

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Иванов Владимир Николаевич**

**Ингибиторы матриксных металлопротеиназ на основе производных  
5-аризатинов: синтез и изучение взаимосвязи структура-активность**

1.4.16. Медицинская химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2024

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

**Научный руководитель:** **Куркин Александр Витальевич**  
*кандидат химических наук, доцент*

**Официальные оппоненты:** **Вацадзе Сергей Зурабович**  
*доктор химических наук, профессор, профессор РАН,*  
ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского  
Российской академии наук, заведующий лабораторией  
супрамолекулярной химии (№2)

**Шевцова Елена Феофановна**  
*доктор химических наук,*  
ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем  
химической физики и медицинской химии Российской академии  
наук, Институт физиологически активных веществ (ИФАВ РАН),  
Отдел медицинской и биологической химии, главный научный  
сотрудник, и.о. заведующего лабораторией биомолекулярного  
скрининга

**Вацуро Иван Михайлович**  
*кандидат химических наук,*  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова», Химический факультет, ведущий научный  
сотрудник НИЛ гетероатомных соединений кафедры химии  
нефти и органического катализа

Защита диссертации состоится « 12 » апреля 2024 г. в 11 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

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

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2791>

Автореферат разослан « 11 » марта 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.014.7,

кандидат химических наук



Н.А. Сеникова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Синтез селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ММП) является актуальной задачей медицинской химии, поскольку данные протеазы играют важную роль в регуляции многочисленных физиологических процессов, вовлечены в патофизиологию сердечно-сосудистых заболеваний, играют существенную роль в гемодинамических и сосудистых изменениях. Участие ММП в опухолевой трансформации, а также в процессах инвазии и метастазирования доказано *in vitro* и *in vivo*. Металлопротеиназы участвуют в процессах канцерогенеза, воздействуя на различные пути передачи сигнала в клетке, на межклеточные взаимодействия, а также продуцируя различные биологически активные молекулы. У больных с бронхоальвеолярной карциномой выявлен значительный уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9 опухолевыми клетками, что обуславливает высокую инвазивность и подвижность опухоли. Высокая активность ММП-9 обнаружена при раке желудка и находится в строгой корреляционной зависимости со степенью опухолевой прогрессии, сопутствующего ангиогенеза и малигнизации. Кроме ММП-9 опухолевые клетки желудка экспрессируют ММП-2, которая не определяется в нормальной ткани. Важно также отметить, что уровень мРНК ММП-2 значительно выше при низкодифференцированных формах рака и метастазировании, чем при высокодифференцированных формах злокачественных опухолей.

ММП-8 вовлечена в различные патологические процессы, протекающие в костной и мышечной тканях (заболевания пародонта, опорно-двигательного аппарата и др.). ММП-8, как и ММП-3, найдены в клетках карциномы молочной железы. Было доказано, что ММП-8 оказывает существенное влияние на процессы, связанные с развитием рака молочной железы. Для ММП-9 выявлена прямая корреляционная зависимость с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, гиперфункция фермента может приводить к: инфаркту миокарда, сердечной недостаточности, развитию ишемической болезни сердца (ИБС). Положительная корреляционная связь выявлена также между ММП-2 и кортизолом. ММП-7 - протеолитический фермент, повышенная экспрессия которого способна приводить к онкологическим заболеваниям желудочно-кишечного тракта, а также ускорять их метастазирование и ангиогенез.

К настоящему моменту не известно ни одного полностью синтетического селективного ингибитора ММП, одобренного в качестве лекарственного препарата Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и Европейским агентством лекарственных средств (EMA). В первую очередь, это связано с нежелательными побочными эффектами, проявляемыми данными ингибиторами: низкой селективностью и способностью хелатировать большое количество металл-зависимых ферментов, что может приводить к непоправимым последствиям. Хотя большинство экспериментальных и клинических испытаний ингибиторов ММП пока не продемонстрировали значительного прогресса, последние исследования, связанные с появлением новых генетических и фармакологических данных, вселяют надежду, что в ближайшем будущем будут разработаны эффективные лекарственные препараты на основе ингибиторов ММП.

Батимастат (BB-94) (экспериментальный противоопухолевый препарат - ингибитор коллагеназы типа IV) - первый и наиболее известный ингибитор ММП, содержащий в своей структуре фрагмент гидроксамовой кислоты. Его испытания были начаты тридцать лет назад, но он так и не

получил клинического одобрения. В настоящий момент известен только один ингибитор ММП - Доксициклин, который был одобрен FDA для лечения заболеваний пародонта. Однако, эту молекулу никак нельзя рассматривать в качестве направленной медхимической разработки, поскольку изначально Доксициклин использовали в качестве антибиотика широкого спектра действия.

При комплексообразовании Доксициклина с ионом  $Zn^{2+}$  происходит связывание лиганда с активным сайтом фермента, что приводит к прекращению каталитической активности. Интересно, что связывание Батимастата и других ингибиторов ММП, содержащих остаток гидроксамовой кислоты, демонстрирует заметное сходство в эффективности с ингибированием ММП тканевыми ингибиторами матричных металлопротеиназ (ТИММП). Определение того, что в разработке ИММП также используют прямую координацию лигандов с металлами как ключевое взаимодействие для ингибирования ММП еще больше подчеркивает важность связывания металлов в разработке новых ингибиторов металлоферментов, однако, данная особенность приводит к существенному понижению селективности в отношении целевых металлопротеиназ, что в свою очередь, является фактором для возникновения нежелательных побочных эффектов. Таким образом, принципиально важным условием, для селективного ингибирования ММП, является отсутствие хелатирующего действия на ион цинка, входящего в состав ММП.

Актуальной задачей является поиск и синтез новых селективных ингибиторов ММП, содержащих в своей структуре, различные фармакофорные фрагменты (остатки гидроксамовой кислоты, гидроксильных групп и фосфорных кислот, производные гетероциклов и др.), позволяющие заполнять полости в структуре фермента и хелатировать ион цинка.

В частности, такими молекулами могут быть производные ароматических азотсодержащих гетероциклов, например, изатина, поскольку данные молекулы способны образовывать устойчивые комплексы с ионами металлов и взаимодействовать с поверхностью белка. Сочетание в структуре лиганда фармакофорных групп, которые способны осуществлять взаимодействие с поверхностью белка (образование водородных связей или использование структурных особенностей белка) и структурного фрагмента гетероцикла может усилить биологическую активность и увеличить селективность.

Таким образом, настоящая работа направлена на получение новых производных азотсодержащих гетероциклов, сочетающих в себе остатки фармакофорных групп (изатиновый цикл), и различные по своей природе функциональные заместители, изучению их в качестве потенциальных ингибиторов матричных металлопротеиназ.

**Целями работы являлись** синтез и изучение ингибирующей активности по отношению к белкам семейства ММП производных изатина, построение на их основе библиотеки малых молекул, поиск соединения лидера и построение на его основе сфокусированной библиотеки малых молекул и анализ взаимосвязи структура-активность (SAR).

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи: 1) синтез ряда производных 5-арилизатина; 2) синтез ряда 5-арил-3-аминоиндолин-2-онов; 3) синтез ряда замещенных производных антралиновой кислоты; 4) анализ ингибирующей активности полученных азотсодержащих гетероциклических соединений по отношению к различным по своему строению ММП; 5) синтез различных производных спиро[индолин-3,3'-пирролидин]-2-она; 6) синтез бензо[d][1,3]диоксоловых производных изатина и изучение их цитотоксичности; 7) оценка

перспективности использования полученных соединений в качестве потенциальных лекарственных препаратов; 8) построение сфокусированных библиотек малых молекул и анализ взаимосвязи структура-активность (SAR).

**Объект и предмет исследования.** Объект исследования – реакции кросс-сочетаний, а также реакции формирования гетероциклических соединений, с целью получения биологически активных молекул. Предмет исследования – взаимосвязь строения производных изатинового ряда с их биологической активностью в отношении ММП-2, и ММП-8.

#### **Методология и методы исследования**

В исследовании использовались основные приемы медицинской химии, включая направленный синтез гетероциклических соединений, поиск молекул-хитов, установление взаимосвязи структура-активность (SAR), основные подходы к оптимизации новых биологически активных молекул. Синтез гетероциклических соединений проводили с использованием классических методов и приемов органического синтеза. Для выделения и очистки полученных соединений использовались методы препаративной хроматографии и перекристаллизации. Структуру и чистоту полученных соединений устанавливали с помощью комплекса физико-химических методов:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР и ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и рентгеноструктурного анализа, ВЭЖХ-МС.

#### **Научная новизна**

Впервые проведен анализ данных молекулярного моделирования и составлены фармакофорные модели ингибиторов ММП на основе азотсодержащих гетероциклов ряда 5-арилизатинов. Производные изатина и оксоиндолина с ароматическими и гетероароматическими заместителями в 5-м положении гетероциклического кольца предложены в качестве новых структурных типов селективных ингибиторов ММП-2, -и -13. Установлено, что наличие в ароматическом заместителе карбоксиэтильного фрагмента является важным структурным элементом, отвечающим за активность ингибиторов, а увеличение селективности ингибирования вызвано структурными особенностями синтезированных ингибиторов.

Проведен дизайн и последующий синтез ингибиторов ММП на основе 5-арил(гетарил)изатинов, полученных с использованием с использованием реакций кросс-сочетания Стилле и Сузуки, катализируемых комплексами палладия. Показано, что для синтеза сфокусированной библиотеки 5-арил(гетарил)изатинов лучше всего использовать 5-трибутилстаннилизатин, не содержащий в своей структуре защитных групп. Разработан синтез граммовых количеств 5-трибутилстаннилизатина, показана принципиальная возможность получения на его основе неописанных ранее в научной литературе 5-гетарилизатинов.

Синтезирована серия производных 5-арил(гетарил)-3-амино-2-оксоиндолов, содержащих в положении С3 индолинового фрагмента различные по своей природе заместители, для которой впервые был проведен систематический анализ биологических характеристик, выявлены основные закономерности зависимости структура-активности по отношению к ММП.

Найдены перспективные азотсодержащие гетероциклические соединения, проявляющие активность в микромолярном диапазоне концентраций с высокой селективностью к ММП-2 и ММП-13. Установлена противоопухолевая цитотоксичность на культуре опухолевых клеток НСТ116 для ряда производных изатина, содержащих в своей структуре 1,2-метилendioксибензолный фрагмент.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Получены экспериментальные данные по ингибирующей активности по отношению к ММП новых азотсодержащих гетероциклов ряда изатина. Предложен препаративный метод синтеза неизвестных ранее производных 5-арил(гетарил)изатина и 5-арил-3-аминоиндолин-2-онов с различными по своей природе заместителями в ароматическом фрагменте, показано, что с помощью химической модификации С3-положения 5-арилизатинов удается улучшить селективность по отношению к ММП-2 и ММП-13, а производные 5-арил-3-амино-2-оксоиндолины, являются перспективными молекулами для поиска селективных ингибиторов ММП-13.

Разработан новый метод синтеза 5-арил(гетарил)изатинов на основе палладий катализируемой реакции кросс-сочетания с участием 5-трибутилстаннилизатина, который представляет интерес для получения сфокусированной библиотеки 5-арил(гетарил)изатинов.

Разработан подход к синтезу 5-трибутилстаннилизатина, позволяющий его получать с высокими выходами в граммовых количествах. Для большой серии неизвестных производных 5-арил(гетарил)-2-оксоиндолинов проведено систематическое изучение зависимости биологической активности от их строения, осуществлено построение SAR, показано, что для ряда производных 5-арил(гетарил)изатинов и 5-арил(гетарил)-2-оксоиндолинов активность по отношению к ММП находится в микромолярном диапазоне концентрации, установлены структуры соединений, обладающих селективностью по отношению к ММП-2 и ММП-13, которые представляют интерес для дальнейшей оптимизации структур 5-арилизатинов. Установлена противоопухолевая цитотоксическая активность *in vitro* в наномолярном диапазоне для производных изатина, содержащих в своей структуре 1,2-метилendioксибензольный фрагмент.

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

1) Синтез новых ингибиторов ММП, содержащих в своей структуре фрагменты 5-арил(гетарил)изатина, может быть успешно осуществлен с использованием реакций кросс-сочетания Сузуки и (или) Стилле, катализируемых комплексами палладия.

2) 5-Арил(гетарил)изатины могут быть использованы в качестве исходных молекул для химической модификации С3-положения и получения на их основе производных 5-арил-3-амино-2-оксоиндолина.

3) Spiro[индолин-3,3'-пирролидин]-2-оны могут быть получены в результате последовательности химических превращений, включающих в себя: ацилирование 4-арил-2-йоданилина хлорангидридом акриловой кислоты, алкилирование атома азота анилина, tandem реакций – реакция кросс-сочетания по Хеку и реакция [3+2]-циклоприсоединения, что приводит к образованию диастереомерных производных, содержащих спиросочлененные фрагменты пирролидина и оксоиндолинона.

4) Полученные данные по ингибирующей активности производных изатина демонстрируют эффективность производных 5-арилизатина и 5-арил-3-амино-2-оксоиндолина в качестве селективных ингибиторов ММП 2 и ММП 13, в сравнении с эффективностью по отношению к другим эндопептидазам семейства ММП.

5) Полученные данные SAR показывают увеличение цитотоксической активности при введении фрагмента бензо[d][1,3]диоксола в 5-е положение изатина, что может быть использовано при дальнейшей разработке активных фармацевтических субстанций.

**Личный вклад автора** состоял в сборе и анализе литературных данных по тематике исследования. Автор принимал участие в составлении плана исследований. Автором осуществлен дизайн и синтез целевых соединений, анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка материалов исследования к публикации в научных изданиях совместно с соавторами. Во всех опубликованных в соавторстве работах по теме диссертационной работы вклад Иванова В.Н. является основополагающим.

### **Публикации**

По материалам диссертационного исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.16. Медицинская химия и тезисы докладов на российских и международной конференциях.

### **Апробация результатов**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных и российских конференциях: Всероссийская научная школа-конференция «Марковниковские чтения» (Московская область, Красновидово, 2024), The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Москва, Россия, 2017); IV Всероссийская с международным участием конференция по медицинской химии (Екатеринбург, Россия, 2019); XXVI National Meeting in Medicinal Chemistry (Милан, Италия, 2019).

### **Структура и объем работы**

Работа состоит из шести разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 214 листах машинописного текста, содержит 95 схем, 30 рисунков, 16 таблиц. Список литературы включает 211 наименований.

Отдельные части работы выполнены при поддержке гранта РФФИ (№ 20-33-90131). Автор выражает благодарности сотрудникам ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова: д.х.н. Годовикову И.А.; МГУ имени М.В.Ломоносова: н.с. Алтиери А., м.н.с. Новоселову А.М., м.н.с. Юсупову И.Р., профессору, д.х.н. Лысенко К.А.; ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Научно-исследовательского института канцерогенеза: профессору, д.м.н. Штилю А.А.; Университета «Габриэле д'Аннунцио» в г. Къети (Италия): профессору Агаменнон М.; Университета «Альдо Моро» в г. Бари (Италия): профессору Торторелла П.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Введение**

В данном разделе обоснована актуальность работы, ее научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и основные задачи работы.

**Обзор литературы** посвящен белкам семейства ММП, а также методам синтеза различных производных изатина, обладающих биологической активностью.

## Результаты и их обсуждение

Структура работы основана на последовательном решении следующих задач:

- (1) Анализ данных фенотипического скрининга и определение структурных классов соединений, на основе которых могут быть получено соединения лидер.
- (2) Синтез библиотеки структур, содержащих в своей структуре гетероциклический фрагмент, отвечающий за активность и селективность по отношению к ММП.
- (3) Анализ данных биологической активности и построение зависимости структура-активность для синтезированных соединений.
- (4) Изучение возможных химических модификаций производных 5-аризатинов, позволяющих улучшить уровень активности и селективности новых ингибиторов ММП.
- (5) Оценка противоопухолевой активности производных изатина методом МТТ.

### ***1. Фенотипический скрининг библиотеки малых молекул, содержащих в своей структуре фрагменты азотистых гетероциклов, способных образовывать связи с ионами цинка.***

На протяжении последних десятилетий ученые разных стран занимались разработкой, поиском и синтезом высокоэффективных, селективных ингибиторов ММП. Несмотря на то, что исследователями была проведена колоссальная работа в этом направлении, задача до сих пор является нерешенной. Так, весьма незначительное число малых органических молекул дошло до клинических испытаний, и только несколько молекул прошли 1-ю фазу клинических испытаний, в итоге, только одно соединение было одобрено FDA как ингибитор матричной металлопротеиназы (ИММП) (см. раздел введение). Однако, отрицательный результат данных исследований, не делает эту тематику менее актуальной и менее востребованной, по причине того, что разработка новых селективных ингибиторов матричных металлопротеиназ, делает возможным открытие новых лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний, в частности онкологических, поскольку одной из основных причин гиперфункции ММП является опухоль-индуцированный ангиогенез.

Таким образом, учитывая имеющиеся литературные данные и наработки нашей лаборатории, на первом этапе работы было предложено провести подробное изучение ингибирования ММП азотсодержащими гетероциклическими молекулами - производными индола, пиридина, изатина, изоксазола, пиперидина, бензотиазола, пиррола и др. Исследование включало создание фармакофорной модели активного сайта фермента, дизайн и синтез потенциальных ингибиторов, тестирование биологической активности, компьютерное моделирование и анализ полученных результатов, изучение взаимосвязи между структурой описанных веществ и проявляемой биологической активностью. Безусловно, все поставленные задачи не могли бы быть решены без привлечения специалистов в области медицинской химии, биохимии, компьютерного моделирования – этот фрагмент диссертационной работы проводился совместно с учеными Университета «Габриэле д'Аннунцио» (г. Кьети, Италия) и Университета «Альдо Моро» (г. Бари, Италия).

По причине того, что на биологические исследования большого массива малых органических молекул требуются существенные временные и материальные затраты, для поиска новых селективных ИММП, среди большой библиотеки различных гетероциклических соединений, синтезированных в нашей научной группе, был использован стандартный подход, заключающийся в первичном виртуальном скрининге всех синтезированных молекул и дальнейшем биологическом тестировании выбранных в результате скрининга соединений на возможность связываться и ингибировать

матриксные металлопротеиназы. Первоначальным этапом нашего исследования стала задача, основанная на правильном формировании библиотеки исходных соединений. Для первичного скрининга было выбрано около 3 500 гетероциклических соединений. После этого, на основании описанных в современной научной литературе алгоритмов были отсеяны структуры (с предварительной низкой биологической активностью или являющиеся сложно синтезируемыми или сложно модифицируемыми) с использованием фильтра REOS в приложении Canvass, что практически в два раза уменьшило размеры библиотеки (до 1 900 молекул). Важно отметить, что выбранные для скрининга молекулы являлись “структурными фрагментами”, а их молекулярные веса находились в диапазоне от 150 Да до 400 Да, что открывало в будущем возможность их целенаправленной химической модификации и получения на их основе сфокусированных библиотек малых молекул. Использование фрагментного скрининга обусловлено меньшей затратой ресурсов в силу его возможного виртуального проведения, в отличие от высокопроизводительного скрининга (high throughput screening), который является исключительно экспериментальной методологией.

Биологические испытания синтезированных соединений, были проведены коллегами из Италии по методикам, описанным в их статьях.

Для получения структурной информации о взаимодействии белков ММП и низкомолекулярных гетероциклических соединений, был проведён молекулярный докинг в структуру протеиназы при помощи программы Glide. Первоначально была создана фармакофорная модель потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-13 на основе анализа базы данных Protein Data Bank (PDB) (рисунок 1, ). Для расчетов были использованы РСА-модели ММП-2, сокристаллизованной с ингибитором SC-74020 и РСА-модели ММП-13, сокристаллизованной с соединением 1 - производным пиримидин-4,6-дикарбоновой кислоты.

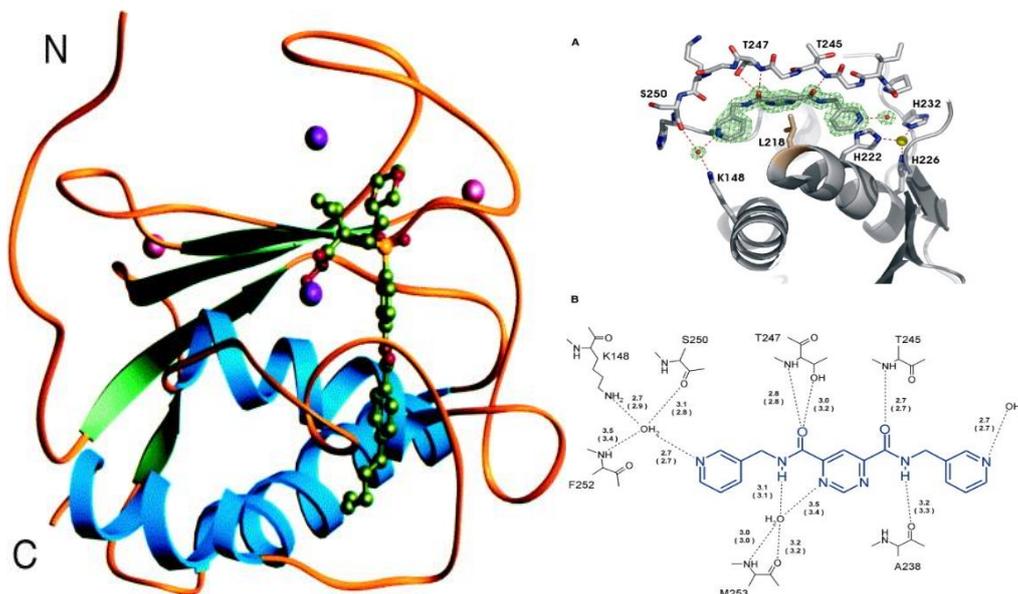


Рисунок 1. Примеры ингибиторов ММП-2 и ММП-13. Фармакофорная модель взаимодействия ингибитора SC-74020 с каталитическим центром ММП-2 и взаимодействие ингибитора 1, не содержащего цинк-связывающую группу, с ММП-13.

Результаты моделирования были тщательно проанализированы, нами была проведена визуальная оценка, в частности, на предмет наличия  $\pi$ - $\pi$  стекинга между низкомолекулярным лигандом и His201 (нумерация ММП-2), которая является консервативной аминокислотой в семействе

металлопротеиназ. Дополнительно, мы проводили оценку возможности синтеза большого набора аналогов для дальнейшего анализа взаимосвязи структура-активность.

На предварительном этапе работы мы отобрали 12 азотсодержащих гетероциклических соединений (схема 1), имеющих молекулярные массы более 200 Да и представляющих собой рацематы. Данные соединения были подвергнуты тестированию на активность по отношению ко всем металлопротеиназам, биологическая значимость которых известна, однако ввиду того что ММП-2,-8 и -13, являются наиболее эффективными мишенями при терапии онкологических заболеваний, большее внимание уделено именно этим видам ММП. Необходимо отметить, что для соединений 1, 2 и 9 и 12, представляющих собой рацематы, моделирование проводилось для каждого из энантиомеров отдельно. Для веществ, показавших ингибирование более 50% металлопротеиназ, проводили измерение IC50.

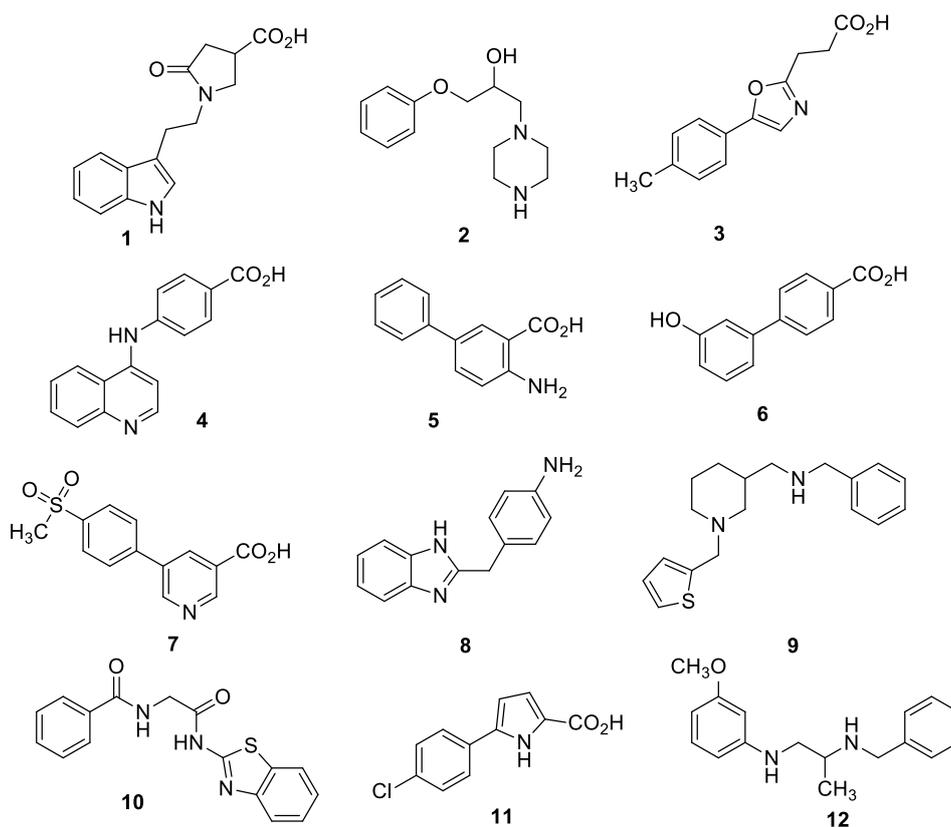


Схема 1. Финальный список соединений, выбранных для биологического тестирования

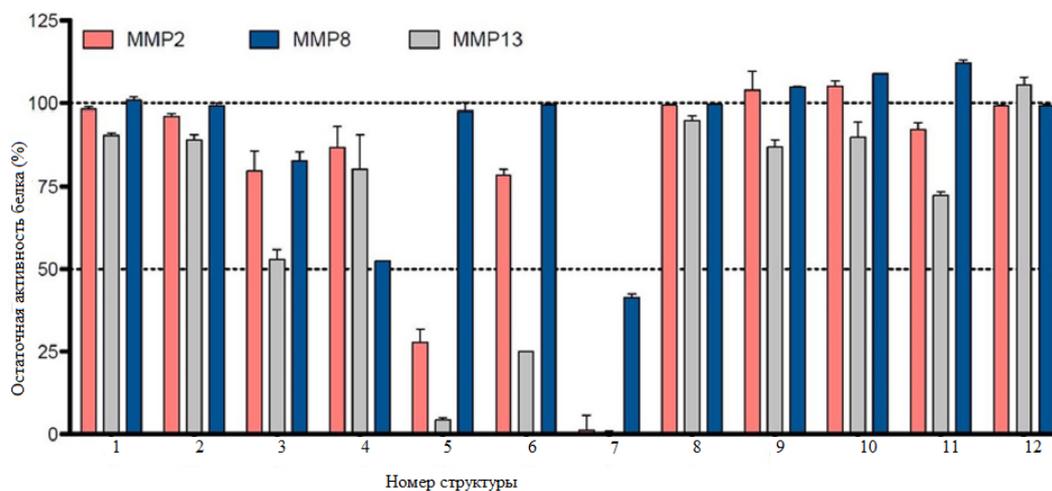


Схема 2. Ингибирование соединениями 1-12 ММП-2,-8 и -13

В ходе анализа полученных результатов, представленных на схеме 2, было установлено, что в присутствии двух соединений - производного антралиловой кислоты (**5**) и производного никотиновой кислоты (**7**) – наблюдается низкий (менее 50%) уровень остаточной активности ММП-2 и ММП-13.

На основании полученных результатов, а также в виду наличия в нашей научной группе соединений, близких по своей структуре к производным антралиловой кислоты **5** и никотиновой кислоты **7**, для дальнейших исследований нами были выбраны **15** соединений, структуры которых представлены на схеме 3 (красные – аналоги никотиновой кислоты **7**, синие – производные антралиловой кислоты **5**). Производные антралиловой кислоты можно рассматривать в качестве производных изатина, поскольку антралиловые кислоты легко могут быть получены из соответствующих изатинов.

Для выбранных веществ была изучена биологическая активность по отношению к ММП-2,-8 и -13.

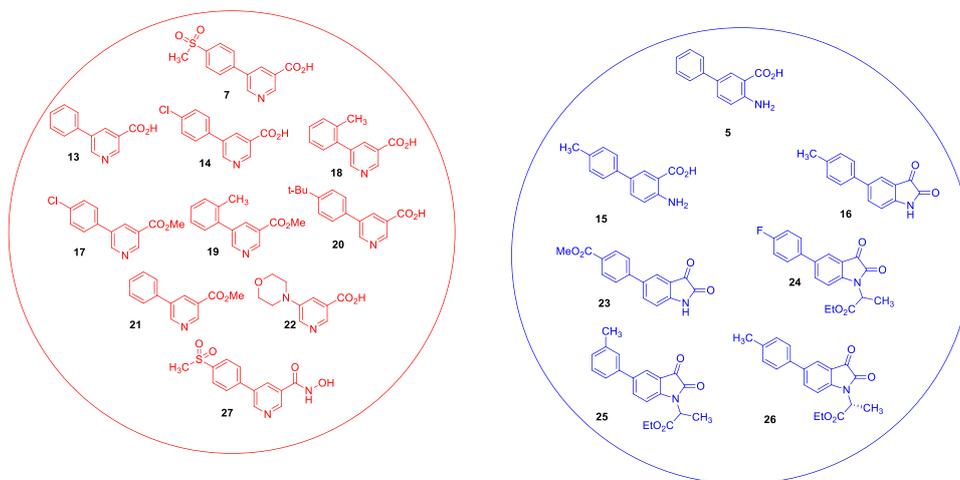


Схема 3. Структуры соединений, являющихся структурно близкими аналогами соединений **5** и **7**, для которых были проведены биологические исследования.

Для представленных выше соединений (**13-27**), также были измерены величины остаточной активности по отношению к протеиназам ММП-2,-8 и -13, как к наиболее эффективным при терапии онкологических процессов, а также для других протеиназ семейства ММП, для определения селективности ингибирования.

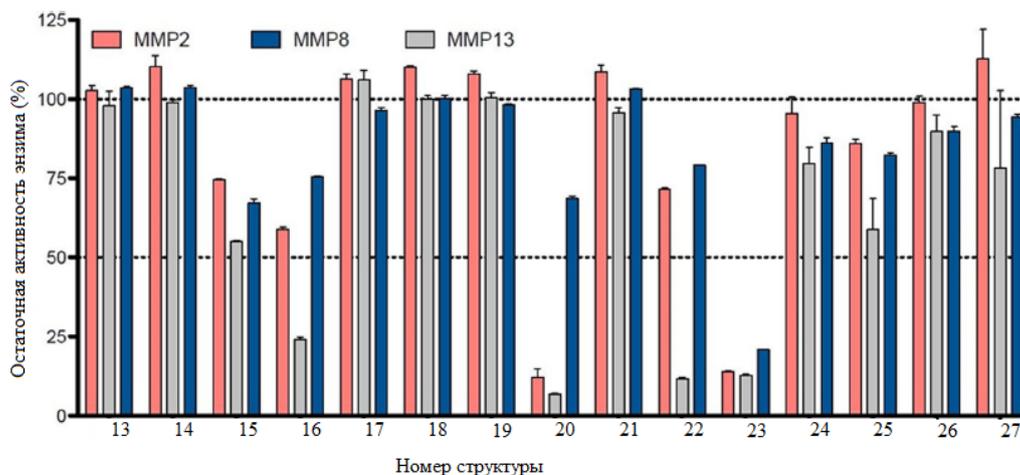


Схема 4. Ингибирование соединениями **13-27** ММП-2,-8 и -13

Таблица 1. Результаты ферментативного анализа, синтезированных соединений.

Соединение	IC <sub>50</sub> (ММП-1) мкМ	IC <sub>50</sub> (ММП-2) мкМ	IC <sub>50</sub> (ММП-7) мкМ	IC <sub>50</sub> (ММП-8) мкМ	IC <sub>50</sub> (ММП-9) мкМ	IC <sub>50</sub> (ММП-13) мкМ
5	>100	54±9.0	>100	>100	58±3	19.8±2.5
<b>7</b>	>100	<b>2.8±0.9</b>	>100	84±11	<b>9±0.4</b>	<b>1.14±0.5</b>
15	>100	>100	>100	>100	>100	79±7
<b>16</b>	>100	>100	>100	>100	>100	<b>16±1.0</b>
<b>20</b>	>100	20±3	>100	>100	86±2	<b>10.3±0.4</b>
22	>100	>100	>100	>100	>100	23.1±1.5
<b>23</b>	>100	<b>6.1±0.7</b>	<b>4.7±0.1</b>	56±9.0	<b>13.2±0.9</b>	<b>6.2±0.6</b>

На основании полученных данных, было принято решение о дальнейшей оптимизации соединений **16** и **23**, являющихся представителями одного класса химических соединений. Соединения **7** и **20**, обладающее активностью по отношению к ММП-2 и ММП-13, мы исключили из рассмотрения, поскольку по данным молекулярного докинга карбоксильная группа молекулы **7**, координируется по иону цинка в активном центре ММП.

## 2. Синтез 5-арилизатинов и их производных

### 2.1 Синтез 5-арилизатинов с использованием реакции Сузуки.

При синтезе 5-арилизатинов с использованием реакций кросс-сочетания в присутствии оснований мы наблюдали низкий выход продуктов реакции, однако, этот факт можно объяснить лабильностью изатинов в щелочной среде, о чем также сообщается в литературе. По этой причине особенно важно осуществлять тщательный pH контроль реакционной среды при проведении реакции, не допуская образования соответствующих анионов антраниловых кислот. При проведении реакции кросс-сочетания мы наблюдали характерные изменения цвета реакционной массы, цветовые переходы соответствовали определённой стадии превращения (схема 5). Полный список синтезированных производных 5-арилизатина, с использованием данной методики, представлен в таблице 2.

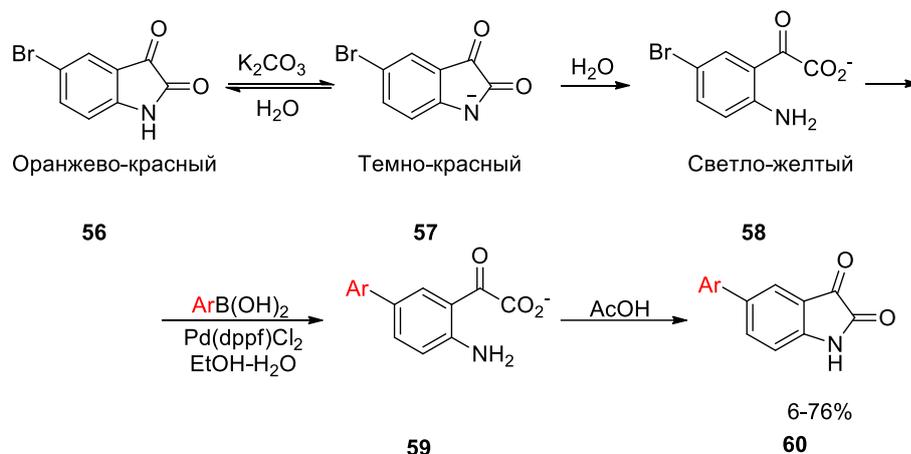
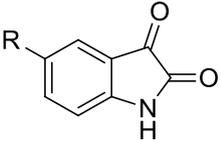
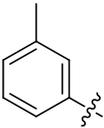
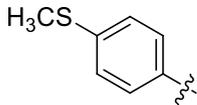
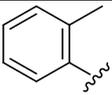
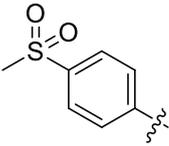
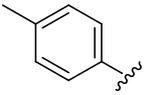
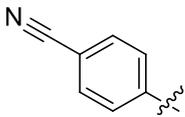
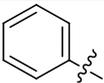
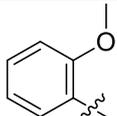
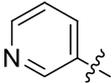
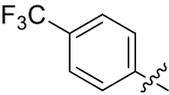
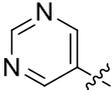
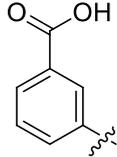
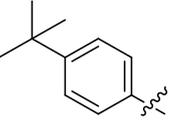
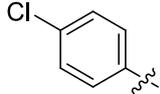
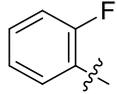
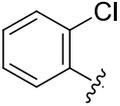
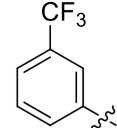
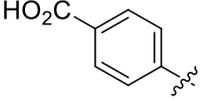
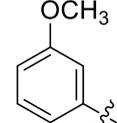
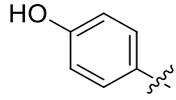
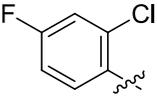
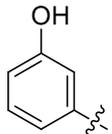
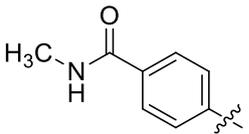
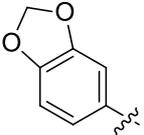
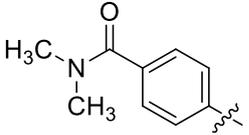
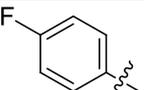
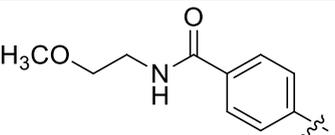


Схема 5. Реакции кросс-сочетания по Сузуки.

Таблица 2. Список синтезированных производных 5-арилизатина с использованием реакции Сузуки.

Соединение	Заместитель	Выход (%)	Соединение	Заместитель	Выход (%)
					
61		52	75		35
62		23	76		46
63		48	77		21
64		26	78		37
65		36	79		54
66		56	80		75
67		26	81		15
68		39	82		47
69		43	83		67
70		75	84		12
71		14	85		0

Продолжение Таблицы 2.

<b>72</b>		6	<b>86</b>		56
<b>73</b>		37	<b>87</b>		39
<b>74</b>		76	<b>88</b>		5

2.2 Химическая модификация изатиновых структур.

Для расширения массива исследуемых структур и увеличения количества потенциально возможных точек варьирования был осуществлен синтез близких аналогов производных 5-арилизатинов, полученных нами ранее с использованием тривиальных химических превращений (схема 6, 7, 8).

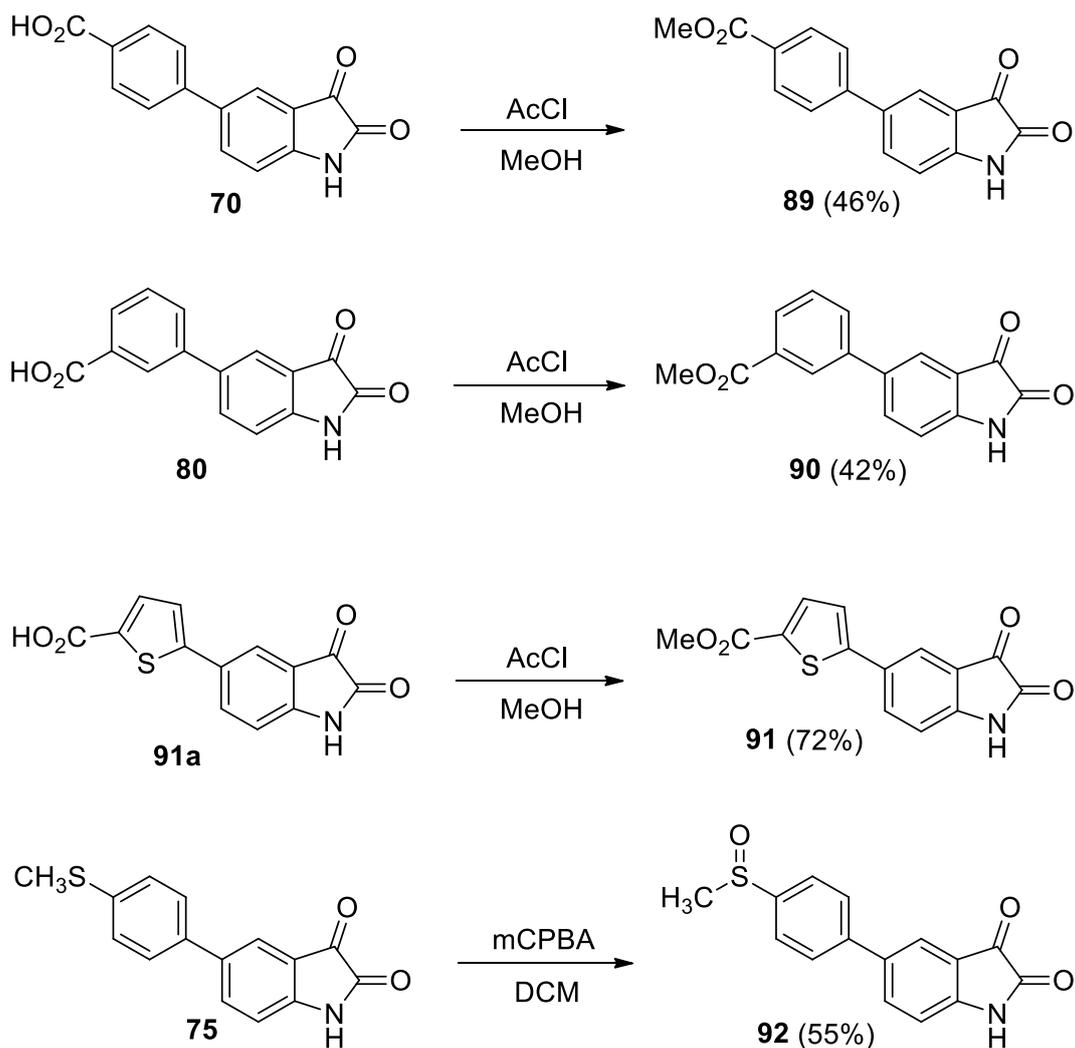


Схема 6. Модификации 5-арилизатинов.

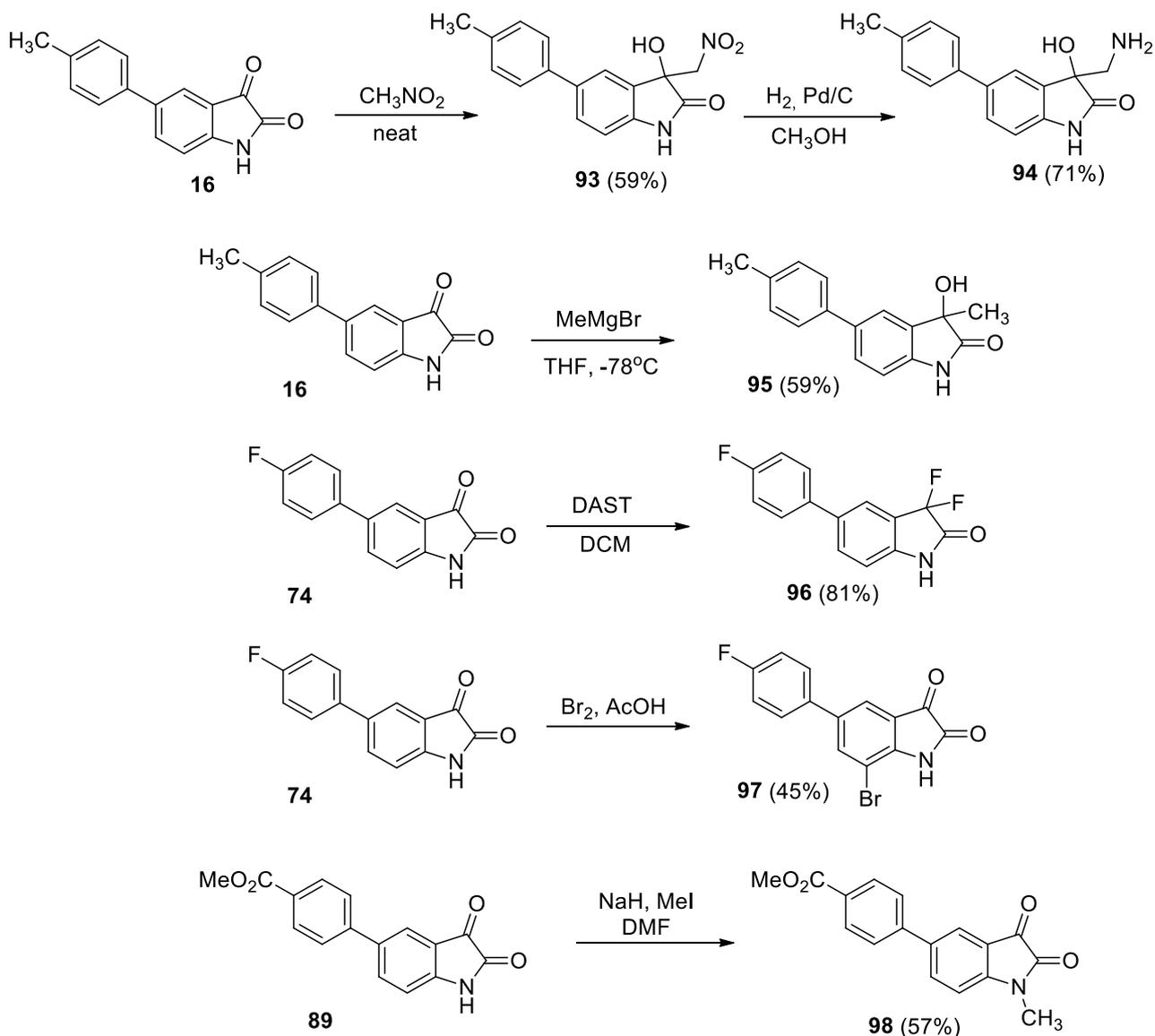


Схема 7. Химические модификации структур 5-арилизатинов.

Также, следует отметить, что в рамках данного этапа работы, был осуществлен синтез рацемических 3-аминооксоиндолов, которые были получены в две стадии из соответствующих 5-арилизатинов (схема 8). Интересно отметить, что синтез оксимов и их каталитическое восстановление в присутствии 10% Pd/C до соответствующих аминов возможно контролировать визуально по изменению окраски. Исходный изатин сначала растворяют в этиловом спирте, затем добавляют требуемое количество карбоната калия и гидрохлорида гидроксиламина, реакционную смесь кипятят в течение 8 часов, затем после выделения и очистки оксима, продукт растворяют в метаноле, насыщенном HCl, добавляют каталитическое количество 10% Pd/C и гидрируют в атмосфере водорода в автоклаве.

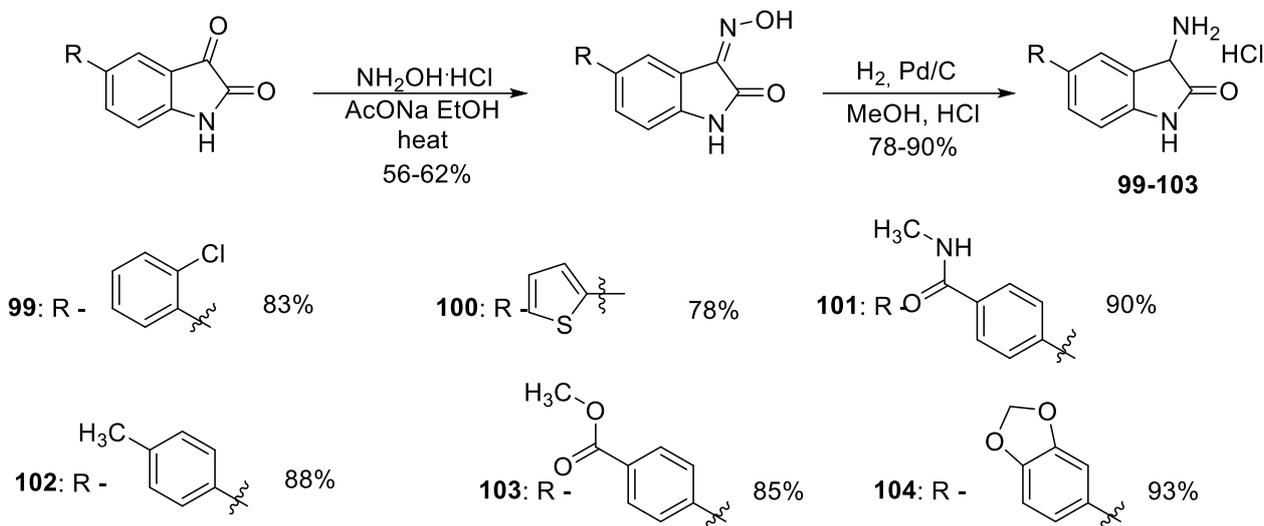


Схема 8. Модификации изатина по положению С-3

### 2.3 Синтез 5-арилизатинов с использованием реакции Стилле.

Как отмечалось ранее, основной целью работы являлся эффективный синтез сфокусированной библиотеки 5-арилизатинов, содержащих в своем составе различные по своей природе заместители, и проведение глубокого анализа взаимосвязи структура-активность полученных соединений. Анализ биологических данных привел нас к выводу, что синтезированная нами на предыдущих этапах работы библиотека малых молекул требует расширения и, в первую очередь, требуется получить новые 5-арилизатины, содержащие в своем составе максимально разнообразные арил(гетарил)фрагменты с целью продолжения поиска среди синтезированных соединений соединения лидера.

К сожалению, реакция кросс-сочетания по Сузуки, помимо всех очевидных достоинств, таких как: высокие выходы, нечувствительность к присутствию воды, а также простота постановки эксперимента, имеет ряд существенных ограничений, связанных с коммерческой недоступностью ряда арилборных кислот, сложностью их синтеза, неустойчивостью в ходе проведения процесса кросс-сочетания. Как правило все эти недостатки существенно снижают область использования реакции и требуют нахождения более универсальных подходов к синтезу 5-арилизатинов. В данной диссертационной работе, нами было предложено использовать в синтезе 5-арилизатинов альтернативный подход, основанный на использовании реакции кросс-сочетания по Стилле.

Реакцию кросс-сочетания по Стилле можно использовать в двух различных подходах:

1) Первоначальный синтез арилстананов и их дальнейшее использование в палладий-катализируемой реакции кросс-сочетания с 5-йодизатином (схема 9);

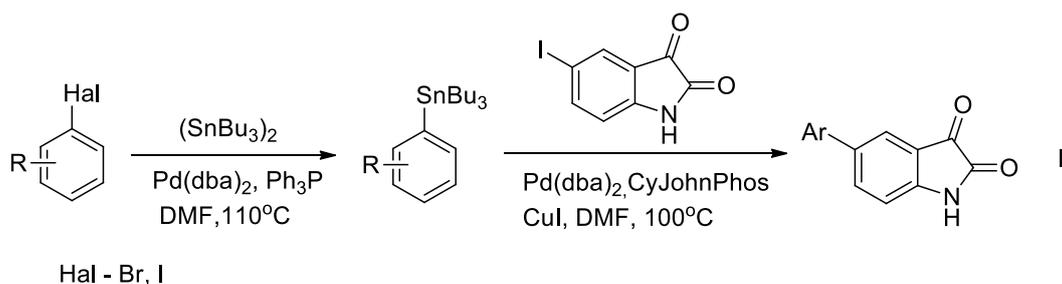


Схема 9. Первый способ синтеза целевых молекул по реакции Стилле.

2) Синтез 5-трибутилстаннилизатина **105** и его использования в качестве исходного реагента в реакции Стилле с арил(гетарил) бромидами. (схема 10).

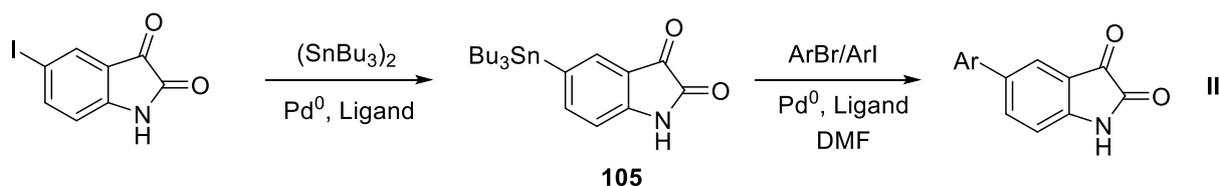


Схема 10. Второй способ синтеза целевых молекул по реакции Стилле.

Второй способ более удобен для синтеза библиотек малых органических молекул, так как он подразумевает использование одного общего исходного соединения (**105**) с дальнейшей одностадийной трансформацией, приводящей к получению большого числа целевых соединений.

В таблице 3 представлена библиотека соединений, синтезированная с использованием реакции Стилле.

Таблица 3. Список синтезированных производных 5-арилизатина с использованием реакции Стилле.

Номер	Радикал	Выход, %	Номер	Радикал	Выход, %
<b>85</b>		54	<b>110</b>		34
<b>106</b>		58	<b>111</b>		30
<b>107</b>		12	<b>112</b>		12
<b>108</b>		43	<b>113</b>		28
<b>109</b>		59	<b>114</b>		39

#### 2.4 Синтез диоксолановых производных изатинового ряда.

С целью расширения данных о биологической активности производных изатина нами были синтезированы производные 5-арилизатинов, содержащих в своей структуре диоксолановый фрагмент, который часто встречается во многих противоопухолевых препаратах. Нами было принято решение о проведении альтернативного исследования по изучению противоопухолевой

цитотоксичности производных **73** и **104** на культуре опухолевых клеток HCT116 (аденокарцинома толстой кишки человека). При проведении исследования были получены данные о высокой противоопухолевой активности 5-аризатина **73** ( $IC_{50} = 5.58 \pm 0.2$  мкМ).

Литературный поиск выявил среди описанных производных изатина, во-первых, серию изатинов, содержащих в своей структуре 5,7-дибромизатиновый фрагмент, для многих из которых была доказана способность ингибировать полимеризацию клеточного белка тубулина, причем, судя по результатам комбинированной терапии этих соединений с известными тубулин-направленными агентами, это происходит за счет взаимодействия с колхициновым сайтом белка. Кроме того, описан 5-аризатин с алкильным заместителем у атома азота изатинового фрагмента, проявивший высокую противоопухолевую активность, способный вызывать изменение морфологии опухолевых клеток и обладающий антиангиогенным действием. Вдохновленные этими сведениями и первичными биологическими результатами, мы решили осуществить синтез библиотеки малых молекул, содержащих в своей структуре бензо[d][1,3]диоксоловый фрагмент (схема 11).

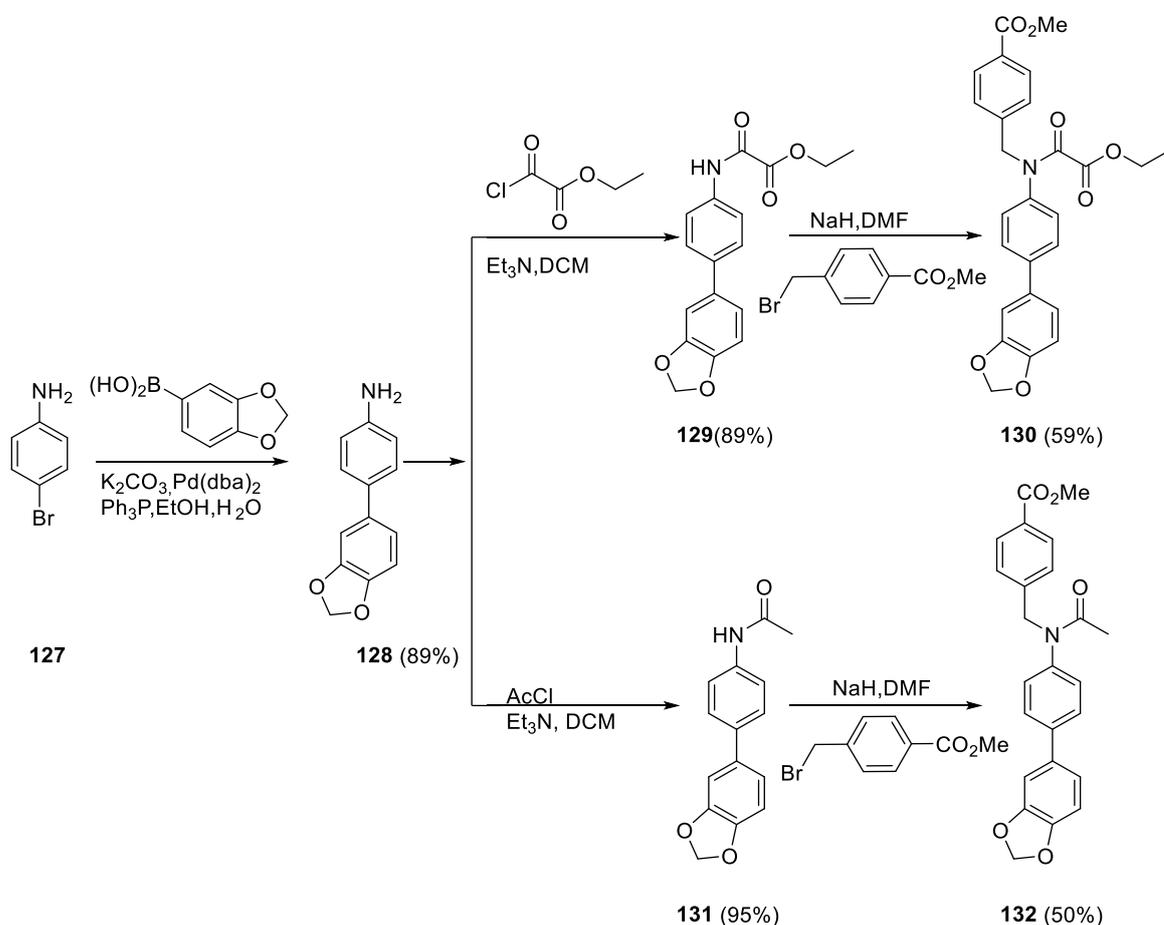


Схема 11. Синтез бензо[d][1,3]диоксоловых производных соединения **73**.

Первым шагом данного этапа работы стала попытка синтеза более простых по своей структуре органических молекул, содержащих в своей структуре бензо[d][1,3]диоксоловый фрагмент. Мы успешно осуществили синтез биарильных анилинов **129-132** с использованием двух и трехстадийных превращений (схема 11). Также нами были получены производные изатина **73** и 3-аминооксиндолина **104**, содержащих при атоме азота гетероциклического ядра остатки бензойной кислоты (схема 12).

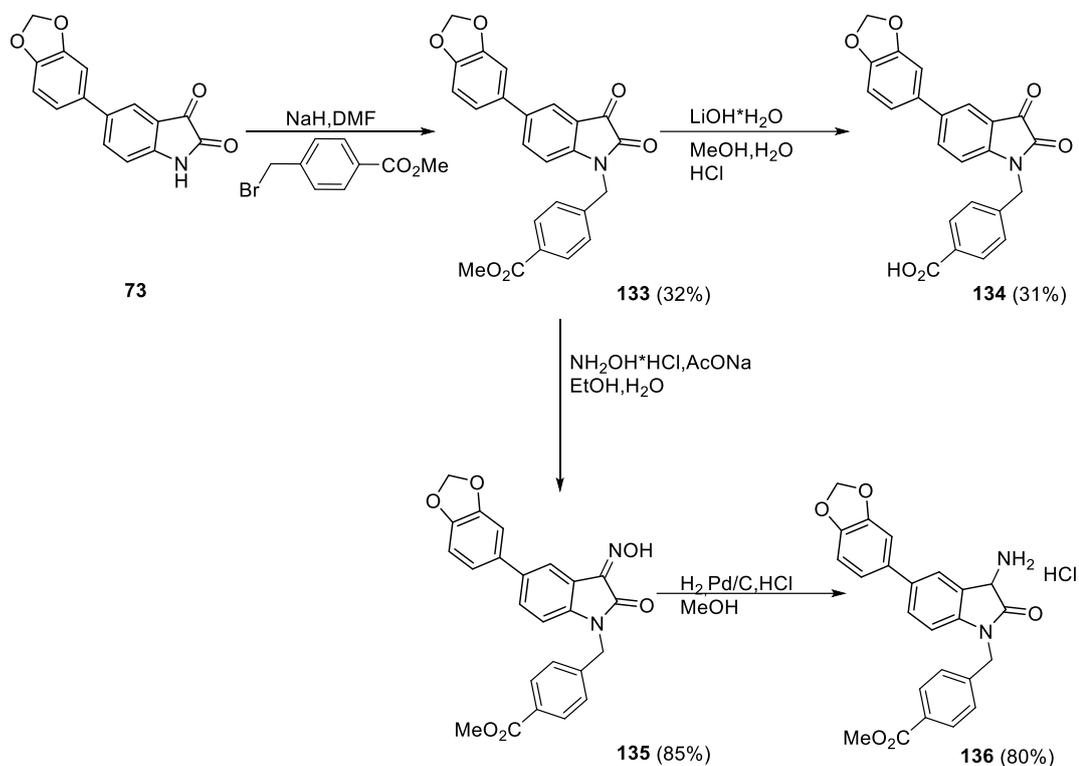


Схема 12. Химические модификации изатина **73** по положению C(3) и N(1) изатинового ядра

### 2.5 Синтез спироциклических производных изатинового ряда.

В рамках следующего этапа данной работы, нами было принято решение о модификации карбонильного положения молекулы изатина **73**. Ранее нами было показано, что модификация этого положения может привести к существенному увеличению уровня биологической активности за счет введения в молекулу аминогруппы. В литературе известны модификации данного положения за счет трансформации изатинов в соответствующие спироиндолины, построение спироцикла на основе изатина перспективно, поскольку наличие хирального центра приводит к улучшению избирательности, селективности и безопасности. Более того, введение спироцикла увеличивает возможности по функционализации молекулы, что может способствовать увеличению межмолекулярных взаимодействий с мишенью.

Для создания спироциклов, помимо классических [3,3]-сигматропных перегруппировок, в органическом синтезе активно используются различные реакции циклоприсоединения (3+2, 4+2 и т.д.). Выбор метода синтеза зависит от размера спироцикла, который требуется получить. Мы остановили свой выбор на синтезе пятичленного спироцикла, основанный на использовании тандема реакций [3+2] циклоприсоединения и реакции Хека (схема 13).

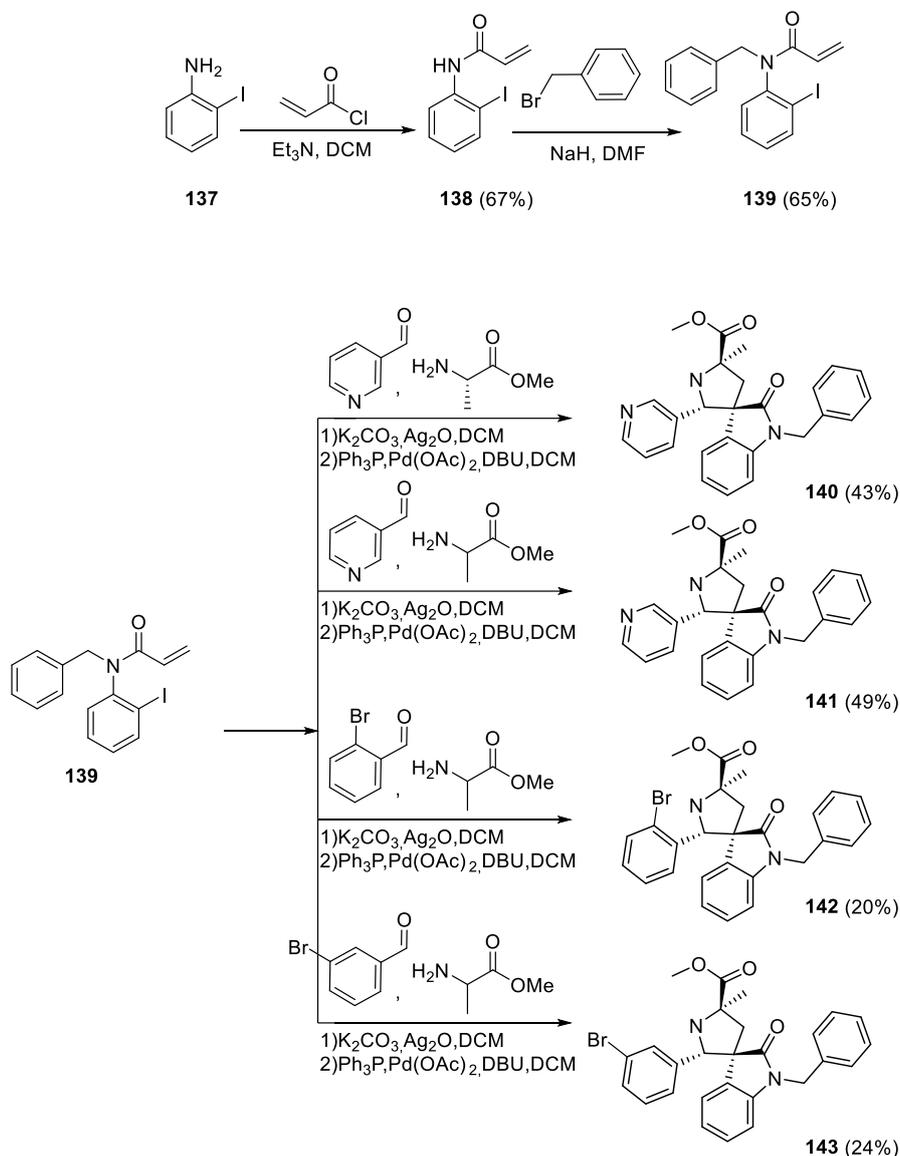


Схема 13. Синтез спироциклических производных.

Предварительно, был осуществлен синтез модельных соединений, в ходе которых, была оптимизирована методика синтеза таких соединений.

Стереохимия данных соединений была взята с учетом оригинаторов статью, в которой впервые был указан данный метод синтеза.

Затем был осуществлен синтез необходимого спироцикла, на основе молекулы **73**. Так как наибольшую эффективность синтеза можно наблюдать в реакциях с 3-пиридин карбальдегидом, было принято решение о его использовании в качестве одного из компонентов синтеза (схема 14).

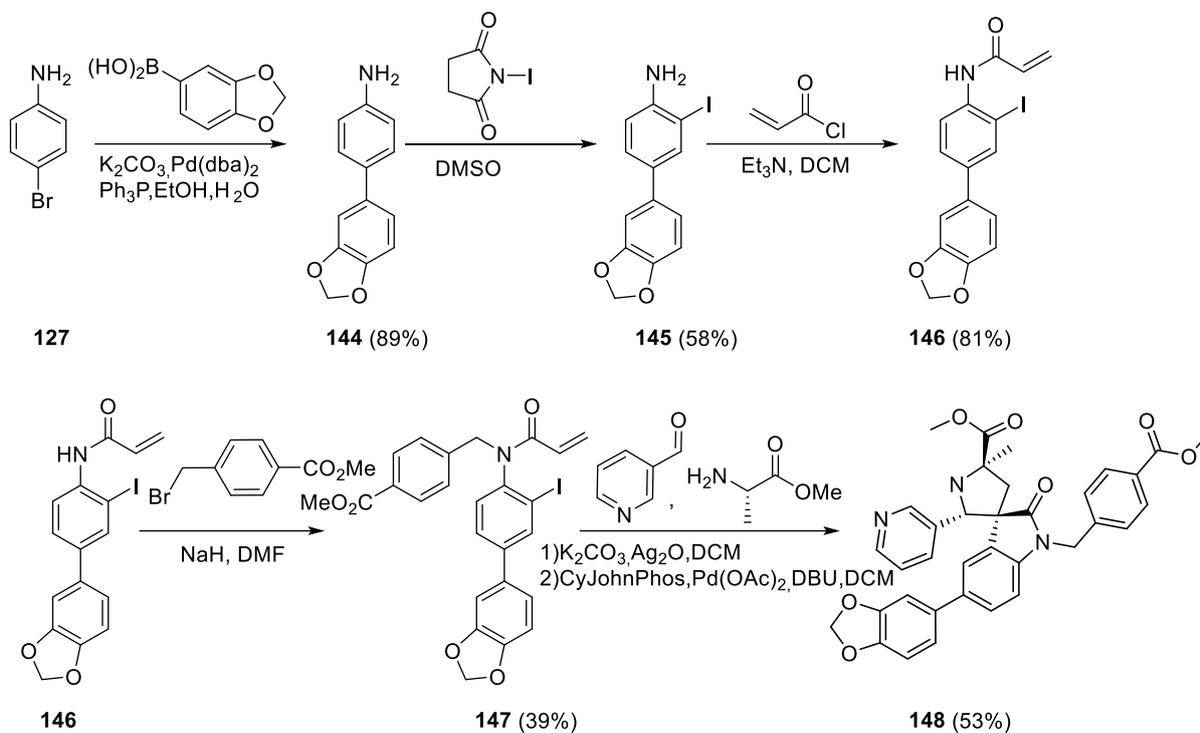


Схема 14. Схема синтез соединения **148**.

### 3. Биологические испытания.

В таблице 4, приведены величины  $\text{IC}_{50}$  для наиболее активных соединений.

Красным цветом выделены вещества, проявляющие высокую активность ( $\leq 10$  мкМ), зелёным - вещества, проявляющие активность интервале  $10 \leq 50$  мкМ.

Таблица 4. Результаты ферментативного анализа синтезированных соединений.

Структура/IC <sub>50</sub>	ММП-2 мкМ	ММП-8 мкМ	ММП-9 мкМ	ММП-13 мкМ
16	112 ± 14	>100	>100	16 ± 1
65	>100	>100	>100	32.5 ± 0.8
66	>100	>100	>100	29.7 ± 0.24
67	13.6 ± 0.6	>100	31.1 ± 0.7	2.7 ± 0.3
69	28 ± 2.2	>100	63 ± 1.5	4.3 ± 0.5
74	10.2 ± 2.	>100	>100	15.8 ± 1.6
75	14 ± 3	>100	>100	3.8 ± 2.1
77	29.1 ± 1.1	>100	>100	20.0 ± 2.0
79	>100	>100	>100	20.4 ± 0.4
83	>100	>100	>100	18.6±1.5
86	14.6 ± 0.8	>100	41.2 ± 2.9	2.2 ± 0.3
88	33 ± 3	>100	>100	48 ± 7
89	6.1 ± 0.7	57.0 ± 9.0	94.8 ± 1.5	6.2 ± 0.6
91	12 ± 6	14.5 ± 2.5	13 ± 3	3.1 ± 0.3
92	15 ± 5	>100	>100	6 ± 3
93	>100	>100	>100	17±11
99	20 ± 3	>100	64 ± 7	3.2 ± 2
100	>100	>100	>100	19 ± 5
101	31±4	>100	>100	49±12
102	23.7 ± 2.7	97 ± 8	50 ± 4	3.4 ± 0.6
103	14.3 ± 1.4	>100	79 ± 0.7	3.4 ± 1
110	18.7 ± 0.5	>100	>100	>100
112	26.9 ± 1.0	>100	>100	>100
115	21.1 ± 1.6	>100	>100	>100
125	11.0 ± 2.0	50.0 ± 0.5	>100	3.0 ± 0.3

#### 4. Соединения лидеры.

В результате выполнения работы нами была синтезирована серия производных 5-арил(гетарил)-2-оксоиндолов, содержащих в положении С<sub>(3)</sub> индолинового фрагмента различные по своей природе заместители, для которой впервые был проведен систематический анализ зависимости биологической активности по отношению к ММП от природы заместителей и их расположения в изатиновом цикле (более 70 соединений). Нами была изучена ингибирующая активность в отношении ММП-2, -8 и -13 неописанных ранее производных 5-арил(гетарил)-3-амино-2-оксоиндола и установлено, что соединение **103** продемонстрировало двукратное увеличение активности в отношении ММП-2 по сравнению с первоначальным соединением лидером, а замена атома кислорода на аминогруппу в положении С<sub>(3)</sub> изатинового ядра приводит к улучшению селективности (схема 15). Идентификация производных 5-арил(гетарил)изатинов в качестве хемотипа, проявляющих

ингибирующее действие по отношению к ММП, носит пионерский характер. Несмотря на то, что нам не удалось получить наномолярную активность и высокую селективность в ряду ММП, данный перспективный класс соединений открывает широкие возможности для их дальнейшей модификации и проведения медико-химических испытаний.

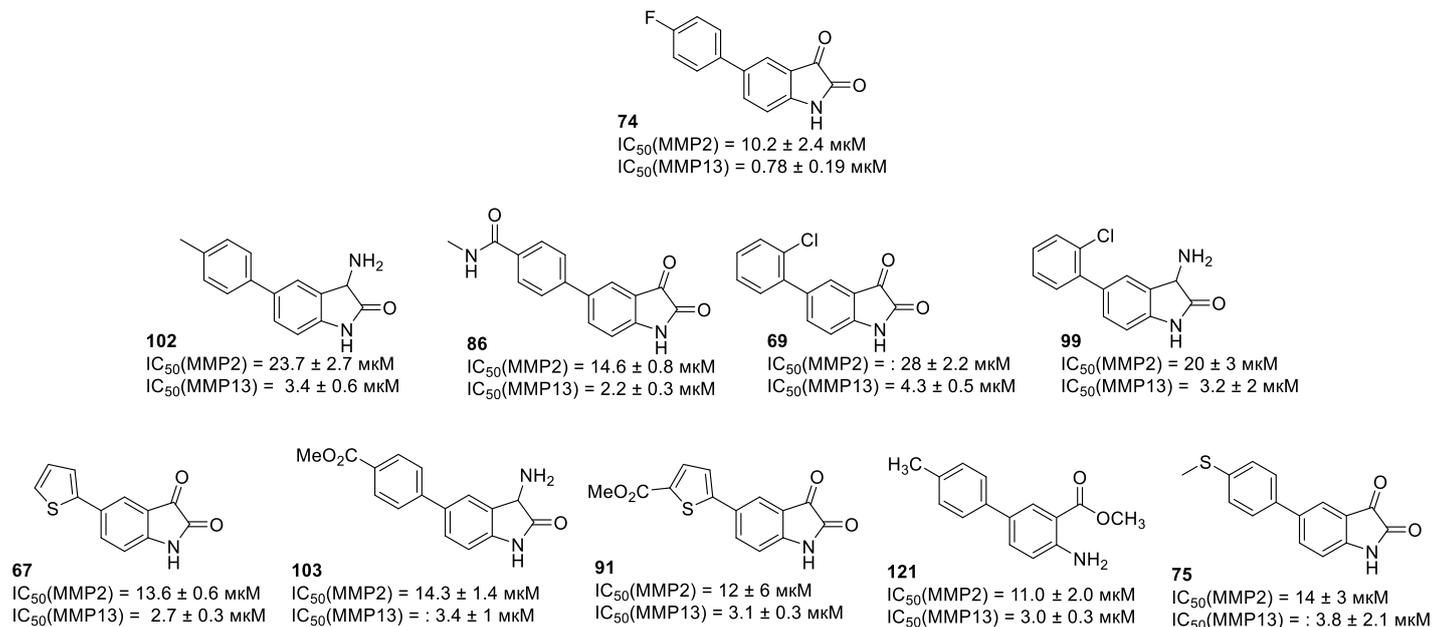


Схема 15. Список соединений, проявивших значимую биологическую активность по отношению к ММП

Получено производное 5-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)изатина (**133**), проявляющее наномолярную цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака толстого кишечника (НСТ 116). Анализ SAR показывает, что целевая модификация молекулы: введение фрагмента бензо[d][1,3]диоксола в 5-е положение изатина и алкильного заместителя к атому азота гетероциклического ядра приводит к стократному увеличению активности по сравнению с другими заместителями, в то же время спиро-модификация по С(3) положению производных 5-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)изатина не приводит к заметному увеличению биологической активности соединений.

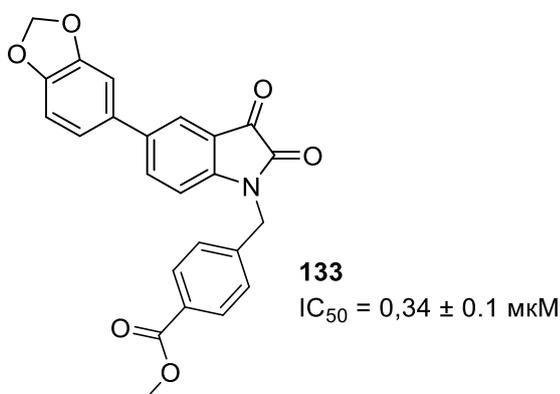


Схема 16. Соединение лидер **133**

## Основные результаты и выводы:

1. Разработан синтетический подход к синтезу 5-арилзамещённых изатинов, которые являются новым структурным типом селективных ингибиторов ММП-2, -8 и -13, найдены соединения, проявляющие активность в микромолярном диапазоне концентраций.
2. Найдены условия синтеза 5-арилизатинов с использованием палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания - реакции Сузуки и реакции Стилле. Показано, что для синтеза сфокусированной библиотеки 5-арил(гетарил)изатинов предпочтительнее использовать 5-трибутилстаннилизатин, не содержащий в своей структуре защитных групп.
3. Разработан синтетический подход к синтезу 5-трибутилстаннилизатина в граммовых количествах, показана принципиальная возможность получения на его основе неописанных ранее в научной литературе 5-гетарилизатинов.
4. Синтезирована серия производных 5-арил(гетарил)-2-оксоиндолов, содержащих в положении С(3) индолинового фрагмента различные по своей природе заместители, для которой впервые был проведен систематический анализ зависимости биологической активности по отношению к ММП от природы заместителей и их расположения в изатиновом цикле.
5. Проведено молекулярное моделирование и изучена ингибирующая активность в отношении ММП-2, -8 и -13 неописанных ранее производных 5-арил(гетарил)-3-амино-2-оксоиндола. Установлено, что соединение 103 продемонстрировало двукратное увеличение активности в отношении ММП-2 по сравнению с первоначальным соединением лидером, а замена атома кислорода на аминогруппу в положении С(3) изатинового ядра приводит к улучшению селективности.
6. Осуществлен синтез новых спироиндолинонов, показано, что они могут быть получены в результате последовательности химических превращений, включающих в себя ацилирование 4-арил-2-йоданилина хлорангидридом акриловой кислоты, алкилирование атома азота анилина и последующего протекания тандема реакции – реакции кросс-сочетания по Хеку и реакции [3+2]-циклоприсоединения, образуя в результате диастереомерные производные, содержащие спиросочлененные фрагменты пирролидина и пиразолидина.
7. Получено производное 5-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)изатина, проявляющее наномолярную цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака толстого кишечника (HCT 116). Анализ SAR показывает, что целевая модификация молекулы: введение фрагмента бензо[d][1,3]диоксола в 5-е положение изатина и алкильного заместителя к атому азота гетероциклического ядра приводит к стократному увеличению активности по сравнению с другими заместителями, в то же время, спиро-модификация по С(3) положению производных 5-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)изатина не приводит к заметному увеличению биологической активности соединений.
8. Изучена биологическая активность большого ряда производных 5-арил(гетарил)изатинов (более 70 соединений) по отношению к ММП-2, -8 и -13. Были найдены перспективные «хиты», обладающие микромолярной активностью. Идентификация производных 5-арил(гетарил)изатинов в качестве хемотипа, проявляющих ингибирующее действие по отношению к ММП, носит пионерский характер. Несмотря на то, что нам не удалось получить наномолярную активность и высокую селективность в ряду ММП, данный перспективный класс соединений открывает широкие возможности для их дальнейшей модификации и проведения медико-химических испытаний.

**Основное содержание работы изложено в публикациях:**

**Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.16. Медицинская химия:**

1. Mariangela Agamennone, Dmitry S. Belov, Antonio Laghezza, **Vladimir N. Ivanov**, Anton M. Novoselov, Ivan A. Andreev, Nina K. Ratmanova, Andrea Altieri, Paolo Tortorella, Alexander V. Kurkin. Fragment-Based Discovery of 5-Arylisatin-Based Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 2 and 13. // *ChemMedChem*. – 2016. – V.11. – P. 1892 - 1898. **JIF (WoS) 2022 = 3.4, 0.44 п.л., доля вклада 50%.**

2. **Vladimir N. Ivanov**, Mariangela Agamennone, Ildar R. Iusupov, Antonio Laghezza, Anton M. Novoselov, Ekaterina V. Manasovaa, Andrea Altieria, Paolo Tortorella, Alexander A. Shtila, Alexander V. Kurkin. Het(aryl)isatin to het(aryl)aminoindoline scaffold hopping: A route to selective inhibitors of matrix metalloproteinases. // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2022. – V. 15. – P. 103492. **JIF (WoS) 2022 = 6.0, 1.69 п.л., доля вклада 50%.**

3. Gorodnova Anastasia, **Ivanov Vladimir N.**, Kurkin Alexander V., Dmitrienko Artem. Crystal structure of 5-(3-methoxyphenyl)indoline-2,3-dione // *Powder Diffraction*. – 2023. – V. 38, № 3. – P. 201 - 206. **SJR (Scopus) 2022 = 0.62 (Q2), 0.38 п.л., доля вклада 50%.**