, на протяжении 18±6 часов при температуре +4°C. После трех серий промывок в TBST мембрану инкубировали со вторичными антителами, разведенными в 2,5% растворе обезжиренного молока (или 1,25% растворе BSA) на протяжении 1 часа, затем трижды промывали в растворе TBST. Мембраны проявляли с помощью реагентов ECL (Promega) или SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) на приборе Molecular Imager ChemiDoc (Bio-Rad). В случае необходимости покраски другими антителами мембраны инкубировали в Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) в течение 5-15 минут, после чего отмывали трижды

раствором TBS, повторно блокировали мембрану, отмывали ее и заливали первичными антителами. Денситометрический анализ проводили с использованием ChemiDoc MP.

Использовали следующие первичные антитела: анти-GAPDH (#2118), анти-p21 (#2947), анти-Puma (#4976) (все от Cell Signaling Technology), анти-PARP (#137653) (Abcam) и анти-p53 (012M4795) (Sigma) антитела. В качестве вторичных антител использовали HRP-связанные козы антитела против мыши и анти-кролика (#97046 и #97200, соответственно; оба из Abcam).

4.3.3. Анализ сортировки клеток, активируемый флуоресценцией (FACS-анализ)

После инкубации в течение 24 часов со всеми агентами клетки удаляли из чашек для культивирования с использованием 0,05% трипсин-ЭДТА (Gibco) и переносили в кондиционированную среду. Для анализа отбирали в общей сложности 10^5 клеток, центрифугировали (4 мин, $+4^{\circ}\text{C}$), промывали раствором PBS и снова центрифугировали (4 мин, $+4^{\circ}\text{C}$). Клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл аннексин-связывающего буфера (BD Biosciences) и добавляли 2 мкл аннексина V-FITC (Invitrogen). Затем образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Непосредственно перед измерением к каждому образцу добавляли 5 мкл йодида пропидия (50 мкг/мл) (BD Biosciences), и образцы анализировали с помощью анализатора клеток BD FACSCanto II (BD Biosciences). Данные проточной цитометрии обрабатывали с использованием программного обеспечения BD FACSDiva 7.0 (BD Biosciences).

4.3.4. Тест Sub-G1

Клетки собирали, как описано выше, и фиксировали в 70% этаноле в течение 1 ч при -20°C . Затем клетки промывали этанолом и повторно суспендировали в PBS, добавляли 1% РНКазы А и окрашивали 20 мкг/мл йодида пропидия в течение 15 мин при 37°C . После окрашивания клетки исследовали с помощью клеточного анализатора FACSCanto II (BD Biosciences). Данные проточной цитометрии обрабатывали с использованием программного обеспечения BD FACSDiva 7.0 (BD Biosciences).

4.4. Расчетные методы

Модель белка MDM2 (PDB ID: 4HG7) и структуры лигандов подготовлены по стандартной процедуре подготовки с использованием AutoDockTools 1.5.6. Для выполнения всех циклов стыковки использовали AutoDock 4.2. Кубическую сетчатую ячейку (область стыковки), центрированную по лиганду, подгоняли так, чтобы она включала всю область вокруг лиганда и доступный для растворителя вход в сайт связывания.

Расчет проводился с использованием программного комплекса Schrodinger. Представленные результаты были получены с использованием метода расчета «Induced Fit» (модули Glide + PrimeX), который позволяет уточнять конформации, ранее полученные путем скрининга в модуле Glide. Тестирование сольватации/стабильности в молекулярной динамике проводилось с использованием модуля Desmond. Во всех исследованиях *in silico* для стыковки использовалось силовое поле OPLS3e, а при моделировании молекулярной динамикой потенциал TIP4PD использовался для взаимодействия с молекулами воды. Время рассчитываемой траектории при моделировании методом молекулярной динамики составляла 5 нс. Максимальное расстояние, на котором прямое взаимодействие воды и аминокислоты (PrimeX) с лигандом считалось значительным, было установлено равным 10 Å.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия *цис*-2,4,5-трисарилимидазолинов, содержащих алкокси, галоген и гидроксигруппы, изучена антиоксидантная активность и цитотоксичность полученных производных. Анализ соответствия «структура-свойство» показал, что соединения, содержащие гидроксигруппы обладают выраженными антиоксидантными свойствами, но при этом не проявляют цитотоксичности по отношению ко штаммам раковых клеток. Среди алкокси-производных имидазолинов выявлена зависимость повышения уровня p53 от наличия в структуре метокси-группы в арильном заместителе в *пара*-положении к имидазолиновому циклу. Определено соединение, наиболее эффективно повышающее уровень p53 в опухолевых клетках A549 и RKO вплоть до 3,8 раз – *цис*-2,4,5-три(2,4-диметоксифенил)имидазолин. Для всех синтезированных алкокси-производных показан апоптотический характер гибели клеток в присутствии высоких концентраций данного соединения, без индукции некроза. Получена серия *N*-сульфонил- и *N*-карбамоилпроизводных имидазолинов. Показано, что данные соединения обладают значительно более высокой растворимостью в воде, чем известные аналоги нутлина, что позволяет использовать их в дальнейшем дизайне соединений, обладающих биологической активностью. Предложен препаративный метод синтеза вицинальных диаминов по реакции восстановления имидазолинов металлическим натрием. Полученные вицинальные диамины могут быть использованы не только в синтезе новых биологически активных веществ, но и в качестве лигандов в металлокомплексном катализе. Показано, что, в зависимости от условий реакции, в реакции восстановления натрием могут быть также получены дибензиламины с препаративными выходами. Изучена противораковая активность полученных *N*-сульфонил- и *N*-карбамоилпроизводных имидазолинов. Показано, что наиболее перспективной является *N*-карбамоильная модификация. Найдено соединение *цис*-*N*-(4-метилпиперидин-1-илкарбонил)-2,4,5-трис(2,4-метоксифенил)имидазолин **5I**, повышающее уровень p53, а также зависимых от него белков p21 и Рuma в различных штаммах раковых клеток и при этом обладающее значительной растворимостью в воде, что позволяет использовать его в дальнейшем при разработке новых противоопухолевых препаратов.

6. ВЫВОДЫ

1. Разработан метод препаративного синтеза новых производных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов и изучена возможность их дальнейшей модификации. Показано, что алкокси- и гидроксизаместители в арильных кольцах в положениях 2 и 4,5 имидазолинового кольца обладают разной реакционной способностью, что позволяет проводить их селективную модификацию. Влияние имидазолинового кольца на нуклеофильность данных заместителей наиболее сильно проявляется для заместителей, находящихся в *пара*-положении по отношению к имидазолиновому циклу.

2. Изучены антиоксидантные свойства полученной серии гидроксизаместителей и алкоксипроизводных 2,4,5-триарилимидазолинов. Показано, что антиоксидантная активность *цис*-2,4,5-(3,4,5-тригидроксифенил)имидазолина превышает активность тролокса в 3,5 – 3,8 раз (хемилюминесцентный метод и ДФПГ тест, соответственно).

3. Показано, что алкоксипроизводные *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов обладают способностью стабилизировать уровень p53 в некоторых штаммах раковых клеток и проявляют цитотоксичность в микромолярном диапазоне концентраций. Продемонстрирована важность наличия метокси-группы в *пара*-положении арильного кольца по отношению к имидазолиновому циклу для проявления способности влиять на уровень p53 в раковых клетках.

4. Получена серия *N*-сульфонил- и *N*-карбамоилпроизводных имидазолинов. Показано, что данные соединения обладают значительно более высокой растворимостью в воде, чем известные аналоги нутлина, что позволяет использовать их в дальнейшем дизайне соединений, обладающих биологической активностью.

5. Разработан препаративный метод синтеза новых *эритро*-1,2-диарил-1,2-этилендиаминов по реакции имидазолинов с металлическим натрием. Показано, что, в зависимости от условий, в данной реакции могут быть получены как вицинальные диамины, так и производные дибензиламины.

6. Продемонстрирована возможность препаративного синтеза новых производных имидазолинов, содержащих фармакофорные группы в положении 2 имидазолинового цикла, по реакции *эритро*-1,2-ди(алкоксиарил)-1,2-этилендиаминов с альдегидами в присутствии йода в качестве окислителя.

7. Изучена биологическая активность полученных *N*-сульфонил-*цис*-2,4,5-триарилимидазолинов на разных штаммах раковых клеток. Среди серии 3,4-диметоксиарил-*N*-сульфонилпроизводных найдено соединение **4g**, повышающее уровень

белка p21 в 7,1 раз и соединения **4h,i,j**, повышающие уровень p53 в 2,3-3,3 раза в клетках линии RKO.

8. Изучена противораковая активность *N*-карбамоилпроизводных *цис*-2,4,5-триарилимидазолинов на разных штаммах раковых клеток. Показано, что соединения **5l** и **5k** в концентрации 20 мкМ повышало уровень p53 в сравнении с необработанными клетками RKO, в 7.3 и 7.7 раз, также соединение **5l** повышало уровень p53 и p21 в клетках нейробластомы SK-N-SH (в 4,11 и в 5,47 раз, соответственно), SH-SY5Y (в 6,83 и в 11,2 раз, соответственно), в клетках остеосаркомы SJSA-1 и рака предстательной железы LNCaP повышение уровня p53 составило до 3,1, p21 - до 13,7 и Puma - до 4,22 раз). Таким образом, *цис-N*-(4-метилпиперидин-1-илкарбонил)-2,4,5-трис(2,4-метоксифенил)имидазолин **5l** может быть использован для дальнейшей разработки водорастворимых противораковых препаратов на его основе.

7. Список литературы

1. Levine A.J., Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex//Nature Reviews Cancer 2009 9:10, 2009, Vol. 9, No. 10, P. 749-758.
2. Munisamy M., Mukherjee N., Thomas L., Pham A.T., Shakeri A., Zhao Y., Kolesar J., Rao P.P.N., Rangnekar V.M., Rao M. Therapeutic opportunities in cancer therapy: targeting the p53-MDM2/MDMX interactions//American Journal of Cancer Research, 2021, Vol. 11, No. 12, P. 5762.
3. Nag S., Qin J., Srivenugopal K.S., Wang M., Zhang R., Nag S., Qin J., Srivenugopal K.S., Wang M., Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited//The Journal of Biomedical Research, 2013, Vol. 27, Issue 4, Pages: 254-271, 2013, Vol. 27, No. 4, P. 254-271.
4. Vousden K.H., Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53//Cell, 2009, Vol. 137, No. 3, P. 413-431.
5. Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation//Cell, 1992, Vol. 69, No. 7, P. 1237-1245.
6. Menendez D., Inga A., Resnick M.A. The expanding universe of p53 targets//Nature Reviews Cancer 2009 9:10, 2009, Vol. 9, No. 10, P. 724-737.
7. Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas//Nature 1992 358:6381, 1992, Vol. 358, No. 6381, P. 80-83.
8. Schon O., Friedler A., Bycroft M., Freund S.M.V., Fersht A.R. Molecular Mechanism of the Interaction between MDM2 and p53//Journal of Molecular Biology, 2002, Vol. 323, No. 3, P. 491-501.
9. Vlatkovic N., Guerrero S., Li Y., Linn S., Haines D.S., Boyd M.T. MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase ϵ //Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 18, P. 3581-3586.
10. Zhang Z., Wang H., Li M., Agrawal S., Chen X., Zhang R. MDM2 Is a Negative Regulator of p21WAF1/CIP1, Independent of p53 *//Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol. 279, No. 16, P. 16000-16006.
11. Bouska A., Lushnikova T., Plaza S., Eischen C.M. Mdm2 Promotes Genetic Instability and Transformation Independent of p53//Molecular and Cellular Biology, 2008, Vol. 28, No. 15, P. 4862-4874.
12. Gu L., Zhu N., Zhang H., Durden D.L., Feng Y., Zhou M. Regulation of XIAP Translation and Induction by MDM2 following Irradiation//Cancer Cell, 2009, Vol. 15, No. 5, P. 363-375.
13. G. de Oca Luna D.& L. R., Wagner Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53//Nature 1995 378:6553, 1995, Vol. 378, No. 6553, P. 203-206.

14. Zhang R., Wang H. MDM2 Oncogene as a Novel Target for Human Cancer Therapy//Current Pharmaceutical Design, 2005, Vol. 6, No. 4, P. 393-416.
15. Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J. The MDM2 gene amplification database//Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, No. 15, P. 3453-3459.
16. Chi S.W., Lee S.H., Kim D.H., Ahn M.J., Kim J.S., Woo J.Y., Torizawa T., Kainosho M., Han K.H. Structural Details on mdm2-p53 Interaction//Journal of Biological Chemistry, 2005, Vol. 280, No. 46, P. 38795-38802.
17. Poyurovsky M.V., Katz C., Laptenko O., Beckerman R., Lokshin M., Ahn J., Byeon I.J.L., Gabizon R., Mattia M., Zupnick A., Brown L.M., Friedler A., Prives C. The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2//Nature Structural & Molecular Biology 2010 17:8, 2010, Vol. 17, No. 8, P. 982-989.
18. Nakamura S., Roth J.A., Mukhopadhyay T. Multiple Lysine Mutations in the C-Terminal Domain of p53 Interfere with MDM2-Dependent Protein Degradation and Ubiquitination//Molecular and Cellular Biology, 2000, Vol. 20, No. 24, P. 9391-9398.
19. Lai Z., Ferry K.V., Diamond M.A., Wee K.E., Kim Y.B., Ma J., Yang T., Benfield P.A., Copeland R.A., Auger K.R. Human mdm2 Mediates Multiple Mono-ubiquitination of p53 by a Mechanism Requiring Enzyme Isomerization//Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, No. 33, P. 31357-31367.
20. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53//Nature 1997 387:6630, 1997, Vol. 387, No. 6630, P. 296-299.
21. Shangary S., Wang S. Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy//Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2009, Vol. 49, No. 1, P. 223-241.
22. Yang H.-Y., Wen Y.-Y., Chen C.-H., Lozano G., Lee M.-H. 14-3-3 σ Positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth//Molecular and Cellular Biology, 2003, Vol. 23, No. 20, P. 7096-7107.
23. Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M.F., Sherr C.J. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, Vol. 95, No. 14, P. 8292-8297.
24. Lau L.M.S., Nugent J.K., Zhao X., Irwin M.S. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function//Oncogene 2008 27:7, 2007, Vol. 27, No. 7, P. 997-1003.
25. Oliver T.G., Meylan E., Chang G.P., Xue W., Burke J.R., Humpton T.J., Hubbard D., Bhutkar A., Jacks T. Caspase-2-Mediated Cleavage of Mdm2 Creates a p53-Induced Positive Feedback Loop//Molecular Cell, 2011, Vol. 43, No. 1, P. 57-71.
26. Higashitsuji H., Higashitsuji H., Itoh K., Sakurai T., Nagao T., Sumitomo H., Masuda T., Dawson S., Shimada Y., Mayer R.J., Fujita J. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53//Cancer Cell, 2005, Vol. 8, No. 1, P. 75-87.

27. Li M., Brooks C.L., Kon N., Gu W. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway//*Molecular Cell*, 2004, Vol. 13, No. 6, P. 879-886.
28. Puca R., Nardinocchi L., Givol D., D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells//*Oncogene* 2010 29:31, 2010, Vol. 29, No. 31, P. 4378-4387.
29. Xiong L., Kou F., Yang Y., Wu J. A novel role for IGF-1R in p53-mediated apoptosis through translational modulation of the p53-Mdm2 feedback loop//*Journal of Cell Biology*, 2007, Vol. 178, No. 6, P. 995-1007.
30. Coutts A.S., Boulahbel H., Graham A., Thangue N.B.L. Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation//*EMBO reports*, 2007, Vol. 8, No. 1, P. 84-90.
31. Kim H., Kwak N.J., Lee J.Y., Choi B.H., Lim Y., Ko Y.J., Kim Y.H., Huh P.W., Lee K.H., Rha H.K., Wang Y.P. Merlin Neutralizes the Inhibitory Effect of Mdm2 on p53 // *Journal of Biological Chemistry*, 2004, Vol. 279, No. 9, P. 7812-7818.
32. Okamoto K., Taya Y., Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase//*FEBS Letters*, 2009, Vol. 583, No. 17, P. 2710-2714.
33. Yogosawa S., Miyauchi Y., Honda R., Tanaka H., Yasuda H. Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase//*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, Vol. 302, No. 4, P. 869-872.
34. Lo D., Lu H. Nucleostemin//*Cell Cycle*, 2010, Vol. 9, No. 16, P. 3247-3252.
35. Korgaonkar C., Hagen J., Tompkins V., Frazier A.A., Allamargot C., Quelle F.W., Quelle D.E. Nucleophosmin (B23) Targets ARF to Nucleoli and Inhibits Its Function//*Molecular and Cellular Biology*, 2005, Vol. 25, No. 4, P. 1258-1271.
36. Zhang Z., Zhang R. Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation//*The EMBO Journal*, 2008, Vol. 27, No. 6, P. 852-864.
37. Alsheich-Bartok O., Haupt S., Alkalay-Snir I., Saito S., Appella E., Haupt Y. PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage//*Oncogene* 2008 27:26, 2008, Vol. 27, No. 26, P. 3653-3661.
38. Linares L.K., Kiernan R., Triboulet R., Chable-Bessia C., Latreille D., Cuvier O., Lacroix M., Cam L.L., Coux O., Benkirane M. Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2//*Nature Cell Biology* 2007 9:3, 2007, Vol. 9, No. 3, P. 331-338.
39. Uchida C., Miwa S., Kitagawa K., Hattori T., Isobe T., Otani S., Oda T., Sugimura H., Kamijo T., Ookawa K., Yasuda H., Kitagawa M. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation//*The EMBO Journal*, 2005, Vol. 24, No. 1, P. 160-169.
40. Ray R.M., Bhattacharya S., Johnson L.R. Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1//*Apoptosis*, 2011, Vol. 16, No. 1, P. 35-44.

41. Sui G., Affar E.B., Shi Y., Brignone C., Wall N.R., Yin P., Donohoe M., Luke M.P., Calvo D., Grossman S.R., Shi Y. Yin Yang 1 Is a Negative Regulator of p53//*Cell*, 2004, Vol. 117, No. 7, P. 859-872.
42. Wilkening S., Bermejo J.L., Hemminki K. MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis//*Carcinogenesis*, 2007, Vol. 28, No. 11, P. 2262-2267.
43. Watanabe T., Ichikawa A., Saito H., Hotta T. Overexpression of the MDM2 Oncogene in Leukemia and Lymphoma//<https://doi.org/10.3109/10428199609093436>, 2009, Vol. 21, No. 5-6, P. 391-397.
44. Rayburn E., Zhang R., He J., Wang H. MDM2 and Human Malignancies: Expression, Clinical Pathology, Prognostic Markers, and Implications for Chemotherapy//*Current Cancer Drug Targets*, 2005, Vol. 5, No. 1, P. 27-41.
45. Xu G.W., Mawji I.A., Macrae C.J., Koch C.A., Datti A., Wrana J.L., Dennis J.W., Schimmer A.D. A high-content chemical screen identifies ellipticine as a modulator of p53 nuclear localization//*Apoptosis*, 2008, Vol. 13, No. 3, P. 413-422.
46. Fang Y., Liao G., Yu B. Small-molecule MDM2/X inhibitors and PROTAC degraders for cancer therapy: advances and perspectives//*Special column: Research on Emerging COVID-19 (Target, Mechanism, and Therapeutics)*, 2020, Vol. 10, No. 7, P. 1253-1278.
47. Beloglazkina A., Zyk N., Majouga A., Beloglazkina E. Recent Small-Molecule Inhibitors of the p53–MDM2 Protein–Protein Interaction//*Molecules*, 2020, Vol. 25, No. 5.
48. Lyubomir T., Vu B.T., Graves B., Carvajal D., Podlaski F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E.A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2//*Science (New York, N.Y.)*, 2004, Vol. 303, No. 5659, P. 844-848.
49. Ding K., Lu Y., Nikolovska-Coleska Z., Wang G., Qiu S., Shangary S., Gao W., Qin D., Stuckey J., Krajewski K., Roller P.P., Wang S. Structure-Based Design of Spiro-oxindoles as Potent, Specific Small-Molecule Inhibitors of the MDM2–p53 Interaction//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, Vol. 49, No. 12, P. 3432-3435.
50. Grasberger B.L., Lu T., Schubert C., Parks D.J., Carver T.E., Koblish H.K., Cummings M.D., LaFrance L.V., Milkiewicz K.L., Calvo R.R., Maguire D., Lattanze J., Franks C.F., Zhao S., Ramachandren K., Bylebyl G.R., Zhang M., Manthey C.L., Petrella E.C., Pantoliano M.W., Deckman I.C., Spurlino J.C., Maroney A.C., Tomczuk B.E., Molloy C.J., Bone R.F. Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells//*Journal of medicinal chemistry*, 2005, Vol. 48, No. 4, P. 909-912.
51. Sun D., Li Z., Rew Y., Gribble M., Bartberger M.D., Beck H.P., Canon J., Chen A., Chen X., Chow D., Deignan J., Duquette J., Eksterowicz J., Fisher B., Fox B.M., Fu J., Gonzalez A.Z., Turiso F.G.-L.D., Houze J.B., Huang X., Jiang M., Jin L., Kayser F., Liu J., Lo M.C., Long A.M., Lucas B., McGee L.R., McIntosh J., Mihalic J., Oliner J.D., Osgood T., Peterson M.L., Roveto P., Saiki A.Y., Shaffer P., Toteva M., Wang Y., Wang Y.C., Wortman S., Yakowec P., Yan X., Ye Q., Yu D., Yu M., Zhao X., Zhou J., Zhu J., Olson S.H., Medina J.C. Discovery of AMG 232, a potent, selective, and orally bioavailable MDM2-p53 inhibitor in clinical development//*Journal of medicinal chemistry*, 2014, Vol. 57, No. 4, P. 1454-1472.

52. Andreeff M., Kelly K.R., Yee K., Assouline S., Strair R., Popplewell L., Bowen D., Martinelli G., Drummond M.W., Vyas P., Kirschbaum M., Iyer S.P., Ruvolo V., González G.M.N., Huang X., Chen G., Graves B., Blotner S., Bridge P., Jukofsky L., Middleton S., Reckner M., Rueger R., Zhi J., Nichols G., Kojima K. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia//*Clinical Cancer Research*, 2016, Vol. 22, No. 4, P. 868-876.
53. Ding Q., Zhang Z., Liu J.J., Jiang N., Zhang J., Ross T.M., Chu X.J., Bartkovitz D., Podlaski F., Janson C., Tovar C., Filipovic Z.M., Higgins B., Glenn K., Packman K., Vassilev L.T., Graves B. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development//*Journal of medicinal chemistry*, 2013, Vol. 56, No. 14, P. 5979-5983.
54. Yu S., Qin D., Shangary S., Chen J., Wang G., Ding K., McEachern D., Qiu S., Nikolovska-Coleska Z., Miller R., Kang S., Yang D., Wang S. Potent and orally active small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, Vol. 52, No. 24, P. 7970-7973.
55. Bill K.L.J., Garnett J., Meaux I., Ma X.Y., Creighton C.J., Bolshakov S., Barriere C., Debussche L., Lazar A.J., Prudner B.C., Casadei L., Braggio D., Lopez G., Zewdu A., Bid H., Lev D., Pollock R.E. SAR405838: A novel and potent inhibitor of the MDM2:p53 axis for the treatment of dedifferentiated liposarcoma//*Clinical Cancer Research*, 2016, Vol. 22, No. 5, P. 1150-1160.
56. Jung J., Lee J.S., Dickson M.A., Schwartz G.K., Cesne A.L., Varga A., Bahleda R., Wagner A.J., Choy E., Jonge M.J.D., Light M., Rowley S., Macé S., Watters J. TP53 mutations emerge with HDM2 inhibitor SAR405838 treatment in de-differentiated liposarcoma//*Nature Communications*, 2016, Vol. 7.
57. Bernal F., Tyler A.F., Korsmeyer S.J., Walensky L.D., Verdine G.L. Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide//*Journal of the American Chemical Society*, 2007, Vol. 129, No. 9, P. 2456-2457.
58. Brown C.J., Quah S.T., Jong J., Goh A.M., Chiam P.C., Khoo K.H., Choong M.L., Lee M.A., Yurlova L., Zolghadr K., Joseph T.L., Verma C.S., Lane D.P. Stapled peptides with improved potency and specificity that activate p53//*ACS Chemical Biology*, 2013, Vol. 8, No. 3, P. 506-512.
59. Herman A.G., Hayano M., Poyurovsky M.V., Shimada K., Skouta R., Prives C., Stockwell B.R. Discovery of Mdm2-MdmX E3 ligase inhibitors using a cell-based ubiquitination assay//*Cancer Discovery*, 2011, Vol. 1, No. 4, P. 312-325.
60. Kussie P.H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A.J., Pavletich N.P. Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain//*Science*, 1996, Vol. 274, No. 5289, P. 948-953.
61. Anil B., Riedinger C., Endicott J.A., Noble M.E.M. The structure of an MDM2-Nutlin-3a complex solved by the use of a validated MDM2 surface-entropy reduction mutant//*Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2013.
62. Popowicz G.M., Czarna A., Rothweiler U., Szwagierczak A., Krajewski M., Weber L., Holak T.A. Molecular Basis for the Inhibition of p53 by Mdmx//*Cell Cycle*, 2007, Vol. 6, No. 19, P. 2386-2392.

63. Hu C., Li X., Wang W., Zhang L., Tao L., Dong X., Sheng R., Yang B., Hu Y. Design, synthesis, and biological evaluation of imidazoline derivatives as p53–MDM2 binding inhibitors//*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, Vol. 19, No. 18, P. 5454-5461.
64. Holzer P., Masuya K., Furet P., Kallen J., Valat-Stachyra T., Ferretti S., Berghausen J., Bouisset-Leonard M., Buschmann N., Pissot-Soldermann C., Rynn C., Ruetz S., Stutz S., Chène P., Jeay S., Gessier F. Discovery of a Dihydroisoquinolinone Derivative (NVP-CGM097): A Highly Potent and Selective MDM2 Inhibitor Undergoing Phase 1 Clinical Trials in p53wt Tumors//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, Vol. 58, No. 16, P. 6348-6358.
65. Popowicz G.M., Czarna A., Wolf S., Wang K., Wang W., Dömling A., Holak T.A. Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonist drug discovery//*Cell Cycle*, 2010, Vol. 9, No. 6, P. 1104-1111.
66. Vu B., Wovkulich P., Pizzolato G., Lovey A., Ding Q., Jiang N., Liu J.-J., Zhao C., Glenn K., Wen Y., Tovar C., Packman K., Vassilev L., Graves B. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development//*ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, Vol. 4, Discovery of RG7112, No. 5, P. 466-469.
67. Li J., Zhang S., Gao L., Chen Y., Xie X. A Cell-Based High-Throughput Assay for the Screening of Small-Molecule Inhibitors of p53–MDM2 Interaction//*Journal of Biomolecular Screening*, 2011, Vol. 16, No. 4, P. 450-456.
68. He S., Dong G., Wu S., Fang K., Miao Z., Wang W., Sheng C. Small Molecules Simultaneously Inhibiting p53-Murine Double Minute 2 (MDM2) Interaction and Histone Deacetylases (HDACs): Discovery of Novel Multitargeting Antitumor Agents//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, Vol. 61, Small Molecules Simultaneously Inhibiting p53-Murine Double Minute 2 (MDM2) Interaction and Histone Deacetylases (HDACs), No. 16, P. 7245-7260.
69. Mertens V., Abi Saad M.J., Coudeville N., Wälti M.A., Finke A., Marsh M., Orts J. Elucidation of a nutlin-derivative—HDM2 complex structure at the interaction site by NMR molecular replacement: A straightforward derivation//*Journal of Magnetic Resonance Open*, 2022, Vols. 10-11, Elucidation of a nutlin-derivative—HDM2 complex structure at the interaction site by NMR molecular replacement, P. 100032.
70. Fry D.C., Wartchow C., Graves B., Janson C., Lukacs C., Kammlott U., Belunis C., Palme S., Klein C., Vu B. Deconstruction of a Nutlin: Dissecting the Binding Determinants of a Potent Protein–Protein Interaction Inhibitor//*ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, Vol. 4, No. 7, P. 660-665.
71. Estrada-Ortiz N., Neochoritis C.G., Dömling A. How To Design a Successful p53–MDM2/X Interaction Inhibitor: A Thorough Overview Based on Crystal Structures//*ChemMedChem*, 2016, Vol. 11, No. 8, P. 757-772.
72. Crane E.K., Kwan S.Y., Izaguirre D.I., Tsang Y.T.M., Mullany L.K., Zu Z., Richards J.S., Gershenson D.M., Wong K.K. Nutlin-3a: A Potential Therapeutic Opportunity for TP53 Wild-Type Ovarian Carcinomas//*PLOS ONE*, 2015, Vol. 10, No. 8, P. e0135101.

73. Ohnstad H.O., Paulsen E.B., Noordhuis P., Berg M., Lothe R.A., Vassilev L.T., Myklebost O. MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines//*BMC Cancer* 2011 11:1, 2011, Vol. 11, No. 1, P. 1-11.
74. Tovar C., Rosinski J., Filipovic Z., Higgins B., Kolinsky K., Hilton H., Zhao X., Vu B.T., Qing W., Packman K., Myklebost O., Heimbrook D.C., Vassilev L.T. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: Implications for therapy//*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, Vol. 103, No. 6, P. 1888-1893.
75. Voltan R., Secchiero P., Ruozi B., Caruso L., Forni F., Palomba M., Zauli G., Vandelli M.A. Nanoparticles Loaded with Nutlin-3 Display Cytotoxicity Towards p53wildtype JVM-2 But Not Towards p53mutated BJAB Leukemic Cells//*Current Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 20, No. 21, P. 2712-2722.
76. Richmond J., Carol H., Evans K., High L., Mendomo A., Robbins A., Meyer C., Venn N.C., Marschalek R., Henderson M., Sutton R., Kurmasheva R.T., Kees U.R., Houghton P.J., Smith M.A., Lock R.B. Effective Targeting of the P53–MDM2 Axis in Preclinical Models of Infant MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia//*Clinical Cancer Research*, 2015, Vol. 21, No. 6, P. 1395-1405.
77. Tovar C., Graves B., Packman K., Filipovic Z., Xia B.H.M., Tardell C., Garrido R., Lee E., Kolinsky K., To K.H., Linn M., Podlaski F., Wovkulich P., Vu B., Vassilev L.T. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models//*Cancer Research*, 2013, Vol. 73, No. 8, P. 2587-2597.
78. Verreault M., Schmitt C., Goldwirt L., Pelton K., Haidar S., Lévassieur C., Guehenec J., Knoff D., Labussière M., Marie Y., Ligon A.H., Mokhtari K., Hoang-Xuan K., Sanson M., Alexander B.M., Wen P.Y., Delattre J.-Y., Ligon K.L., Idhah A. Preclinical Efficacy of the MDM2 Inhibitor RG7112 in MDM2-Amplified and TP53 Wild-type Glioblastomas//*Clinical Cancer Research*, 2016, Vol. 22, No. 5, P. 1185-1196.
79. Deben C., Wouters A., Beeck K.O. de, Bossche J. van D., Jacobs J., Zwaenepoel K., Peeters M., Meerbeeck J.V., Lardon F., Rolfo C., Deschoolmeester V., Pauwels P., Deben C., Wouters A., Beeck K.O. de, Bossche J. van D., Jacobs J., Zwaenepoel K., Peeters M., Meerbeeck J.V., Lardon F., Rolfo C., Deschoolmeester V., Pauwels P. The MDM2-inhibitor Nutlin-3 synergizes with cisplatin to induce p53 dependent tumor cell apoptosis in non-small cell lung cancer//*Oncotarget*, 2015, Vol. 6, No. 26, P. 22666-22679.
80. Wang S., Sun W., Zhao Y., McEachern D., Meaux I., Barrière C., Stuckey J.A., Meagher J.L., Bai L., Liu L., Hoffman-Luca C.G., Lu J., Shangary S., Yu S., Bernard D., Aguilar A., Dos-Santos O., Besret L., Guerif S., Pannier P., Gorge-Bernat D., Debussche L. SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression//*Cancer research*, 2014, Vol. 74, No. 20, P. 5855-5865.
81. Korotchkina L.G., Demidenko Z.N., Gudkov A.V., Blagosklonny M.V. Cellular quiescence caused by the Mdm2 inhibitor Nutlin-3A//<http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.22.10121>, 2009, Vol. 8, No. 22, P. 3777-3781.

82. Efeyan A., Ortega-Molina A., Velasco-Miguel S., Herranz D., Vassilev L.T., Serrano M. Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin//Cancer Research, 2007, Vol. 67, No. 15, P. 7350-7357.
83. Kranz D., Dobbelstein M. Nongenotoxic p53 Activation Protects Cells against S-Phase-Specific Chemotherapy//Cancer Research, 2006, Vol. 66, No. 21, P. 10274-10280.
84. Tokalov S.V., Abolmaali N.D. Protection of p53 wild type cells from taxol by nutlin-3 in the combined lung cancer treatment//BMC Cancer 2010 10:1, 2010, Vol. 10, No. 1, P. 1-7.
85. Tweddle D.A., Pearson A.D.J., Haber M., Norris M.D., Xue C., Flemming C., Lunec J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma//Cancer Letters, 2003, Vol. 197, No. 1-2, P. 93-98.
86. Becker K., Marchenko N.D., Maurice M., Moll U.M. Hyperubiquitylation of wild-type p53 contributes to cytoplasmic sequestration in neuroblastoma//Cell Death & Differentiation 2007 14:7, 2007, Vol. 14, No. 7, P. 1350-1360.
87. Muth D., Ghazaryan S., Eckerle I., Beckett E., Pöhler C., Batzler J., Beisel C., Gogolin S., Fischer M., Henrich K.O., Ehemann V., Gillespie P., Schwab M., Westermann F. Transcriptional repression of SKP2 is impaired in MYCN-amplified neuroblastoma//Cancer Research, 2010, Vol. 70, No. 9, P. 3791-3802.
88. Peirce S.K., Findley H.W. High level MycN expression in non-MYCN amplified neuroblastoma is induced by the combination treatment nutlin-3 and doxorubicin and enhances chemosensitivity//Oncology Reports, 2009, Vol. 22, No. 6, P. 1443-1449.
89. Elison J.R., Cobrinik D., Claros N., Abramson D.H., Lee T.C. Small Molecule Inhibition of HDM2 Leads to p53-Mediated Cell Death in Retinoblastoma Cells//Archives of Ophthalmology, 2006, Vol. 124, No. 9, P. 1269-1275.
90. Zhang F., Tagen M., Throm S., Mallari J., Miller L., Guy R.K., Dyer M.A., Williams R.T., Roussel M.F., Nemeth K., Zhu F., Zhang J., Lu M., Panetta J.C., Boulos N., Stewart C.F. Whole-Body Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Nutlin-3a in Mice after Intravenous and Oral Administration//Drug Metabolism and Disposition, 2011, Vol. 39, No. 1, P. 15-21.
91. Gu L., Zhu N., Findley H.W., Zhou M. MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2//Leukemia 2008 22:4, 2008, Vol. 22, No. 4, P. 730-739.
92. Laurie N.A., Donovan S.L., Shih C.S., Zhang J., Mills N., Fuller C., Teunisse A., Lam S., Ramos Y., Mohan A., Johnson D., Wilson M., Rodriguez-Galindo C., Quarto M., Francoz S., Mendrysa S.M., Guy R.K., Marine J.C., Jochemsen A.G., Dyer M.A. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma//Nature 2006 444:7115, 2006, Vol. 444, No. 7115, P. 61-66.
93. Mitani N., Niwa Y., Okamoto Y. SurveyorTM nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy//Annals of Clinical Biochemistry, 2007, Vol. 44, No. 6, P. 557-559.
94. Carter B.Z., Mak D.H., Schober W.D., Koller E., Pinilla C., Vassilev L.T., Reed J.C., Andreeff M. Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML//Blood, 2010, Vol. 115, No. 2, P. 306-314.

95. Kojima K., Konopleva M., Samudio I.J., Shikami M., Cabreira-Hansen M., McQueen T., Ruvolo V., Tsao T., Zeng Z., Vassilev L.T., Andreeff M. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy//*Blood*, 2005, Vol. 106, No. 9, P. 3150-3159.
96. Abdul-Nabi A.M., Yassin E.R., Varghese N., Deshmukh H., Yaseen N.R. In Vitro Transformation of Primary Human CD34+ Cells by AML Fusion Oncogenes: Early Gene Expression Profiling Reveals Possible Drug Target in AML//*PLOS ONE*, 2010, Vol. 5, No. 8, P. e12464.
97. Long J., Parkin B., Ouillet P., Bixby D., Shedden K., Erba H., Wang S., Malek S.N. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia//*Blood*, 2010, Vol. 116, No. 1, P. 71-80.
98. Kaindl U., Morak M., Portsmouth C., Mecklenbräuker A., Kauer M., Zeginigg M., Attarbaschi A., Haas O.A., Panzer-Grümayer R. Blocking ETV6/RUNX1-induced MDM2 overexpression by Nutlin-3 reactivates p53 signaling in childhood leukemia//*Leukemia* 2014 28:3, 2013, Vol. 28, No. 3, P. 600-608.
99. Borthakur G., Duvvuri S., Ruvolo V., Tripathi D.N., Piya S., Burks J., Jacamo R., Kojima K., Ruvolo P., Fueyo-Margareto J., Konopleva M., Andreeff M. MDM2 Inhibitor, Nutlin 3a, Induces p53 Dependent Autophagy in Acute Leukemia by AMP Kinase Activation//*PLOS ONE*, 2015, Vol. 10, No. 10, P. e0139254.
100. Zauli G., Celeghini C., Melloni E., Voltan R., Ongari M., Tiribelli M., Iasio M.G. di, Lanza F., Secchiero P. The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status//*Haematologica*, 2012, Vol. 97, No. 11, P. 1722-1730.
101. Zauli G., Voltan R., Bosco R., Melloni E., Marmioli S., Rigolin G.M., Cuneo A., Secchiero P. Dasatinib Plus Nutlin-3 Shows Synergistic Antileukemic Activity in Both p53wild-type and p53mutated B Chronic Lymphocytic Leukemias by Inhibiting the Akt Pathway//*Clinical Cancer Research*, 2011, Vol. 17, No. 4, P. 762-770.
102. Voltan R., Secchiero P., Ruozi B., Forni F., Agostinis C., Caruso L., Vandelli M.A., Zauli G. Nanoparticles Engineered with Rituximab and Loaded with Nutlin-3 Show Promising Therapeutic Activity in B-Leukemic Xenografts//*Clinical Cancer Research*, 2013, Vol. 19, No. 14, P. 3871-3880.
103. Agnoletto C., Melloni E., Casciano F., Rigolin G.M., Rimondi E., Celeghini C., Brunelli L., Cuneo A., Secchiero P., Zauli G., Agnoletto C., Melloni E., Casciano F., Rigolin G.M., Rimondi E., Celeghini C., Brunelli L., Cuneo A., Secchiero P., Zauli G. Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3//*Oncotarget*, 2014, Vol. 5, No. 12, P. 4347-4360.
104. Voltan R., Rimondi E., Melloni E., Rigolin G.M., Casciano F., Arcidiacono M.V., Celeghini C., Cuneo A., Zauli G., Secchiero P., Voltan R., Rimondi E., Melloni E., Rigolin G.M., Casciano F., Arcidiacono M.V., Celeghini C., Cuneo A., Zauli G., Secchiero P. Ibrutinib synergizes with MDM-2 inhibitors in promoting cytotoxicity in B chronic lymphocytic leukemia//*Oncotarget*, 2016, Vol. 7, No. 43, P. 70623-70638.

105. Coll-Mulet L., Iglesias-Serret D., Santidrián A.F., Cosialls A.M., Frias M. de, Castaño E., Campàs C., Barragán M., Sevilla A.F. de, Domingo A., Vassilev L.T., Pons G., Gil J. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells//*Blood*, 2006, Vol. 107, No. 10, P. 4109-4114.
106. Secchiero P., Zauli G. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the regulation of hematopoiesis//*Current Opinion in Hematology*, 2008, Vol. 15, No. 1, P. 42-48.
107. Secchiero P., Zerbinati C., Iasio M.G. di, Melloni E., Tiribelli M., Grill V., Zauli G. Synergistic Cytotoxic Activity of Recombinant TRAIL Plus the Non-Genotoxic Activator of the p53 Pathway Nutlin-3 in Acute Myeloid Leukemia Cells//*Current Drug Metabolism*, 2007, Vol. 8, No. 4, P. 395-403.
108. Hori T., Kondo T., Kanamori M., Tabuchi Y., Ogawa R., Zhao Q.L., Ahmed K., Yasuda T., Seki S., Suzuki K., Kimura T. Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells//*Cancer Letters*, 2010, Vol. 287, No. 1, P. 98-108.
109. Herbst R.S., Eckhardt S.G., Kurzrock R., Ebbinghaus S., O'Dwyer P.J., Gordon M.S., Novotny W., Goldwasser M.A., Tohnya T.M., Lum B.L., Ashkenazi A., Jubb A.M., Mendelson D.S. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer//*Journal of Clinical Oncology*, 2010, Vol. 28, No. 17, P. 2839-2846.
110. Secchiero P., Corallini F., Rimondi E., Chiaruttini C., Iasio M.G.D., Rustighi A., Sal G.D., Zauli G. Activation of the p53 pathway down-regulates the osteoprotegerin expression and release by vascular endothelial cells//*Blood*, 2008, Vol. 111, No. 3, P. 1287-1294.
111. Jin L., Tabe Y., Kojima K., Zhou Y., Pittaluga S., Konopleva M., Miida T., Raffeld M. MDM2 antagonist Nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma//*Cancer Letters*, 2010, Vol. 299, No. 2, P. 161-170.
112. Ooi M.G., Hayden P.J., Kotoula V., McMillin D.W., Charalambous E., Daskalaki E., Raje N.S., Munshi N.C., Chauhan D., Hideshima T., Buon L., Clynes M., O'Gorman P., Richardson P.G., Mitsiades C.S., Anderson K.C., Mitsiades N. Interactions of the Hdm2/p53 and proteasome pathways may enhance the antitumor activity of bortezomib//*Clinical Cancer Research*, 2009, Vol. 15, No. 23, P. 7153-7160.
113. Thompson T., Andreeff M., Studzinski G.P., Vassilev L.T. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the apoptotic activity of MDM2 antagonist nutlin-3a in acute myeloid leukemia cells expressing wild-type p53//*Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, Vol. 9, No. 5, P. 1158-1168.
114. Zhang L., Yan Y., Zhu D., Yang W., Wang W., Hu Y., Yang B., He Q. Nutlin-1 strengthened anti-proliferation and differentiation-inducing activity of ATRA in ATRA-treated p-glycoprotein deregulated human myelocytic leukemia cells//*Investigational New Drugs*, 2012, Vol. 30, No. 1, P. 37-47.
115. Michaelis M., Rothweiler F., Klassert D., Deimling A.V., Weber K., Fehse B., Kammerer B., Doerr H.W., Cinatl J. Reversal of P-glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by the Murine Double Minute 2 Antagonist Nutlin-3//*Cancer Research*, 2009, Vol. 69, No. 2, P. 416-421.

116. Kurosu T., Wu N., Oshikawa G., Kagechika H., Miura O. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway//*Apoptosis*, 2010, Vol. 15, No. 5, P. 608-620.
117. Kojima K., Shimanuki M., Shikami M., Andreeff M., Nakakuma H. Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and mitochondrial apoptosis in AML//*Cancer Science*, 2009, Vol. 100, No. 6, P. 1128-1136.
118. Vilgelm A.E., Pawlikowski J.S., Liu Y., Hawkins O.E., Davis T.A., Smith J., Weller K.P., Horton L.W., McClain C.M., Ayers G.D., Turner D.C., Essaka D.C., Stewart C.F., Sosman J.A., Kelley M.C., Ecsedy J.A., Johnston J.N., Richmond A. Mdm2 and Aurora Kinase A Inhibitors Synergize to Block Melanoma Growth by Driving Apoptosis and Immune Clearance of Tumor Cells//*Cancer Research*, 2015, Vol. 75, No. 1, P. 181-193.
119. Tonsing-Carter E., Bailey B.J., Saadatzadeh M.R., Ding J., Wang H., Sinn A.L., Peterman K.M., Spragins T.K., Silver J.M., Sprouse A.A., Georgiadis T.M., Gunter T.Z., Long E.C., Minto R.E., Marchal C.C., Batuello C.N., Safa A.R., Hanenberg H., Territo P.R., Sandusky G.E., Mayo L.D., Eischen C.M., Shannon H.E., Pollok K.E. Potentiation of Carboplatin-Mediated DNA Damage by the Mdm2 Modulator Nutlin-3a in a Humanized Orthotopic Breast-to-Lung Metastatic Model//*Molecular Cancer Therapeutics*, 2015, Vol. 14, No. 12, P. 2850-2863.
120. Tosoni D., Pambianco S., Soppo B.E., Zecchini S., Bertalot G., Pruneri G., Viale G., Fiore P.P.D., Pece S. Pre-clinical validation of a selective anti-cancer stem cell therapy for Numb-deficient human breast cancers//*EMBO Molecular Medicine*, 2017, Vol. 9, No. 5, P. 655-671.
121. Wali V.B., Langdon C.G., Held M.A., Platt J.T., Patwardhan G.A., Safonov A., Aktas B., Pusztai L., Stern D.F., Hatzis C. Systematic Drug Screening Identifies Tractable Targeted Combination Therapies in Triple-Negative Breast Cancer//*Cancer Research*, 2017, Vol. 77, No. 2, P. 566-578.
122. Cheok C.F., Dey A., Lane D.P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Sensitize Tumor Cells to Nutlin-Induced Apoptosis: a Potent Drug Combination//*Molecular Cancer Research*, 2007, Vol. 5, No. 11, P. 1133-1145.
123. Ray-Coquard I., Blay J.Y., Italiano A., Cesne A.L., Penel N., Zhi J., Heil F., Rueger R., Graves B., Ding M., Geho D., Middleton S.A., Vassilev L.T., Nichols G.L., Bui B.N. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: An exploratory proof-of-mechanism study//*The Lancet Oncology*, 2012, Vol. 13, No. 11, P. 1133-1140.
124. Patnaik A., Tolcher A., Beeram M., Nemunaitis J., Weiss G.J., Bhalla K., Agrawal M., Nichols G., Middleton S., Beryozkina A., Sarapa N., Peck R., Zhi J. Clinical pharmacology characterization of RG7112, an MDM2 antagonist, in patients with advanced solid tumors//*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2015 76:3, 2015, Vol. 76, No. 3, P. 587-595.
125. Mahfoudhi E., Lordier L., Marty C., Pan J., Roy A., Roy L., Rameau P., Abbes S., Debili N., Raslova H., Chang Y., Debussche L., Vainchenker W., Plo I., Mahfoudhi E., Lordier L., Marty C., Pan J., Roy A., Roy L., Rameau P., Abbes S., Debili N., Raslova H., Chang Y., Debussche L., Vainchenker W., Plo I. P53 activation inhibits all types of hematopoietic progenitors and all stages of megakaryopoiesis//*Oncotarget*, 2016, Vol. 7, No. 22, P. 31980-31992.

126. Silva J.L., Lima C.G.S., Rangel L.P., Ferretti G.D.S., Pauli F.P., Ribeiro R.C.B., da Silva T. de B., da Silva F.C., Ferreira V.F. Recent Synthetic Approaches towards Small Molecule Reactivators of p53//*Biomolecules*, 2020, Vol. 10, No. 4.
127. Pini D., Iuliano A., Rosini C., Salvadori P. An Efficient and Practical Route to Enantiomerically Pure (+)-(1R,2R)- and (-)-(1S,2S)-1,2-Diphenylethane-1,2-diamines//*Synthesis (Germany)*, 1990, Vol. 1990, No. 11, P. 1023-1024.
128. Kolb H.C., VanNieuwenhze M.S., Sharpless K.B. Catalytic asymmetric dihydroxylation//*Chemical Reviews*, 1994, Vol. 94, No. 8, P. 2483-2547.
129. Hilgraf R., Pfaltz A. Chiral bis(N-sulfonylamino)phosphine- and TADDOL-phosphite-oxazoline ligands: Synthesis and application in asymmetric catalysis//*Advanced Synthesis and Catalysis*, 2005, Vol. 347, No. 1, P. 61-77.
130. Lohray B.B., Ahuja J.R. Synthesis of homochiral amino alcohols, aziridines and diamines via homochiral cyclic sulphites//*Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1991, No. 2, P. 95-97.
131. Skarzewski J., Gupta A. Synthesis of C₂ symmetric primary vicinal diamines. Double stereospecific Mitsunobu reaction on the heterocyclic diols derived from tartaric acid//*Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, Vol. 8, No. 11, P. 1861-1867.
132. Kasina S., Fritzberg A.R., Johnson D.L., Eshima D. Tissue Distribution Properties of Technetium-99m-Diamide-Dimercaptate Complexes and Potential Use as Renal Radiopharmaceuticals//*Journal of Medicinal Chemistry*, 1986, Vol. 29, No. 10, P. 1933-1940.
133. Fristad W.E., Thompson S.R., Brandvold T.A., Peterson J.R. Conversion of Alkenes to 1, 2-Diazides and 1, 2-Diamines//*Journal of Organic Chemistry*, 1985, Vol. 50, No. 19, P. 3647-3649.
134. Moriarty R.M., Khosrowshahi J.S. A versatile synthesis of vicinal diazides using hypervalent iodine//*Tetrahedron Letters*, 1986, Vol. 27, No. 25, P. 2809-2812.
135. Gust R., Burgemeister T., Mannschreck A., Schönenberger H. Aqua[1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine](sulfato)platinum-(II) Complexes with Variable Substituents in the 2-Phenyl Ring. 1. Synthesis and Antitumor and Estrogenic Properties//*Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, Vol. 33, No. 9, P. 2535-2544.
136. Müller R., Gust R., Schönenberger H., Klement U. Stereoisomeric Dichloro[1-(hydroxyphenyl)-2-phenyl-1,2-ethanediamine]platinum(II) Complexes, Part I: Synthesis//*Chemische Berichte*, 1991, Vol. 124, No. 11, P. 2381-2389.
137. Gust R., Schönenberger H. Third Generation Antitumor Platinum(II) Complexes of the [1-(Fluoro/difluorophenyl)-2-phenylethylenediamine]platinum(II) Type//*Archiv der Pharmazie*, 1995, Vol. 328, No. 7-8, P. 595-603.
138. Becker P.N., White M.A., Bergman R.G. A New Method for 1,2-Diamination of Alkenes Using Cyclopentadienylnitrosylcobalt Dimer/NO/LiAlH₄//*Journal of the American Chemical Society*, 1980, Vol. 102, No. 17, P. 5676-5677.

139. Muñiz K., Barreiro L., Romero R.M., Martínez C. Catalytic Asymmetric Diamination of Styrenes//*Journal of the American Chemical Society*, 2017, Vol. 139, No. 12, P. 4354-4357.
140. Weng S.S., Hsieh K.Y., Zeng Z.J., Zhang J.W. Synergistic copper-TEMPO catalysis of intermolecular vicinal diamination of styrenes//*Tetrahedron Letters*, 2017, Vol. 58, No. 7, P. 670-673.
141. Kohn H., Jung S.H. New Stereoselective Method for the Preparation of Vicinal Diamines from Olefins and Cyanamide//*Journal of the American Chemical Society*, 1983, Vol. 105, No. 12, P. 4106-4108.
142. Jung S.H., Kohn H. A new reductive procedure for the preparation of vicinal diamines and monoamines//*Tetrahedron Letters*, 1984, Vol. 25, No. 4, P. 399-402.
143. Jung S.H., Kohn H. Stereoselective Synthesis of Vicinal Diamines from Alkenes and Cyanamide//*Journal of the American Chemical Society*, 1985, Vol. 107, No. 10, P. 2931-2943.
144. Osowska-Pacewicka K., Zwierzak A. An expedient synthesis of vicinal diamines from alkenes and cycloalkenes//*Synthesis (Germany)*, 1990, Vol. 1990, No. 6, P. 505-508.
145. Swift G., Swern D. Chemistry of Epoxy Compounds. XX. Stereospecific Syntheses of Cis and Trans-1, 2-Diaminocyclohexanes and Aliphatic Vicinal Diamines//*Journal of Organic Chemistry*, 1967, Vol. 32, No. 3, P. 511-517.
146. Würtenberger I., Angermaier B., Kircher B., Gust R. Synthesis and in vitro pharmacological behavior of platinum(II) complexes containing 1,2-diamino-1-(4-fluorophenyl)-2-alkanol ligands//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 56, No. 20, P. 7951-7964.
147. Llaveria J., Beltrán Á., Sameera W.M.C., Locati A., Díaz-Requejo M.M., Matheu M.I., Castellón S., Maseras F., Pérez P.J. Chemo-, regio-, and stereoselective silver-catalyzed aziridination of dienes: Scope, mechanistic studies, and ring-opening reactions//*Journal of the American Chemical Society*, 2014, Vol. 136, No. 14, P. 5342-5350.
148. Deshpande S.H., Shende V.S., Shingote S.K., Chakravarty D., Puranik V.G., Chaudhari R.V., Kelkar A.A. Rhodium complex with unsymmetrical vicinal diamine ligand: excellent catalyst for asymmetric transfer hydrogenation of ketones//*RSC Advances*, 2015, Vol. 5, No. 64, P. 51722-51729.
149. Wosińska-Hrydczuk M., Boratyński P.J., Skarżewski J. Regioselective and stereodivergent synthesis of enantiomerically pure Vic-diamines from chiral β -amino alcohols with 2-pyridyl and 6-(2,20-bipyridyl) moieties//*Molecules*, 2020, Vol. 25, No. 3.
150. Liu Y., Sandoval C.A., Yamaguchi Y., Zhang X., Wang Z., Kato K., Ding K. Hydrogen bonding makes a difference in the rhodium-catalyzed enantioselective hydrogenation using monodentate phosphoramidites//*Journal of the American Chemical Society*, 2006, Vol. 128, No. 44, P. 14212-14213.
151. Corey E.J., Imwinkelried R., Pikul S., Xiang Y.B. Practical enantioselective diels-alder and aldol reactions using a new chiral controller system//*Journal of the American Chemical Society*, 1989, Vol. 111, No. 14, P. 5493-5495.

152. Bayardon J., Sinou D. Synthesis of an Enantiopure Fluorous 1,2-Diphenyl-1,2-diaminoethane//*Synthesis*, 2004, Vol. 2005, No. 03, P. 425-428.
153. Bambridge K., Begley M.J., Simpkins N.S. Simple synthesis of a C₂ symmetric vicinal diamine: Highly diastereoselective Grignard addition to a chiral bis-imine//*Tetrahedron Letters*, 1994, Vol. 35, No. 20, P. 3391-3394.
154. Neumann W.L., Rogic M.M., Dunn T.J. The stereoselective synthesis of functionalized vicinal diamine systems by the double allylation reactions of "protected" 1,2-bis-imine precursors//*Tetrahedron Letters*, 1991, Vol. 32, No. 42, P. 5865-5868.
155. Vemula R., Wilde N.C., Goreti R., Corey E.J. A New, Short, and Stereocontrolled Synthesis of C₂-Symmetric 1,2-Diamines//*Organic Letters*, 2017, Vol. 19, No. 14, P. 3883-3886.
156. Shearer J.M., Rokita S.E. Diamine preparation for synthesis of a water soluble Ni(II) salen complex//*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1999, Vol. 9, No. 3, P. 501-504.
157. Duschinsky R., Dolan L.A., Randall L.O., Lehmann G. Diamines. I. The synthesis of amino analogs of adrenaline, arterenol and ephedrine//*Journal of the American Chemical Society*, 1947, Vol. 69, No. 12, P. 3150-3150.
158. Reetz M.T., Jaeger R., Drewlies R., Hübel M. Stereoselective Synthesis of Vicinal Diamines//*Angewandte Chemie International Edition in English*, 1991, Vol. 30, No. 1, P. 103-106.
159. Buono G., Triantaphylides C., Peiffer G., Petit F. Synthesis of chiral N- And N,N'-substituted diamines and diamino alcohols from amino acids//*Synthesis (Germany)*, 1982, Vol. 1982, No. 12, P. 1030-1033.
160. Kise N., Ueda N. Reductive coupling of aromatic oxims and azines to 1,2-diamines using Zn-MsOH or Zn-TiCl₄//*Tetrahedron Letters*, 2001, Vol. 42, No. 12, P. 2365-2368.
161. Shono T., Kise N., Oike H., Yoshimoto M., Okazaki E. A novel method for stereoselective synthesis of (1R,2R)-diarylethylenediamines by reductive intramolecular coupling of aromatic diimines//*Tetrahedron Letters*, 1992, Vol. 33, No. 38, P. 5559-5562.
162. Shimizu M., Iida T., Fujisawa T. Highly Enantioselective Imino Pinacol Coupling Leading to the Synthesis of 1,2-Diphenylethylenediamine Derivatives//*Chemistry Letters*, 2006, Vol. 24, No. 7, P. 609-610.
163. Zhong Y.W., Izumi K., Xu M.H., Lin G.Q. Highly diastereoselective and enantioselective synthesis of enantiopure C₂-symmetrical vicinal diamines by reductive homocoupling of chiral N-tert-butanesulfinyl imines//*Organic Letters*, 2004, Vol. 6, No. 25, P. 4747-4750.
164. Roskamp E.J., Pedersen S.F. Convenient Routes to Vicinal Diamines: Coupling of Nitriles or N-(Trimethylsilyl)imines Promoted by NbCl₄(THF)₂//*Journal of the American Chemical Society*, 1987, Vol. 109, No. 10, P. 3152-3154.
165. Sakai T., Korenaga T., Washio N., Nishio Y., Minami S., Ema T. Synthesis of Enantiomerically Pure (R,R)- and (S,S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethane-1,2-diamine and Evaluation of the pK_a Value

by Ab Initio Calculations//Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2004, Vol. 77, No. 5, P. 1001-1008.

166. Tamura K., Kumagai N., Shibasaki M. Direct catalytic asymmetric mannich-type reaction of benzyl isocyanide: Stereoselective synthesis of 1,2-diarylethylenediamines//European Journal of Organic Chemistry, 2015, Vol. 2015, No. 14, P. 3026-3031.

167. Vara B.A., Mayasundari A., Tellis J.C., Danneman M.W., Arredondo V., Davis T.A., Min J., Finch K., Guy R.K., Johnston J.N. Organocatalytic, diastereo- and enantioselective synthesis of nonsymmetric cis -stilbene diamines: A platform for the preparation of single-enantiomer cis -imidazolines for protein-protein inhibition//Journal of Organic Chemistry, 2014, Vol. 79, No. 15, P. 6913-6938.

168. Davis T.A., Vilgelm A.E., Richmond A., Johnston J.N. Preparation of (-)-nutlin-3 using enantioselective organocatalysis at decagram scale//Journal of Organic Chemistry, 2013, Vol. 78, No. 21, P. 10605-10616.

169. Davis T.A., Johnston J.N. Catalytic, enantioselective synthesis of stilbene cis-diamines: A concise preparation of (-)-Nutlin-3, a potent p53/MDM2 inhibitor//Chemical Science, 2011, Vol. 2, No. 6, P. 1076-1079.

170. Lu N., Li R., Wei Z., Cao J., Liang D., Lin Y., Duan H. Enantio- and Diastereoselective Nitro-Mannich Reaction of α -Aryl Nitromethanes with Amidosulfones Catalyzed by Phase-Transfer Catalysts//Journal of Organic Chemistry, 2017, Vol. 82, No. 9, P. 4668-4676.

171. Corey E.J., Kühnle F.N.M. A simplified synthesis of (\pm)-1,2-Diphenyl-1,2-diaminoethane from benzaldehyde and ammonia. Revision of the structures of the long-known intermediates "hydrobenzamide" and "amarine"//Tetrahedron Letters, 1997, Vol. 38, No. 50, P. 8631-8634.

172. Méndez-Sánchez D., Ríos-Lombardía N., García-Granda S., Montejo-Bernardo J., Fernández-González A., Gotor V., Gotor-Fernández V. Lipase-catalyzed desymmetrization of meso-1,2-diaryl-1,2-diaminoethanes//Tetrahedron: Asymmetry, 2014, Vol. 25, No. 4, P. 381-386.

173. Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., Tkachenko S.E., Zefirov N.S. Reaction of Aromatic Aldehydes with Ammonium Acetate//Russian Journal of Organic Chemistry, 2003, Vol. 38, No. 18.

174. Bessonov I.V., Lozinskaya N.A., Katashova V.R., Proskurnina M.V., Zefirov N.S. Stereoselective synthesis of 1,2-diamino-1,2-diarylethane derivatives//Russian Chemical Bulletin 2005 54:1, 2005, Vol. 54, No. 1, P. 211-214.

175. Fantinati A., Bianco S., Cristofori V., Cavazzini A., Catani M., Zanirato V., Pacifico S., Rimondi E., Milani D., Voltan R., Secchiero P., Trapella C. Expedient Synthesis and Biological Characterization of Enantio-Enriched (-)-Nutlin-3//ChemistrySelect, 2017, Vol. 2, No. 27, P. 8504-8508.

176. Kim H., Nguyen Y., Yen C.P.H., Chagal L., Lough A.J., Kim B.M., Chin J. Stereospecific synthesis of C2 symmetric diamines from the mother diamine by resonance-assisted hydrogen-bond directed diaza-cope rearrangement//Journal of the American Chemical Society, 2008, Vol. 130, No. 36, P. 12184-12191.

177. Патент № US 2003/0153580 A1. Cis-imidazolines. опубли. 14.08.2003 / N. Kong.

178. Патент № WO 2005/110996 A1. Novel cis-imidazolines. опублик. 24.11.2005 / N. Fotouhi.
179. Shu L., Wang P., Liu W., Gu C. A Practical Synthesis of a *cis*-4,5-Bis(4-chlorophenyl)imidazoline Intermediate for Nutlin Analogues//Organic Process Research & Development, 2012, Vol. 16, No. 11, P. 1866-1869.
180. Патент № WO 2012/045018 A1. Aryl substituted imidazolines. опублик. 05.04.2012 / R.K. Guy, Y. Zhang, B. Young.
181. Патент № US 2010/0075966 A1. Substituted Dihydroimidazoles and their Use in the Treatment of Tumors. заявл. 25.03.2010 / S. Chamoin.
182. Патент № US 2004/0259884 A1. Cis-imidazolines. опублик. 12.2004 / G.J. Haley.
183. Патент № US 2012/0088915 A1. Stereoselective methods, catalysts and intermediates for the synthesis of (-)-nutlin-3 and related compounds. опублик. 12.04.2012 / J.N. Johnston, T.A. Davis.
184. Патент № US 9,988,368 B1. Chiral synthesis method for producing cis-imidazoline compounds for pharmaceutical use. опублик. 05.06.2018 / T.W. von Geldern, B. Backes, B. Chen.
185. Lozinskaya N.A., Tsybezova V.V., Proskurnina M.V., Zefirov N.S. Regioselective synthesis of cis- and trans-2,4,5-triarylimidazolines and 2,4,5-triarylimidazoles from available reagents//Russian Chemical Bulletin, 2003, Vol. 52, No. 3, P. 674-678.
186. Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods//Free Radical Research, 2002, Vol. 36, No. 2, P. 177-187.
187. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S., Bektaşoğlu B., Berker K., Özyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay//Molecules, 2007, Vol. 12, No. 7, P. 1496-1547.
188. Baizer M.M., Stocker J.H. Organic Electrochemistry. An Introduction and A Guide//Journal of The Electrochemical Society, 1974, Vol. 121, No. 3, P. 134C.
189. Zhuang C., Miao Z., Zhu L., Dong G., Guo Z., Wang S., Zhang Y., Wu Y., Yao J., Sheng C., Zhang W. Discovery, Synthesis, and Biological Evaluation of Orally Active Pyrrolidone Derivatives as Novel Inhibitors of p53–MDM2 Protein–Protein Interaction//Journal of Medicinal Chemistry, 2012, Vol. 55, No. 22, P. 9630-9642.
190. Zanjirband M., Edmondson R.J., Lunec J. Pre-clinical efficacy and synergistic potential of the MDM2-p53 antagonists, Nutlin-3 and RG7388, as single agents and in combined treatment with cisplatin in ovarian cancer//Oncotarget, 2016, Vol. 7, No. 26, P. 40115-40134.
191. Du W., Wu J., Walsh E.M., Zhang Y., Chen C.Y., Xiao Z.X.J. Nutlin-3 affects expression and function of retinoblastoma protein. Role of Retinoblastoma protein in cellular response to nutlin-3//Journal of Biological Chemistry, 2009, Vol. 284, No. 39, P. 26315-26321.
192. Huang B., Deo D., Xia M., Vassilev L.T. Pharmacologic p53 Activation Blocks Cell Cycle Progression but Fails to Induce Senescence in Epithelial Cancer Cells//Molecular Cancer Research, 2009, Vol. 7 (9), P. 1497-1509.

193. Kubbutat M.H., Vousden K.H. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability//Molecular and cellular biology, 1997, Vol. 17, No. 1, P. 460-468.
194. Saha M.N., Jiang H., Mukai A., Chang H. RITA Inhibits Multiple Myeloma Cell Growth through Induction of p53-Mediated Caspase-Dependent Apoptosis and Synergistically Enhances Nutlin-Induced Cytotoxic Responses//Molecular Cancer Therapeutics, 2010, Vol. 9, No. 11, P. 3041-3051.
195. Sayan B.S., Sayan A.E., Knight R.A., Melino G., Cohen G.M. p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria//Journal of Biological Chemistry, 2006, Vol. 281, No. 19, P. 13566-13573.
196. Popowicz G.M., Czarna A., Holak T.A. Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain//Cell Cycle, 2008, Vol. 7, No. 15, P. 2441-2443.
197. Joseph T.L., Madhumalar A., Brown C.J., Lane D.P., Verma C. Differential binding of p53 and nutlin to MDM2 and MDMX: Computational studies//Cell Cycle, 2010, Vol. 9, No. 6, P. 1167-1181.
198. Hu C., Dou X., Wu Y., Zhang L., Hu Y. Design, synthesis and CoMFA studies of N1-amino acid substituted 2,4,5-triphenyl imidazoline derivatives as p53–MDM2 binding inhibitors//Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, Vol. 20, No. 4, P. 1417-1424.
199. Nietzold F., Rubner S., Berg T. The hydrophobically-tagged MDM2–p53 interaction inhibitor Nutlin-3a-HT is more potent against tumor cells than Nutlin-3a//Chemical Communications, 2019, Vol. 55, No. 95, P. 14351-14354.
200. Ishihara M., Togo H. Direct oxidative conversion of aldehydes and alcohols to 2-imidazolines and 2-oxazolines using molecular iodine//Tetrahedron, 2007, Vol. 63, No. 6, P. 1474-1480.
201. Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE//Nature 1994 371:6495, 1994, Vol. 371, No. 6495, P. 346-347.
202. Kocik J., Machula M., Wisniewska A., Surmiak E., Holak T.A., Skalniak L. Helping the Released Guardian: Drug Combinations for Supporting the Anticancer Activity of HDM2 (MDM2) Antagonists//Cancers 2019, Vol. 11, Page 1014, 2019, Vol. 11, No. 7, P. 1014.
203. Shamloo B., Usluer S. P21 in cancer research//Cancers, 2019, Vol. 11, No. 8, P. 1-19.
204. Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53//Molecular Cell, 2001, Vol. 7, No. 3, P. 683-694.
205. Abbas T., Dutta A. P21 in Cancer//Nature reviews Cancer, 2010, Vol. 9, No. 6, P. 400-414.
206. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage//DNA Repair, 2016, Vol. 42, P. 63-71.
207. Sun Q., Guo Y., Liu X., Czauderna F., Carr M.I., Zenke F.T., Blaukat A., Vassilev L.T. Therapeutic implications of p53 status on cancer cell fate following exposure to ionizing radiation and the DNA-PK inhibitor M3814//Molecular Cancer Research, 2019, Vol. 17, No. 12, P. 2457-2468.

208. Bazanov D.R., Pervushin N.V., Savitskaya V.Y., Anikina L.V., Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation//*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2019, Vol. 29, No. 16, P. 2364-2368.
209. Villalonga-Planells R., Coll-Mulet L., Martínez-Soler F., Castaño E., Acebes J.-J., Giménez-Bonafé P., Gil J., Tortosa A. Activation of p53 by Nutlin-3a Induces Apoptosis and Cellular Senescence in Human Glioblastoma Multiforme//*PLOS ONE*, 2011, Vol. 6, No. 4, P. e18588.
210. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Boughaba J.A., Chojnowski G., Christensen M.E., Waterhouse N.J. Dead cert: Measuring cell death//*Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, Vol. 2016, No. 12, P. 1064-1072.
211. Plesca D., Mazumder S., Almasan A. DNA Damage Response and Apoptosis//*Methods in Enzymology*. – 2008. – Vol. 446. – P. 107-122.
212. Kaboudin B., Saadati F. Alumina-ammonium acetate as an efficient reagent for the one-pot synthesis of cis-2,4,5-triarylimidazolines from aromatic aldehydes//*Heterocycles*, 2005, Vol. 65, No. 2, P. 353-357.
213. Uchida H., Shimizu T., Reddy P.Y., Nakamura S., Toru T. Solvent-free efficient synthesis of 2,4,5-triarylimidazolines from aromatic aldehydes and hexamethyldisilazane//*Synthesis*, 2003, No. 8, P. 1236-1240.
214. Lozinskaya N.A., Tsybezova V. V., Proskurnina M. V., Zefirov N.S. Regioselective synthesis of cis- and trans-2,4,5-triarylimidazolines and 2,4,5-triarylimidazoles from available reagents//*Russian Chemical Bulletin*, 2003.
215. Wang F., Liao Q., Xi C. Convenient One-Step Synthesis of cis-2,4,5-Triarylimidazolines from Aromatic Aldehydes with Urea//*Synthetic Communications*, 2012, Vol. 42, No. 6, P. 905-913.
216. Safari H., Blaschette A. Darstellung und Eigenschaften von Trimethyl-(dialkylamidossulfonyl)-ammoniumhalogeniden//*Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 1970, Vol. 101, No. 5, P. 1373-1387.
217. Russell S., Rahmani R., Jones A.J., Newson H.L., Neilde K., Cotillo I., Rahmani Khajouei M., Ferrins L., Qureishi S., Nguyen N., Martinez-Martinez M.S., Weaver D.F., Kaiser M., Riley J., Thomas J., De Rycker M., Read K.D., Flematti G.R., Ryan E., Tanghe S., Rodriguez A., Charman S.A., Kessler A., Avery V.M., Baell J.B., Piggott M.J. Hit-to-Lead Optimization of a Novel Class of Potent, Broad-Spectrum Trypanosomacides//*Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, Vol. 59, No. 21, P. 9686-9720.
218. McDermott S.D., Burke P.O., Spillane W.J. Basicity of nitrogen-sulphur(VI) compounds. Part 5. Ionization of trisubstituted sulphamides//*Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1984, No. 3, P. 499-502.
219. Bazanov D.R., Pervushin N.V., Savin E.V., Tsymliaikov M.D., Maksutova A.I., Sosonyuk S.E., Kopeina G.S., Lozinskaya N.A. Sulfonamide derivatives of cis-imidazolines as potent p53-MDM2/MDMX protein-protein interaction inhibitors//*Medicinal Chemistry Research*, 2021, Vol. 30, No. 12, P. 2216-2227.

220. Song H., Xiao Y., Zhang Z., Xiong W., Wang R., Guo L., Zhou T. Switching Selectivity in Copper-Catalyzed Transfer Hydrogenation of Nitriles to Primary Amine-Boranes and Secondary Amines under Mild Conditions//The Journal of Organic Chemistry, 2022, Vol. 87, No. 1, P. 790-800.

221. Gulidova O.V., Lyubitskii O.B., Klebanov G.I., Chesnokova N.B. Antioxidant activity of tear fluid in experimental alkali eye burns//Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1999, Vol. 128, No. 5, P. 1155-1158.