

ФИО соискателя Максименко Анна Сергеевна

Название диссертации ***СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ОРТО-ДИАРИЛИЗОКСАЗОЛОВ - АНАЛОГОВ ПРИРОДНОГО ЦИТОСТАТИКА КОМБРЕТАСТАТИНА***

Шифр специальности – 1.4.3 – органическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: [sci-secr@ioc.ac.ru](mailto:sci-secr@ioc.ac.ru)

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института <http://zioc.ru/>

07 октября 2022 года

Дата приема к защите

12 октября 2022 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

13 октября 2022 год

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИОХ РАН)**

На правах рукописи



**Максименко Анна Сергеевна**

**СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА  
ОРТО-ДИАРИЛИЗОКСАЗОЛОВ  
- АНАЛОГОВ ПРИРОДНОГО ЦИТОСТАТИКА КОМБРЕТАСТАТИНА**

1.4.3 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

**Москва 2022**

Работа выполнена в лаборатории медицинской химии №17

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ	<b>Семенов Виктор Владимирович</b> Доктор химических наук, заведующий лабораторией медицинской химии №17 ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН
ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ	<b>Зык Николай Васильевич</b> Доктор химических наук, профессор кафедры органической химии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.  <b>Ходак Александр Андреевич</b> Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории синтеза биологически активных гетероциклических соединений № 130 ФГБУН Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН)
ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Защита диссертации состоится «14» декабря 2022 г. в 11:00 часов на заседании  
Диссертационного совета 24.1.092.01 в Федеральном государственном бюджетном  
учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу:  
119991 Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им. Н.Д.  
Зелинского РАН и на официальном сайте Института <http://zioc.ru>

Автореферат разослан «20» октября 2022 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу:  
119991 Москва, Ленинский проспект, 47, ученому секретарю Диссертационного совета ИОХ  
РАН

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
24.1.092.01 ИОХ РАН  
доктор химических наук

Г.А. Газиева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

**Актуальность проблемы.** Разработка методов направленного синтеза гетероциклических соединений с заданной биологической активностью является актуальной научной проблемой как в медицинской, так и в органической химии. Несмотря на современные достижения в терапии рака, интерес к т.н. «малым молекулам» не ослабевает, поскольку именно такие препараты для пациентов значительно доступнее, по сравнению, например, со сложными природными молекулами, моноклональными антителами или радионуклидной терапией. Серьезные побочные эффекты большинства выпускаемых противораковых лекарств, а также возникновение форм рака с множественной лекарственной устойчивостью обуславливают необходимость создания новых препаратов. Современные требования к разрабатываемым препаратам включают в себя знание о мишени и механизме действия вещества, метаболизме, физико-химических параметрах, растворимости, доступности в производстве и многих других факторов.

Применяемые сегодня в терапии рака препараты на основе природных молекул, такие как Винбластин, Таксол и др. представляют собой алкалоиды сложного строения, механизм действия которых связан с нарушением динамики микротрубочек в клетке. Полный их синтез экономически нецелесообразен, а полусинтетические аналоги дороги в производстве. Многочисленные исследования посвящены структурно простому классу комбретастинов - высокоактивных антимитотиков, выделяемых из коры африканской ивы *Combretum Caffrum*, которые до сих пор находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Важным подходом при модификации комбретастина СА4 является замена двойной связи на гетероцикл, благодаря чему решается основная проблема – закрепление арильных колец в цис-ориентации, необходимой для проявления высокой активности. В качестве гетероцикла представляет интерес изоксазол, широко представленный в выпускаемых лекарственных препаратах.

**Цель работы.** Поиск новых классов противораковых соединений в ряду орто-замещенных диарилзоксиазолов, действующих на белок тубулин. Разработка нового эффективного способа синтеза полиметоксизамещенных 3,4-диарилзоксиазолов, промежуточных нитростильбенов и арилнитрометанов из доступного природного сырья. Изучение особенности протекания реакций и установление строения ранее неописанных соединений. Анализ противоопухолевых свойств и исследование связи структура – активность на модели зародышей морского ежа и раковых клетках человека выявление перспективных молекул для доклинических исследований.

**Научная новизна и практическая значимость.** Несмотря на широкое практическое применение и хорошо изученную химию изоксазолов, в литературе не описано удобных

региоселективных способов синтеза 3,4-диарилизоксазолов, незамещенных в 5м положении, которые, как предполагалось, могли проявить высокую антитубулиновую активность.

Разработан эффективный способ синтеза целевых противораковых структур класса 3,4-диарилизоксазола на основе арилнитрометанов и альдегидов, синтезированных из экстрактов и эфирных масел семян доступных отечественных сортов петрушки и укропа. Одновременно по родственной схеме был разработан удобный подход к синтезу 3,4-диарилизоксазол-5-карбоксамидов – потенциальных ингибиторов белка теплового шока-90, важной мишени в терапии рака. По результатам тестирования на зародышах морских ежей и 60 линиях раковых клеток человека (NCI-60) были выявлены несколько новых стабильных ингибиторов полимеризации тубулина, превышающих по активности комбретастин А-4. В НМИЦ радиологии им. П.А. Герцена продолжены исследования четырех лучших изомеров ряда 4-метоксифенил – 3,4,5-триметоксифенил замещенных изоксазолов, из которых по комплексу свойств молекула **18d** выбрана на доклинические испытания. Разработана ее препаративная водорастворимая форма на основе плюроника F-127 - триблок-сополимера, состоящего из гидрофобных полипропиленоксидных и гидрофильных полиэтиленоксидных звеньев. По предварительным данным, **18d** при однократной дозе 10мг/кг на четвертые сутки после введения ингибирует рост саркомы мышей S37 на 50%. В настоящее время эта препаративная форма исследуется на мышах с привитыми опухолями рака простаты РС-3 и рака легкого А-549.

Разработаны эффективные препаративные способы получения исходных синтетических интермедиатов - арилнитрометанов и  $\alpha$ -нитростильбенов как с акцепторными, так и с донорными, в частности, полиалкоксигбензолными фрагментами. Ряд ранее недоступных полиметокси-замещенных арилнитрометанов был получен по реакции Мейера, в которой были впервые использованы соответствующие бензилхлориды. Такие бензилхлориды могут быть синтезированы в больших количествах на основе легкодоступных отечественных экстрактов растений. Выходы  $\alpha$ -нитростильбенов в ряде случаев увеличены в 2-3 раза по сравнению с классическими методиками. Практическая значимость полученных результатов обусловлена также широким применением как арилнитрометанов, так и  $\alpha$ -нитростильбенов в синтезе различных классов органических соединений и медицинских препаратов.

**Публикации.** По результатам проведенных исследований опубликовано 9 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 9 тезисов докладов.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены в 5 устных докладах на VII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Москва, 2021); на Первой всероссийской

школе для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021 (Новосибирск, 2021); на Всероссийской научной конференции Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней Школа-конференция молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность» (Красновидово, 2020); на V Междисциплинарной конференции «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Судак, 2019); на VIII Молодежной конференции ИОХ РАН (Москва, 2019)

**Структура и объем работы.** Материал диссертации изложен на 190 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Библиографический список состоит из 263 наименований.

**Личный вклад соискателя.** Состоит в поиске, анализе и обобщении научной информации по тематике исследования, выполнении описанных в диссертации химических экспериментов, выделении, очистке образующихся соединений, доказательстве их строения с помощью физико-химических и спектральных методов, а также в сопоставлении и интерпретации результатов проведенных биологических испытаний *in vitro* и *in vivo*. Соискатель осуществлял апробацию работ на конференциях и выполнял подготовку публикаций по выполненным исследованиям.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Комбретатстатин А4 (СА4) является природным ингибитором полимеризации тубулина, и проходит клинические испытания. в качестве противоопухолевого лекарственного средства. Однако его практическое применение сдерживается изомеризацией активной *Z*-формы в малоактивную *E*-форму на свету или в живом организме. Гетероциклы с орто-расположением арильных заместителей, в которых невозможна изомеризация, рассматривались в литературе, как биоизостерные эквиваленты СА4, и проявили высокую антитубулиновую активность.

Перспективными аналогами СА4 являются малоисследованные 3,4-диарилзоксиазолы, удобный способ синтеза которых не был разработан. Необходимо было разработать эффективный способ получения из доступного сырья, чтобы детально исследовать их биологические свойства. Была предложена следующая ретросинтетическая схема (Схема 1) на основе бензальдегидов и арилнитрометанов. Необходимые полиалкоксибензальдегиды синтезированы из СО<sub>2</sub>-экстрактов семян доступных отечественных сортов петрушки и укропа в литровых количествах. Однако известные способы получения арилнитрометанов, а также промежуточных нитростильбенов, были плохо воспроизводимы при масштабировании и отличались низкими выходами, поэтому

важнейшей задачей являлась также разработка методов получения как арилнитрометанов, так и нитrostильбенов

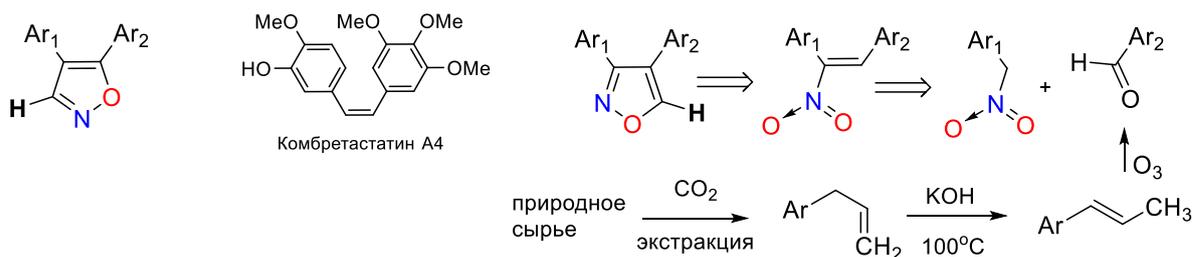


Схема 1. Структурные формулы комбретастина А4 (СА4), 3- и 5-незамещенных изоксазолов; ретросинтетическая схема получения 5-незамещенных изоксазолов.

Содержание диссертационной работы представлено в шести разделах (Схема 2). Первые два посвящены получению основных полупродуктов – арилнитрометанов и нитrostильбенов. В разделе 3 представлен способ получения изоксазолин-N-оксидов, а в 4м - реакции их рециклизации, приводящие к 5-карбоксамидоизоксазолам и оксазиномам (4.1), 5-незамещенным изоксазолам и изоксазол-5-карбоновым кислотам (4.2), к эфирам изоксазол-5-карбоновых кислот (4.3). В разделе 5 представлен синтез 3-незамещенных изоксазолов, а в 6м - данные биологических испытаний и исследований связи структура-активность.

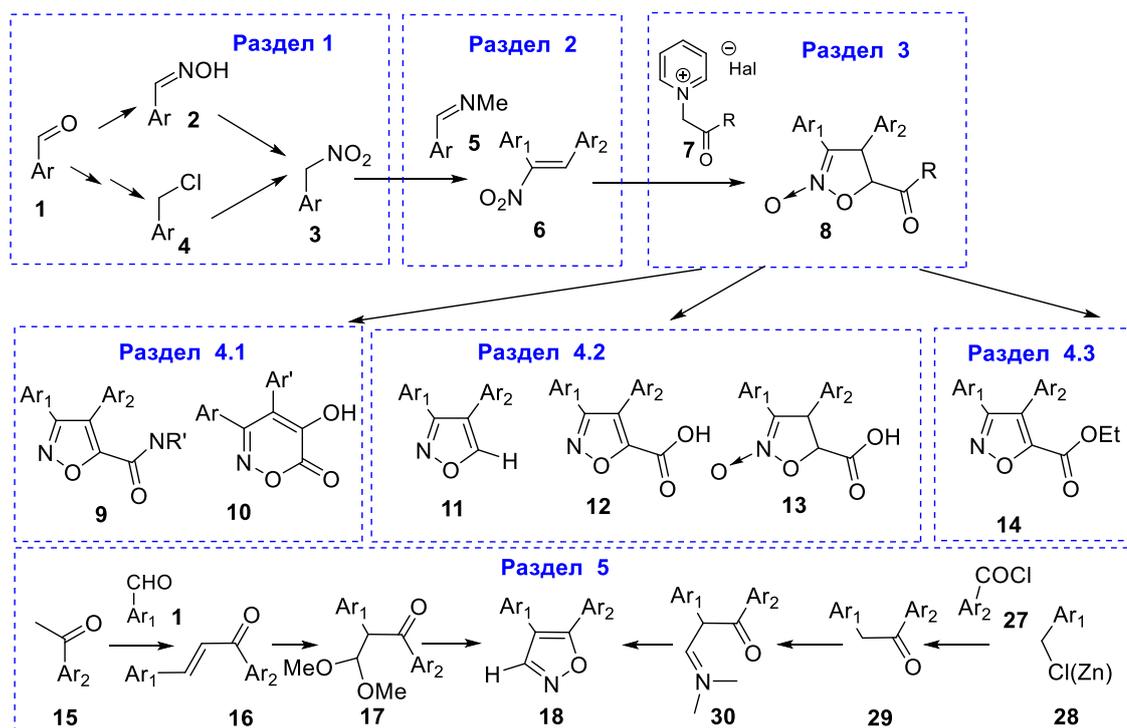


Схема 2. Общая структура работы.

### 1.1 Получение арилнитрометанов окислением оксимов.

В ходе нашей работы установлено, что литературный способ по окислению оксимов бензальдегидов при 55 – 60 °С в уксусной кислоте действием пербората натрия приводит к получению арилнитрометанов **3** с невысокими и непостоянными выходами 6- 46% (Схема 3, Табл. 1), что предположительно связано с разложением пербората натрия и наличием

заводских примесей. При окислении оксимов важно строго соблюдать условия реакции и температурный режим, поскольку при температурах выше 90 °С протекает образование альдегидов или карбоновых кислот.

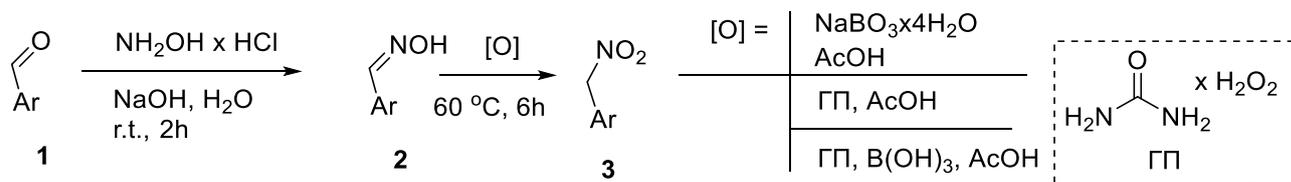


Схема 3. Синтез арилнитрометанов **3** окислением оксимов бензальдегидов.

Поэтому был исследован другой окислитель – Гидроперит (ГП) - комплекс перекиси водорода и мочевины, однако выходы **3** оказались еще ниже и образовывались трудноразделимые смеси (Таблица 1, **3а**). Наилучшие результаты получены при использовании смеси ГП - борная кислота, где выходы существенно увеличились относительно реакции с чистым перборатом.

Таблица 1. Условия и выходы реакции окисления оксимов перборатом натрия (ПБ) и гидроперитом с борной кислотой (ГП+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

	Ar	Выход <b>2</b> , %	Выход <b>3</b> , %		
			Условия	[O] = ПБ	[O]=ГП+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
<b>a</b>	Ph	91	60 °С, 6 ч	46	21 <sup>a</sup> ; 57
			60 °С, 8 ч	14 <sup>b</sup>	66
<b>b</b>	4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	92	60 °С, 6 ч	43	45
			55 °С, 10 ч	-- <sup>c</sup>	55
<b>c</b>	3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	86	60 °С, 6 ч	6 <sup>b</sup>	29
<b>d</b>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	84	60 °С, 6 ч	16; 0 <sup>d</sup>	26
<b>e</b>	3-NO <sub>2</sub> -4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -	94	60 °С, 6 ч	10 <sup>e</sup>	41
<b>f</b>	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	84	60 °С, 6 ч	0	-- <sup>c</sup>
<b>g</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	91	60 °С, 6 ч	2 <sup>d</sup> ; 32-43 <sup>f</sup>	35
<b>h</b>	4-EtO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	87	50 °С, 6 ч	39	13
<b>i</b>	3,4-(MeO) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -	92	55 °С, 9 ч	-- <sup>c</sup>	17
<b>j</b>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> -	99 <sup>g</sup>	55 °С, 9 ч	-- <sup>c</sup>	2
<b>k</b>	2,5-(MeO) <sub>2</sub> -3,4-(OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H-	90 <sup>g</sup>	55 °С, 9 ч	-- <sup>c</sup>	5
<b>l</b>	Пиридин-4-ил	74	60 °С, 6 ч	-- <sup>c</sup>	0

<sup>a</sup> – был использован гидроперит без борной кислоты; <sup>b</sup> – T = 40 °С; <sup>c</sup> – не определяли в данной работе; <sup>d</sup> – для Z-оксима; <sup>e</sup> – t = 10 часов; <sup>f</sup> – наблюдалось непостоянство выхода при воспроизведении методики; <sup>g</sup> – был использован (NH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, методика описана в соответствующем разделе экспериментальной части.

Оптимизация условий с использованием в качестве окислителя системы гидроперит-борная кислота позволило синтезировать ранее недоступные арилнитрометаны с полиалкоксифрагментами, хотя и с невысокими выходами вследствие легкости окисления бензольного кольца с полиметоксифрагментами. При этом удалось вдвое снизить количество уксусной кислоты.

Исходные оксимы **2**, полученные по стандартной методике в щелочных условиях, выделены в виде E-изомеров. В реакции окисления были также исследованы Z-изомеры **2d** и

**2g**, полученные изомеризацией *E*-оксимов в сильноокислой среде. Строение оксимов (*Z/E*-изомерия) – контролировалось с помощью <sup>1</sup>H ЯМР в ДМСО-*d*<sub>6</sub>, (но не в CDCl<sub>3</sub>), где все сигналы оксимных групп (СН и ОН) хорошо разрешены. Неожиданно, окисление обоих оксимов **Z-2d**, **Z-2g** не привело к образованию АНМ **3d** и **3g**. Следовательно, для достижения максимального выхода АНМ необходимо контролировать отсутствие *Z*-формы оксима. Поскольку методом окисления оксимов не удалось синтезировать необходимые полиметокси-замещенные АНМ, был изучен и другой способ их получения.

## 1.2 Получение арилнитрометанов нуклеофильным замещением.

Нуклеофильное замещение нитритом серебра в бензилгалогенидах (Br, I) известно как реакция Мейера, а нитритом натрия – как ее модификация – реакция Корнблюма. За счет амбидентности нитрит-иона в реакции образуется два продукта – АНМ и соответствующий нитрит. Известно, что в реакции Мейера при увеличении донорных свойств арильного фрагмента, выход АНМ падает (с 76% для 4-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> до 26% для 4-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>), а выход соответствующего нитрита растет (55% для 4-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>ONO). Поэтому считалось, что с увеличением донорных свойств бензольного кольца выход нитрита **19** будет возрастать, а выход полиалкокси-арилнитрометанов – падать.

Тем не менее, по реакции Мейера в случае полиалкоксибензилхлоридов, удалось впервые получить ранее недоступные полиметоксизамещенные АНМ **3** наряду с соответствующими нитритами **19**. Смесь этих двух веществ трудноразделима хроматографически, поэтому была предложена методика обработки смеси раствором мочевины в метаноле. В ходе реакции происходит гидролиз нитрита **19** до спирта **20**, а смесь АНМ **3** и спирта **20** имеет значительную разницу в полярности и, легко разделяется. При необходимости спирт **20** можно выделить для повторного использования в синтезе.

Исходные спирты и хлориды получены почти с количественными выходами по стандартным методикам. Бензилхлориды с электроно-акцепторными группами не вступали в реакцию, поэтому, реакцией Финкельштейна почти количественно получены соответствующие йодиды **21d,e**, которые далее превращали в АНМ с хорошими выходами (Таблица 2).

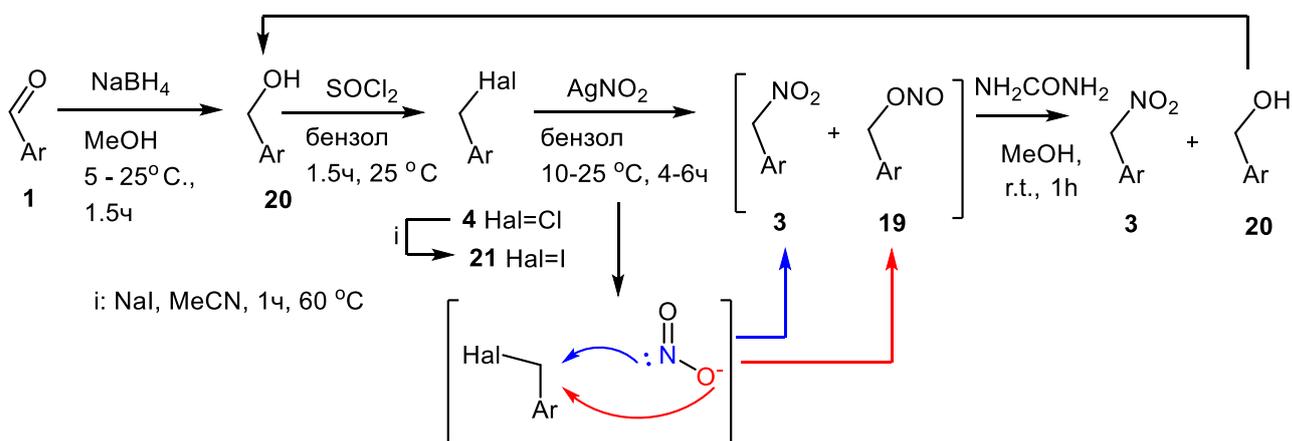


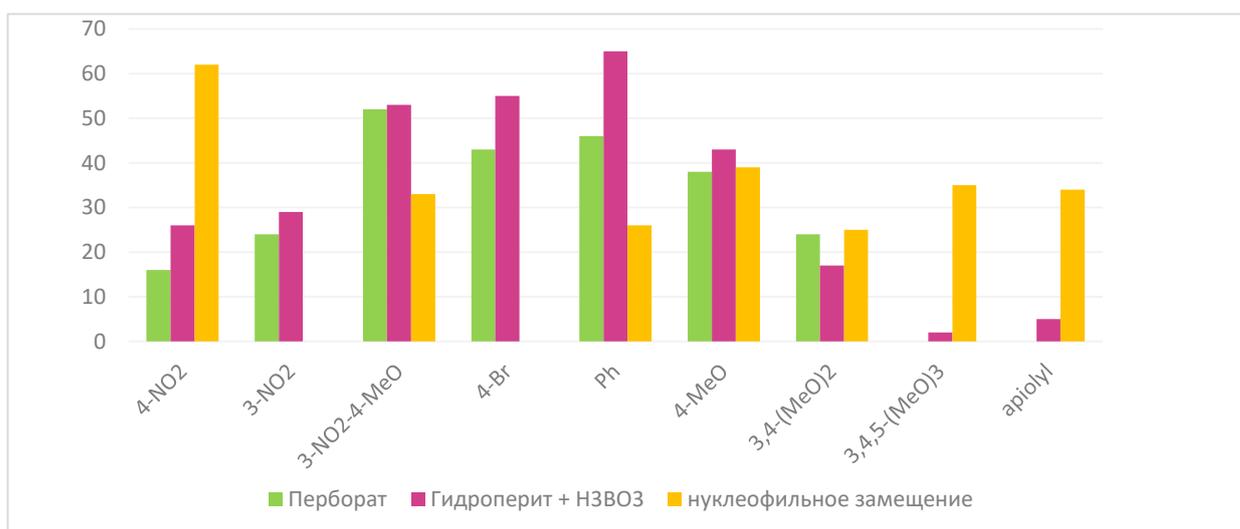
Схема 4. Синтез арилнитрометанов **3** нуклеофильным замещением в бензилгалогенидах.

Таблица 2. Оптимизация условий реакции получения АНМ **3** по реакции Мейера.

№	ArCH <sub>2</sub> Hal	Реагенты, растворитель	Условия	Конверсия, %	NO <sub>2</sub> : ONO <sup>a</sup>	ArCH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	Выход <b>3</b> , % <sup>c</sup>
1	<b>4a</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 5 h	0.2	-- <sup>b</sup>	<b>3a</b>	-- <sup>b</sup>
2	<b>4a</b>	AgNO <sub>2</sub> , --	25 °C, 4 h	99	29:71 <sup>c</sup>		(26)
3	<b>4d</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 5 h	0	-- <sup>b</sup>	<b>3d</b>	-- <sup>b</sup>
4	<b>4d</b>	NaNO <sub>2</sub> , DMSO-DMF(3:1)	0 °C, 4 h	~0.5	-- <sup>b</sup>		-- <sup>b</sup>
5	<b>21d</b>	AgNO <sub>2</sub> , MeCN	10 °C, 4 h	100	11:89		10
6	<b>21d</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 3 h	96	80:20		75(62)
7	<b>21d</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH, urea	10 °C, 8 h	95	69:31		64
8	<b>21d</b>	NaNO <sub>2</sub> , DMSO-DMF(3:1)	0 °C, 0.5 h	100	24:76		23
9	<b>4e</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	25 °C, 4 h	0.5	-- <sup>b</sup>	<b>3e</b>	-- <sup>b</sup>
10	<b>21e</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 4 h	33	51:49		16
11	<b>21e</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	35 °C, 4 h	95	40:60		37(33)
12	<b>4g</b>	AgNO <sub>2</sub> , Et <sub>2</sub> O	-40 °C, 2 h	1	-- <sup>b</sup>	<b>3g</b>	-- <sup>b</sup>
13	<b>4g</b>	AgNO <sub>2</sub> , Et <sub>2</sub> O	0 °C, 2.5 h	99	39:61		37
14	<b>4g</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhMe	0 °C, 3 h	100	42:58		41(39)
15	<b>4i</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 4 h	99	40:60	<b>3i</b>	38(25)
16	<b>4j</b>	AgNO <sub>2</sub> , Et <sub>2</sub> O	-20 °C, 4 h	0	-- <sup>b</sup>	<b>3j</b>	-- <sup>b</sup>
17	<b>4j</b>	AgNO <sub>2</sub> , Et <sub>2</sub> O	5 °C, 3 h	88	39:61		33
18	<b>4j</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	15 °C, 3 h	99	41:59		40(35)
19	<b>4k</b>	AgNO <sub>2</sub> , PhH	10 °C, 2 h	98	49:51	<b>3k</b>	46(34)

<sup>a</sup> – соотношение измеренное на основании <sup>1</sup>H ЯМР, за «ONO» принималось суммарное количество нитрита и спирта; <sup>b</sup> – не исследовалось в данной работе; <sup>c</sup> – выход измерен на основании <sup>1</sup>H ЯМР, в скобках приведен выход на выделенное вещество

Таким образом получены ранее неописанные и труднодоступные арилнитрометаны с донорными полиалкококси заместителями с приемлемыми выходами. Стоит отметить, что два используемых способа получения АНМ являются, по сути, взаимодополняемыми. Как видно из гистограммы, при получении АНМ с высоко-донорными или сильными акцепторными заместителями предпочтительнее использовать метод нуклеофильного замещения в бензилхлоридах и бензилиодидах соответственно. Остальные АНМ удобнее получать окислением оксимов.



Гистограмма 1. Сравнение выходов арилнитрометанов **3** в разных способах получения

## 2. Получение нитростильбенов

Синтез  $\alpha$ -нитростильбенов осуществлялся конденсацией арилнитрометанов и альдегидов по реакции Кневенагеля (Схема 5). В случае некоторых алкокси-замещенных производных (напр. **бе**, **h**, **п**) выходы продуктов были низкими, поэтому исследовано использование соответствующих оснований Шиффа вместо альдегидов. Показано, что использование N-фенильного основания Шиффа не приводит к нитростильбенам, N-бутильное основание Шиффа приводит к лучшим выходам продукта, чем при использовании альдегида, однако образующийся ацетат бутиламина, растворимый в органических растворителях, осложняет выделение и загрязняет продукт. Использование N-метильных оснований Шиффа позволило значительно увеличить выход нитростильбенов, которые легко выделялись кристаллизацией в чистом виде без использования хроматографии, поскольку образующийся ацетат метиламина хорошо растворим в воде и легко удаляется.

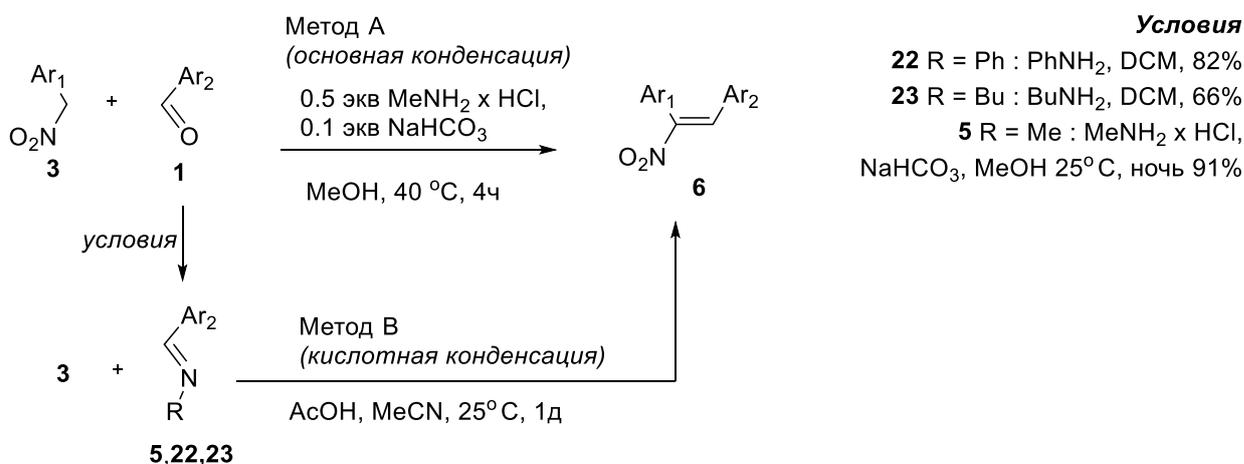


Схема 5. Получение  $\alpha$ -нитростильбенов методами А и В.

Таблица 3. Сравнение выходов  $\alpha$ -нитростильбенов методами А и В

Ar <sub>1</sub>	Ar <sub>2</sub>	R	Выход 5, %	Про дукт <b>6</b>	Метод А Выход <b>6</b> , %	Метод В Выход <b>6</b> , %
Ph	4-MeO-3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	Ph	82*	<b>6a</b>	21	0
Ph	4-MeO-3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	Bu	66**			43
Ph	4-MeO-3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	Me	90			74
Ph	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	93	<b>6b</b>		65
Ph	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	34	<b>6c</b>	0	--
Ph	4-EtO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	86	<b>6d</b>	--	65
Ph	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	93	<b>6e</b>	34	74
Ph	3-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	89	<b>6f</b>	--	61
Ph	2-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99	<b>6g</b>	67	70
Ph	3,4-(MeO) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	Me	87	<b>6h</b>	32	93
Ph	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	Me	--	<b>6i</b>	68	--
Ph	3,5-(MeO) <sub>2</sub> -4-HOC <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	Me	78	<b>6j</b>	--	0
Ph	2,5-(MeO) <sub>2</sub> -3,4-(OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H	Me	92	<b>6k</b>	66	78
Ph	2,3-(MeO) <sub>2</sub> -4,5-(OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H	Me	75	<b>6l</b>	47	93
4-EtO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	Me	96	<b>6m</b>	--	79
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	Me	96	<b>6n</b>	32	73
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	100	<b>6o</b>	57	66
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	88	<b>6p</b>	--	54
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	88	<b>6q</b>	--	62
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	N-Me-пиразол-4-ил	Me	60	<b>6r</b>	44	75
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Тиофен-2-ил	Me	86	<b>6s</b>	63	74
4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	Me	85	<b>6t</b>	45	71
4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	93	<b>6u</b>	--	77
4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,5-(MeO) <sub>2</sub> -3,4-(OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H	Me	92	<b>6v</b>	18	--
4-MeO-3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	93	<b>6w</b>	--	50
3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	93	<b>6x</b>	--	75

\*- вещество №22, \*\*- вещество №23

Полученные  $\alpha$ -нитростильбены находятся в *E*-конфигурации, что было доказано с помощью РСА на примерах **6k** и **6s**.

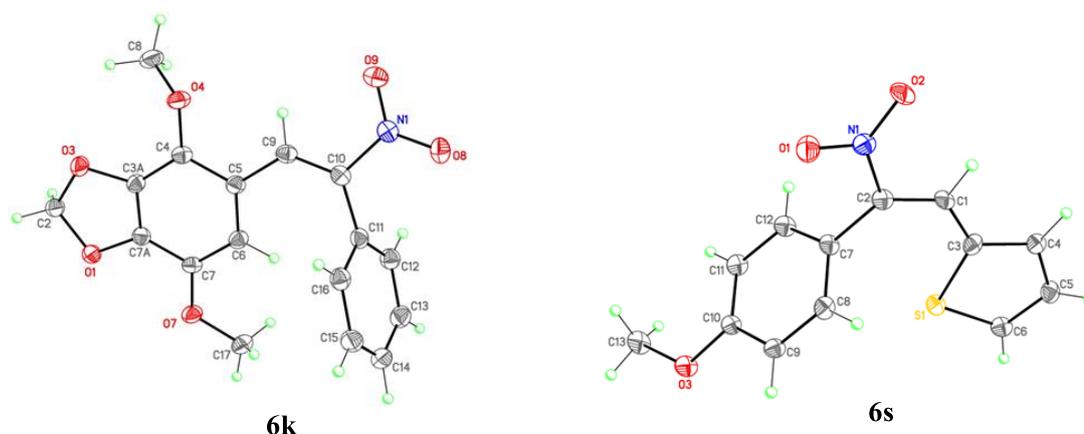


Рис. 1. Молекулярные структуры *E*-2-(2,5-диметокси-3,4-метилендиоокси)-1-нитро-1-фенилэтилена **6k** и *E*-2-(тиофен-2-ил)-1-нитро-1-(4-метоксифенил)этилена **6s**, полученные на основании данных РСА, 50% эллипсоиды.

При УФ облучении раствора **E-6k** в  $CCl_4$  происходила изомеризация в *Z*-изомер **Z-6k**, который был выделен и охарактеризован. Химсдвиги винильных протонов двух изомеров отличаются в среднем на 1,5 мд, что позволяет приписать *E*-конфигурацию всем полученным  $\alpha$ -нитростильбенам.

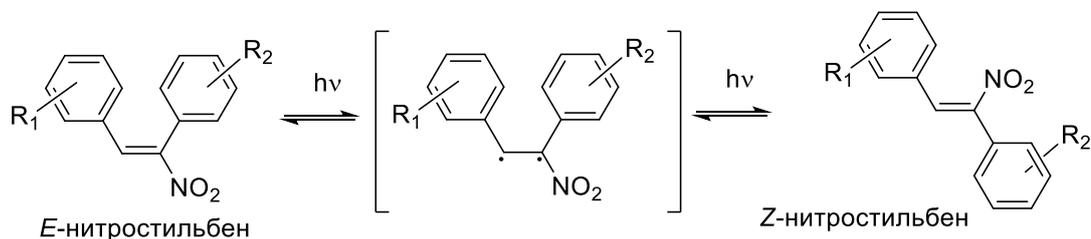


Схема 6. Цис-транс изомеризация стильбенов под действием излучения.

Таким образом, создан удобный метод получения  $\alpha$ -нитростильбенов из доступных исходных соединений, обеспечивающий высокие и стабильные выходы порядка 70%. Данные соединения, которые являются не только основными полупродуктами в синтезе целевых изоксазолов, но и нитрозамещенными аналогами комбретастинов, причем именно в нужной цис-конфигурации арильных заместителей, представляют самостоятельный интерес для биологических исследований

### 3. Получение 3,4-диарил-изоксазолин-N-оксидов

В соответствии с ретросинтетической схемой 1 для получения промежуточных 3,4-диарилизоксазолин-N-оксидов **8** были синтезированы разнообразные пиридины **7**, кватернизованные галоидуксусными эфирами и амидами (схема 7).

В случае карбэтоксипроизводных хлорид **7g** был очень гигроскопичен, поэтому использовался бромид **7h**, который не разлагался при хранении в течении года.

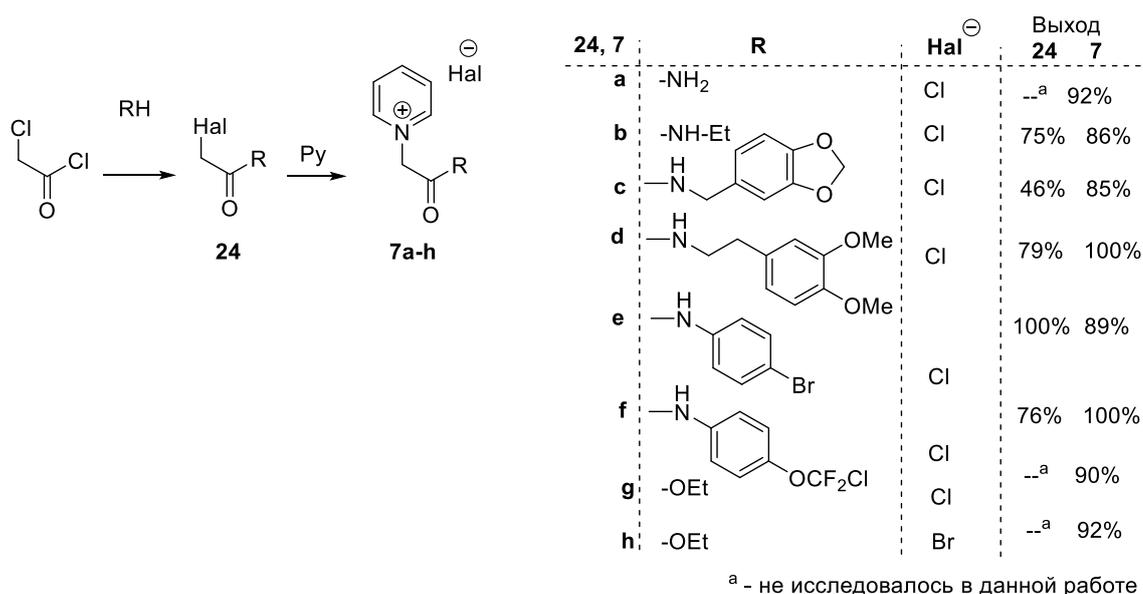


Схема 7. Синтез кватернизованных пиридинов **7**.

Реакцией нитrostильбенов **6** и кватернизованных пиридинов **7** под действием триэтиламина был получен широкий ряд 3,4-диарил-изоксазолин-N-оксидов **8** с хорошими выходами. Изоксазолин-N-оксиды **8** с электроно-акцепторными группами в арильных заместителях выделить удалось только при пониженной температуре (0 - +10 °C) и сокращении времени реакции (1ч). Такие условия позволили значительно поднять выход для ряда N-оксидов **8** и облегчить их кристаллизацию.

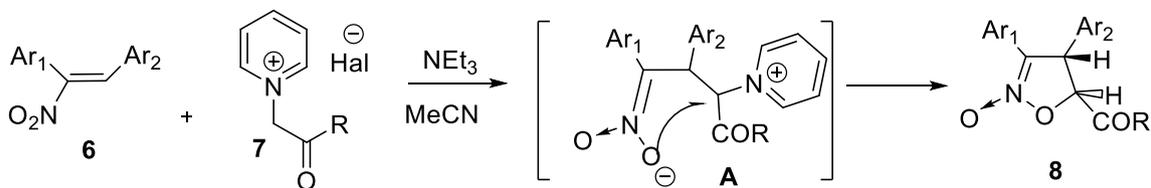


Схема 8. Механизм образования 3,4-диарил-изоксазолин-N-оксидов.

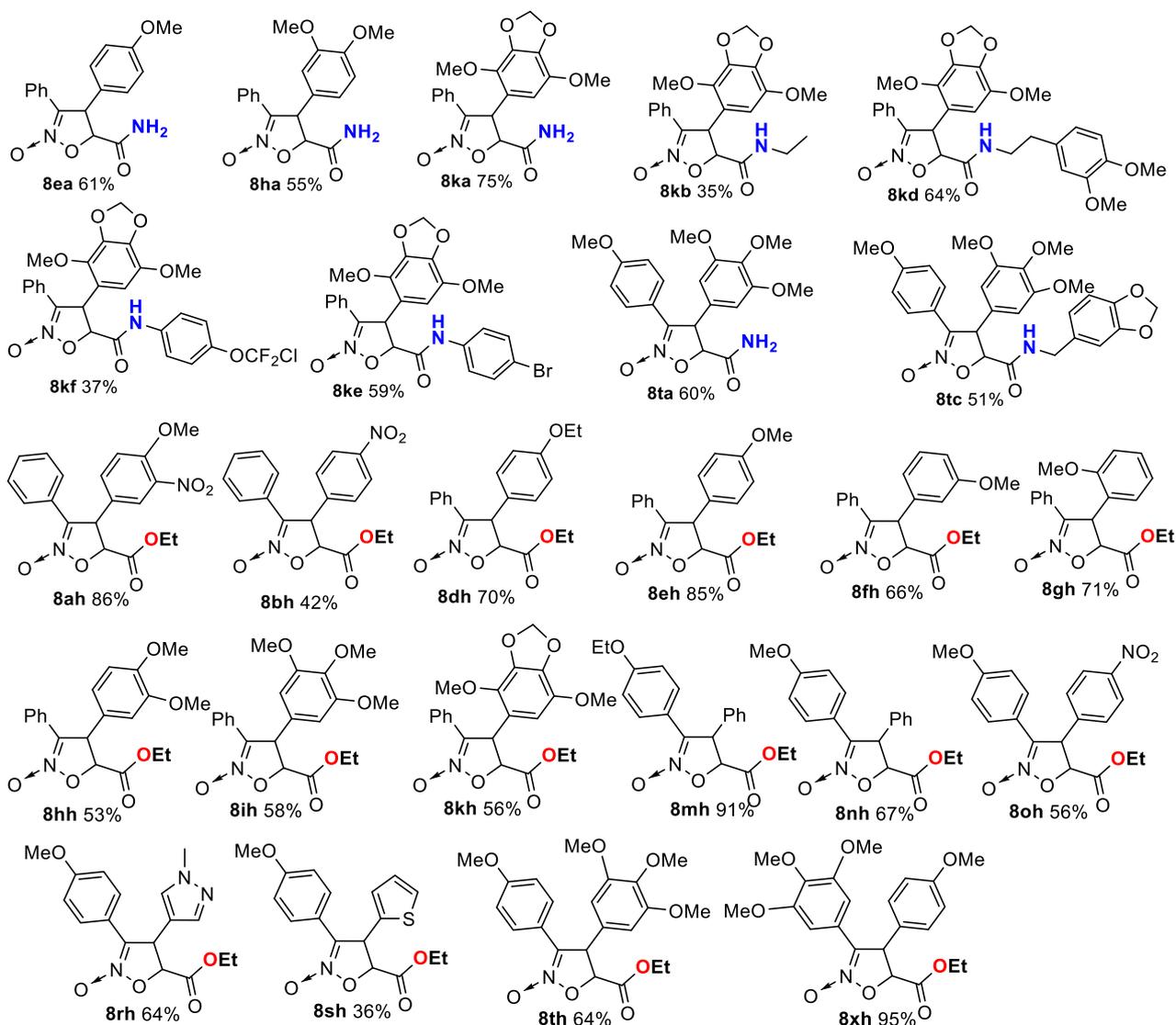


Рис. 2. Структуры и выходы синтезированных 3,4-диарил-5-карбоксамидо-изоксазолин-N-оксидов и 3,4-диарил-5-карбоэтокси-изоксазолин-N-оксидов

## 4. Рециклизации изоксазолин-N-оксидов.

### 4.1. Рециклизация 3,4-диарил-5-карбоксамидо-изоксазолин-N-оксидов

Орто-диарилизоксазолкарбоксамиды представляют интерес в качестве аналогов соединения NVP-AUY-922 – ингибитора белка теплового шока-90, потенциального противоракового препарата. При действии основания на 5-карбоксамидоизоксазолин-N-оксид **8ka** была получена смесь продуктов **25**, **12k**, **11k**, содержащая в том числе и целевой изоксазол **9ka**. Модификацией условий было установлено, что использование небольшого избытка ДБУ (1,8-Диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) является оптимальным для получения изоксазолов **9**, и побочные продукты не образуются.

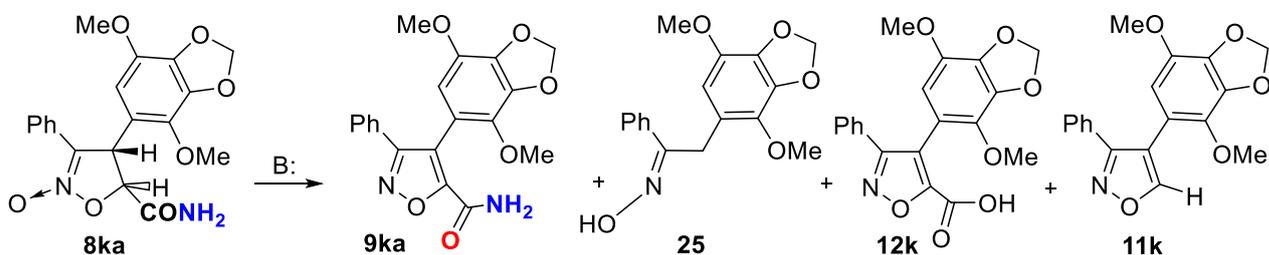
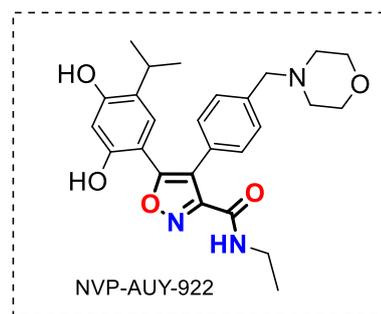


Схема 9. Действие основания на 4-(2,5-диметокси-3,4-метилендиоксифенил)-3-фенил-5-карбоксамидо-изоксазолин-N-оксид **8ka**.

Таблица 4. Оптимизация условий получения 3,4-диарил-5-карбоксамидоизоксазолов **9**

№	Растворитель	Условия	конверсия, %	Выход, % по <sup>1</sup> H ЯМР			
				<b>9ka</b>	<b>25</b>	<b>12k</b>	<b>11k</b>
1	EtOH/H <sub>2</sub> O	2% NaOH/EtOH; 30°C; 5 ч	100	15	11	20	18
2	EtOH/H <sub>2</sub> O	2% NaOH/EtOH; 60°C; 5 ч	100	18	16	31	12
3	EtOH	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , EtOH; 60°C; 5ч	87	9	25	3	7
4	MeCN	NEt <sub>3</sub> ; 70°C; 18ч	2	-	-	2	-
5	MeCN	ДБУ 0,2 экв.; 22°C; 24ч	20	84	-	-	-
6	MeCN	ДБУ 1,2 экв.; 22°C; 24ч	100	82	-	-	-

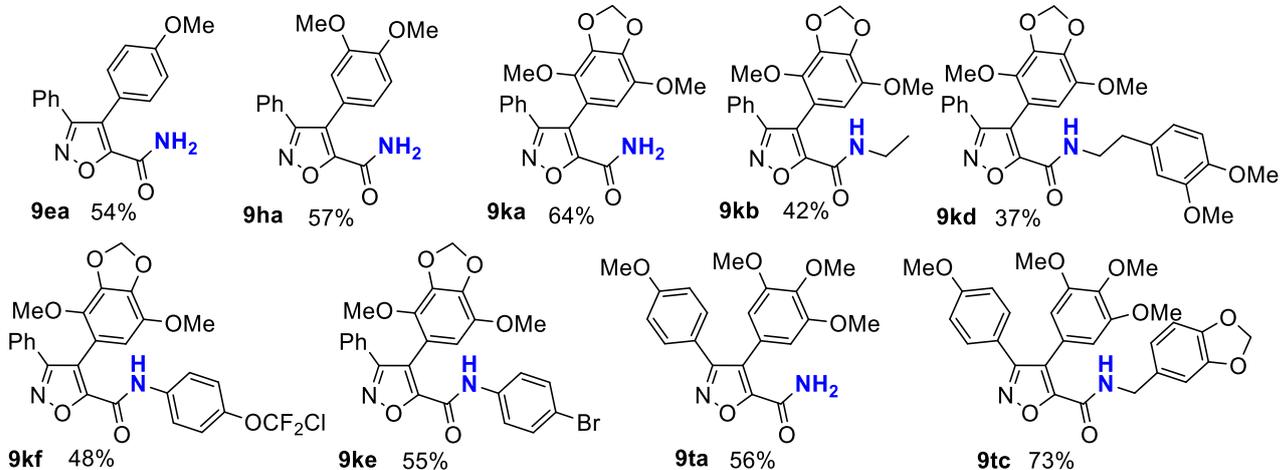


Рис. 3. Структуры и выходы синтезированных 3,4-диарил-изоксазол-5-карбоксамидов **9**.

Однако, при рециклизации в найденных условиях изоксазолин-N-оксидов с этоксикарбонильной группой, соответствующие изоксазолы **14** не были обнаружены, а выделен неожиданный продукт рециклизации - оксазиносон **10k**. Структура **10k** подтверждено спектральными методами и данными РСА.

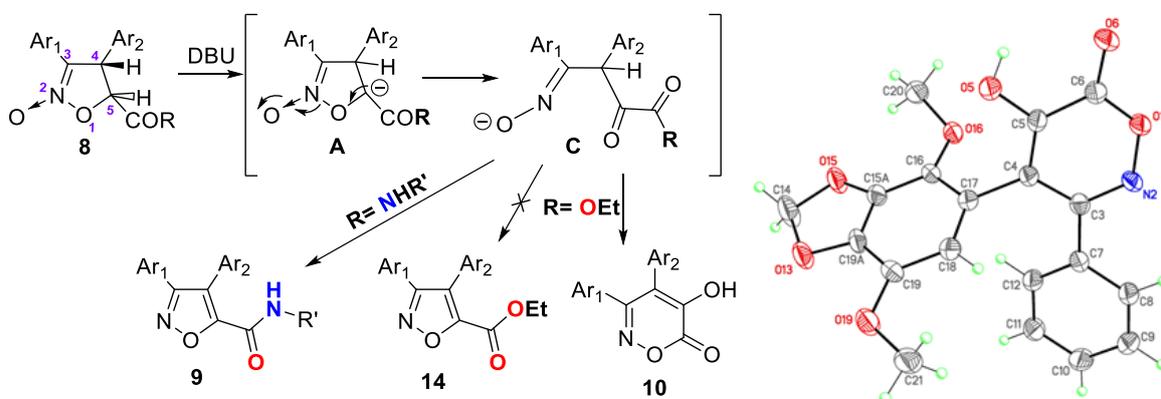
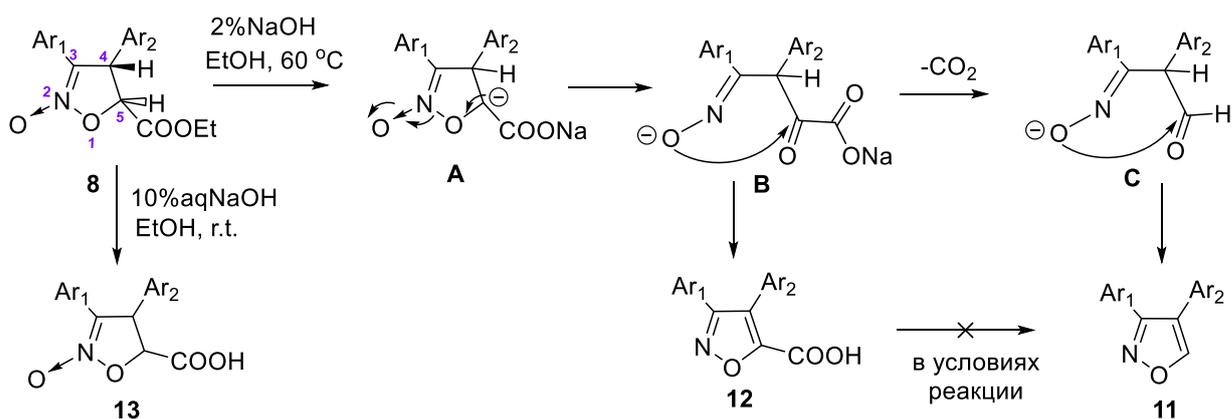


Схема 10. Синтез и структура оксазиносона **10k**, 50% эллипсоиды.

#### 4.2. Получение 3,4-диарил-5-незамещенных-изоксазолов и 3,4-диарилизоксазол-5-карбоновых кислот

Действие водного раствора щелочи на 5-карбэтокси изоксазолин-N-оксиды приводит к кислотам **13**, однако при использовании этанольного раствора щелочи при нагревании (60 °C) наблюдается образование 5-незамещенных изоксазолов **11** в качестве основных продуктов реакции. Так же при подкислении водной фазы в реакции были выделены изоксазол-5-карбоновые кислоты **12** с небольшими выходами. Изоксазолы **11** не образуются путем декарбоксилирования кислот **12**, поскольку процесс декарбоксилирования требует жестких условий (200 °C) и не может происходить в условиях реакции (60 °C). Формально, предшественником кислоты **12** является продукт раскрытия изоксазолинового цикла - интермедиат **B**, который далее декарбоксилируется до **C** и замыкается в незамещенный целевой изоксазол **11**. В спектрах реакционных смесей методом ПМР удается зафиксировать сигналы **C**. Структуры всех соединений надежно установлены совокупностью спектральных данных, а изоксазолов **11t, x** в том числе и с помощью РСА (Схема 11).



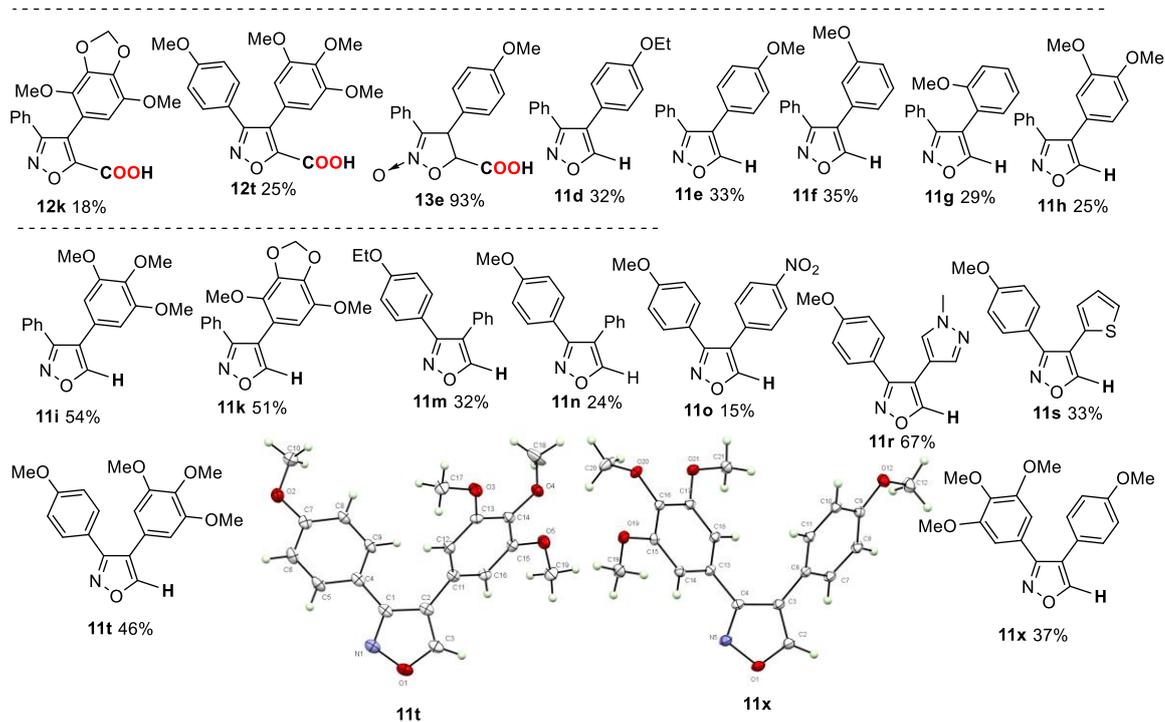


Схема 11. Структуры и выходы синтезированных кислот **12** и **13**, и 5-незамещенных изоксазолов **11**, Структуры изомерных 3-(4-метоксифенил)-4-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазола **11t** и 4-(4-метоксифенил)-3-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазола **11x**, 50% эллипсоиды

#### 4.3. Региоселективный способ получения эфиров изоксазол-5-карбоновых кислот

Для  $\alpha$ -нитростильбенов содержащих электроноакцепторные группы в арильных заместителях в стандартных условиях реакции ( $\text{NEt}_3$ , MeCN, 40 °C, 4ч) не были зафиксированы изоксазолин-N-оксиды **8**, а выделены только этиловые эфиры изоксазол-5-карбоновых кислот **14**, которые почти количественно могут быть омылены в соответствующие кислоты **12**.

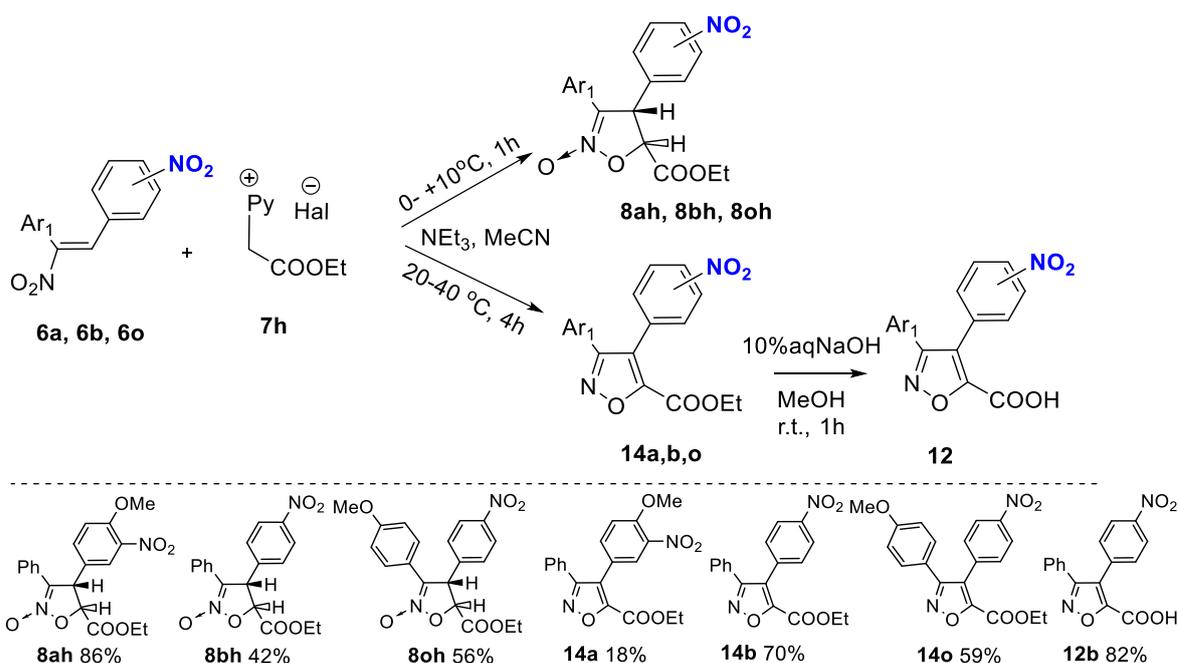


Схема 12. Синтез нитроарил-изоксазолинов **8**, изоксазол-5-карбоновых кислот **12** и их эфиров **14**

Поскольку при пониженной температуре и сокращенном времени реакции удалось выделить изоксазолин-N-оксиды **8**, то они, вероятно, являются полупродуктами в реакции образования эфиров **14**. Таким образом, образование изоксазолов **14** может происходить в одну стадию из нитростильбенов и кватернизованных пиридинов. Омыление эфиров проходит с высокими выходами и позволяет получать кислоты, которые представляют интерес в качестве нестероидных противовоспалительных соединений. Таким образом, найден путь селективного получения орто-диарилизоксазол-5-карбоновых кислот.

## 5. Синтез 3-незамещенных изоксазолов

С целью дальнейшего сравнения биологической активности 3,4-диарилизоксазолов **11** и изомерных 4,5-диарилизоксазолов **18**, синтез последних был осуществлен по модифицированным литературным методикам. Монометокси-замещенные изоксазолы получены путем изомеризации углеродного скелета халконов **16a,b** (1,2-сдвиг) в ацетали **17** под действием  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  и дальнейшей конденсации с гидроксиламином

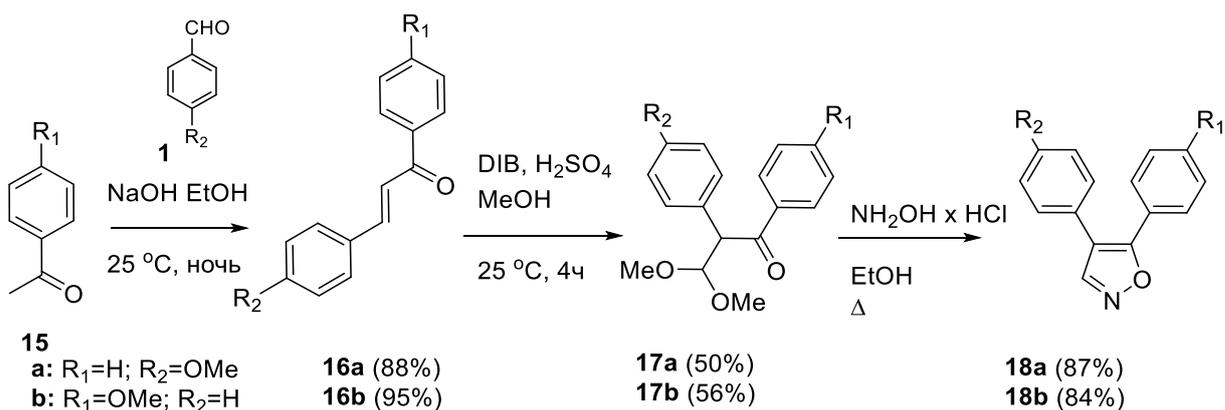


Схема 13. Синтез монометокси-замещенных 4,5-диарилизоксазолов **18a,b**.

Для 4,5-диарилизоксазолов, содержащих полиметокси-заместители была выбрана другая методика, разработанная в лаб №13 ИОХ РАН Демчуком Д.В. Цинковое производное **28**, полученное из бензилхлоридов **4**, использовали для литий-купратного метода образования С-С связи в этаноне **29**.

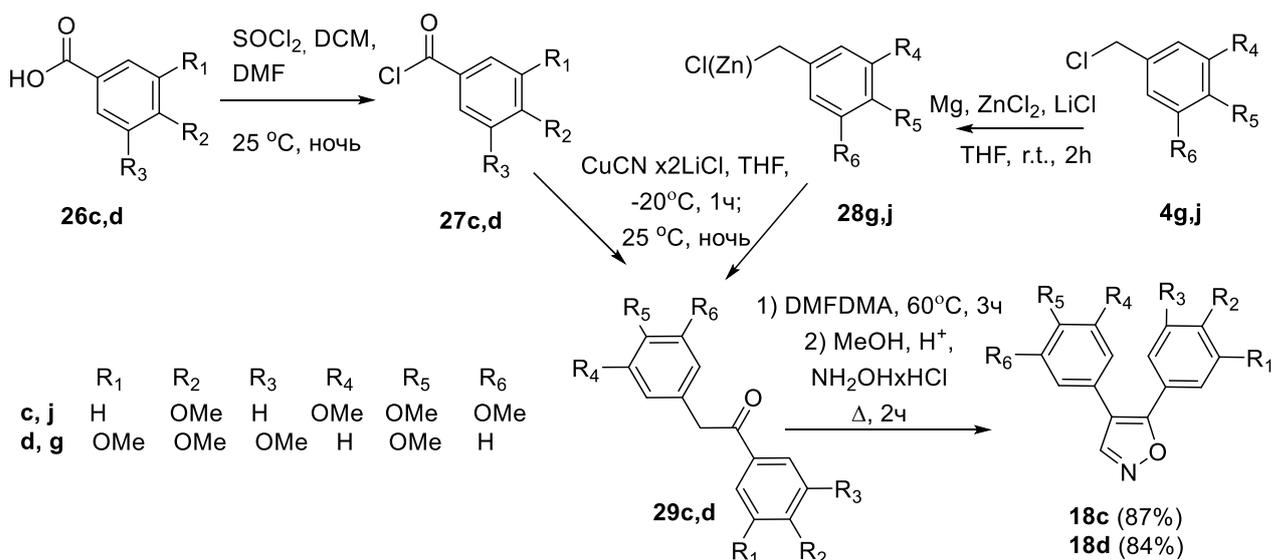


Схема 14. Синтез полиметокси-замещенных 4,5-диарилизоксазолов **18c,d**.

Действие ДМА ДМФ на этанон **29** приводит к образованию енамина с количественным выходом. Кипячением енамина с гидроксиламином в кислой среде получены целевые 3-незамещенные изоксазолы **18c** и **18d** с высокими выходами.

## 6. Биологические испытания и исследования связи структура-активность.

### 6.1. Исследование цитотоксичности на 60 линиях опухолевых клеток человека в Национальном институте рака США (NCI).

Избранные структуры разных классов испытывались на 60 линиях опухолевых клеток человека в Национальном Институте Рака США (NCI). Цитотоксичность исходных нитростильбенов - нитрозамещенных аналогов комбретастина – оказалась невысокой со значениями GI<sub>50</sub> в диапазоне 1–20 μM.

Изоксазолин-N-оксиды (**8**, **13**), синтезированные из них диарилизоксазол-5-карбоновые кислоты **12** и соответствующие эфиры **14** также были малоактивны или совсем не угнетали рост опухолевых клеток до концентрации 10 μM. Напротив, близкие структурные аналоги СА4 **11t**, **18c** и **18d** оказались весьма эффективными. Так, 3-(4-метоксифенил)-4-(3,4,5-триметоксифенил)изоксазол **11t** и изомерные 4,5-диарилизоксазолы **18c** и **18d** обладали выраженной цитотоксичностью: величина GI<sub>50</sub> для **11t** составила GI<sub>50</sub> 0.17 μM, для **18c** - 0.055 μM, а для **18d** - менее 0.01 μM. Интересно, что среди орто-диарилизоксазолов соединение **11e**, содержащее только одну метоксигруппу, оказалось одним из наиболее активных с GI<sub>50</sub> = 0.047 μM. Несмотря на то, что в среднем эффект вышеуказанных соединений был ниже, чем СА4 (GI<sub>50</sub> = 0.001 μM), на отдельных клеточных линиях их активность была выше. Биологическая экспертная комиссия NCI рекомендовала структуры **11e**, **11t**, **18c**, и **18d** для последующего углубленного исследования. Остальные диарилизоксазолы не обладали столь высокой цитотоксичностью.

## 6.2. Изучение антимиотической активности *in vivo* на зародышах морского ежа

С целью изучения антипролиферативных свойств диарилизоксазолов и выяснения механизма их действия проведены испытания *in vivo* на зародышах морского ежа, которые являются общепризнанным модельным объектом медико-биологических исследований.

Использованный в работе фенотипический метод тестирования дает хорошо воспроизводимые результаты и позволяет быстро обнаружить молекулы, угнетающие деление клеток вследствие взаимодействия с белком тубулином и дестабилизации микротрубочек, что приводит к нарушению структуры и функции митотического веретена. На зародышах морского ежа вещества-дестабилизаторы микротрубочек нарушают клеточное деление (дробление), а на более поздних стадиях развития вызывают характерное изменение подвижности зародышей, которое заключается в оседании на дно сосуда и быстром вращении (спиннинге) вокруг анимально-вегетативной оси (Рис. 4). Косвенным подтверждением антитубулинового действия веществ является также приобретение неспособными разделиться яйцеклетками характерной бугорчатой формы (Рис. 4).



Рис. 4. Действие дестабилизаторов микротрубочек на зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus*. Микрофотографии. 1) контроль – нормальное деление и 2) обработка СА4, нарушение деления, спиннинг. Средний диаметр зародышей 115-150 микрон.

Тесты на зародышах морского ежа показали, что из 19 исследованных нитростильбенов (нитро-аналогов СА4) лишь 4 соединения обладали слабовыраженной антимиотической антитубулиновой активностью. Однако почти все соединения этого класса проявляли системную токсичность в концентрации 0.2-4  $\mu\text{M}$ , выражающуюся в морфологических аномалиях и гибели зародышей. Важно отметить, что близкие структурные аналоги СА4 **6t** и **6x** не проявляли антитубулинового эффекта.

При переходе от  $\alpha$ -нитростильбенов **6** к изоксазолин-N-оксидам **8** пропадала как системная токсичность, так и антитубулиновое действие. То же наблюдалось для изоксазол-

5-карбоновых кислот и их амидов, за исключением кислоты **12t** и амида **9ta**, содержащих метоксифенил-трисметокси-фенильный фрагмент.

Проведено детальное исследование связи структура-активность 16 целевых 3,4-диарилизоксазолов **11** и 4,5-диарилизоксазолов **18**, из которых 9 соединений нарушали деление клеток зародышей морского ежа по механизму дестабилизации микротрубочек.

3,4-Диарил-изоксазолы с метокси-трисметоксизаместителями, как и ожидалось, проявили высокую активность в наномолярных концентрациях: 10 нМ для **11t** и 1 нМ для **11x**, однако изоксазол **11i** без моно-метокси группы в Ar<sub>1</sub> таким эффектом не обладал. Неожиданно изоксазолы **11 d, e, m, n** с моноалкокси-заместителями проявили выраженную антимитотическую антитубулиновую активность, и самым сильнодействующим оказалось соединение **11e**.

Таким образом среди синтезированных соединений наиболее активными антитубулиновыми агентами оказались 5-незамещенные и 3-незамещенные диарилизоксазолы, содержащие в качестве арильных заместителей либо фенил и 4-метоксифенил, либо пару 4-метоксифенил и 3,4,5-трисметоксифенил таким образом, что 4-метоксифенильный заместитель располагался в 4м

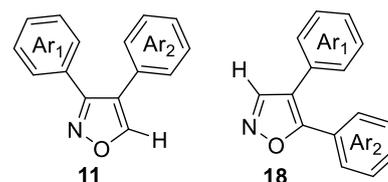


Таблица 5. Действие 3- и 5-незамещенных изоксазолов **11** и **18** на зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus*.

<b>11</b>	Ar <sub>1</sub>	Ar <sub>2</sub>	Минимальная эффективная концентрация μМ		
			Нарушение дробления	Остановка дробления	Спиннинг зародышей
<b>11d</b>	Ph	4-EtO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.05	0.5	0.5
<b>11e</b>	Ph	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.005	0.05	0.1
<b>11f</b>	Ph	3-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1	2(TE)	>5
<b>11g</b>	Ph	2-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	>4	>4	>4
<b>11h</b>	Ph	3,4-(MeO) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	0.1	2(TE)	>4
<b>11i</b>	Ph	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	4	>4	>4
<b>11k</b>	Ph	2,5-(MeO) <sub>2</sub> -3,4-(OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H	2	>4	>4
<b>11m</b>	4-EtO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	0.5	>4	>4
<b>11n</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	0.2	2	2
<b>11o</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	>4	>4	>4
<b>11r</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1-Me-пиразол-4-ил	>4	>4	>4
<b>11s</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	тиофен-2-ил	0.5	>4	>4
<b>11t</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	0.01	0.1	1
<b>11x</b>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.001	0.005	0.05
<b>18a</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	0.002	0.02	0.1
<b>18b</b>	Ph	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.2	2(TE)	>5
<b>18c</b>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.005	0.1	0.5
<b>18d</b>	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,4,5-(MeO) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	0.001	0.01	0.1
<b>CA4</b>			0.002	0.01	0.05

Сравнительное исследование гетероциклических аналогов СА4 с такими же арильными фрагментами показало, что высокая антитубулиновая активность монометоксизамещенных изоксазолов **11e**, **11n**, **18a** и **18b** обусловлена наличием именно изоксазольного цикла. Замена изоксазола на пиразол, 1,2,3-триазол или пиррол приводила к падению активности в 50-500 раз, что еще раз подтвердило адекватный выбор гетероциклического линкера для синтеза биологически активных аналогов СА4 (Рис. 5).

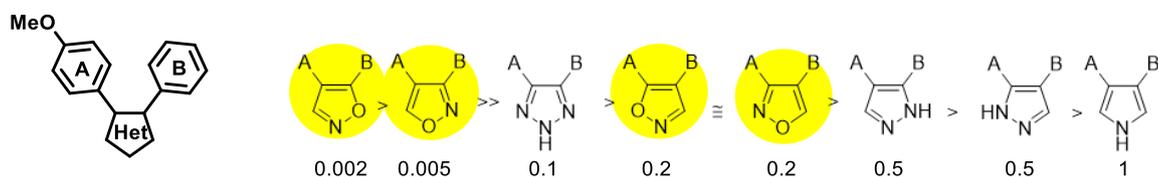


Рис. 5. Эффективные концентрации ( $\mu\text{M}$ ) монометоксизамещенных аналогов СА4 на зародышах морского ежа *Paracentrotus lividus*.

### 6.3. Исследования связи структура-активность *in silico*

Поскольку было экспериментально установлено, что изоксазолы с парой арильных заместителей фенил - метоксифенил обладают активностью на уровне изоксазолов с парой арильных заместителей 4-метоксифенил - 3,4,5-триметоксифенил, по нашей просьбе коллегами из лаборатории №44 ИОХ РАН выполнены расчеты энергии связывания и молекулярной динамики для всех 4х изомерных фенил-(4-метоксифенил)-замещенных изоксазолов **11e**, **11n**, **18a**, **18b** в колхициновом сайте  $\beta$ -субъединицы тубулина. Для изоксазолов **11e**, **11n**, **18a**, **18b** и СА4 энергии связывания были определены как -10.96, -8.91, -9.78, -8.08 и -11.35 ккал/моль соответственно.

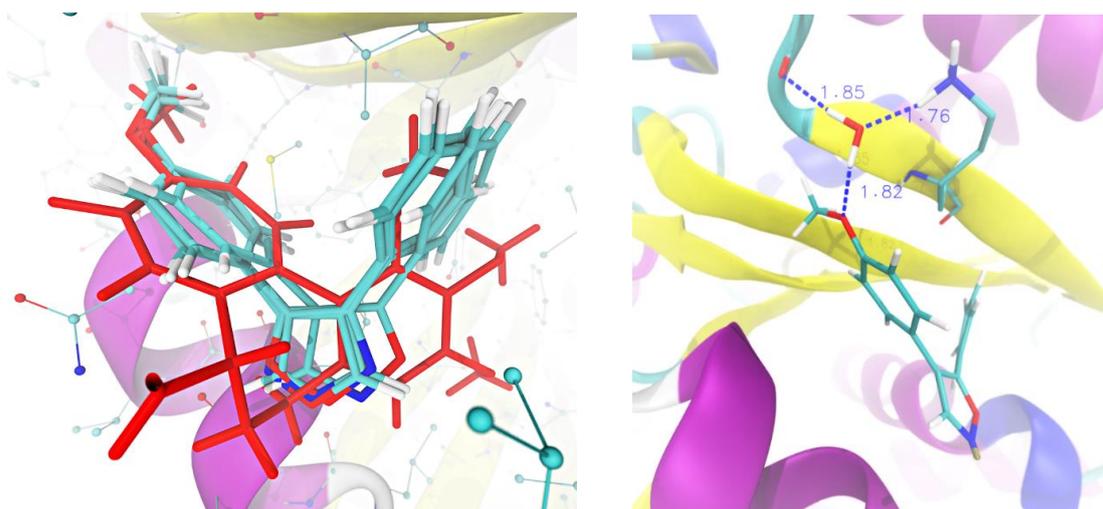


Рис. 6. Слева: Экспериментальное связывание колхицина (красным) и расположение соединений **11e**, **11n**, **18a**, **18b** в колхициновом сайте связывания тубулина (бирюзовым) по данным докинга. Справа: Образование системы водородных связей, включающих лиганд **18a**, молекулу воды и белковые остатки Asn349 и Lys352 тубулина, по данным молекулярно-динамического моделирования.

Можно видеть, что пара изомеров **11e** и **18a** оказывается наиболее активной как по расчетным данным, так и в тесте на зародышах морского ежа. В то же время, изомерные

изоксазолы **11e** и **18a** различным образом связываются с колхициновым сайтом: **11e** с Asn249 и Asp251, а **18a** с Asn349 и Lys352, в обоих случаях присутствуют молекулы сокристаллизационной воды. Таким образом, данные молекулярного моделирования позволяют предсказывать энергии связывания и относительный порядок активности исследуемых соединений, даже в случаях реализации разного типа координации в активном сайте.

#### 6.4. Доклинические испытания в Национальном медицинском исследовательском центре радиологии им. П.А. Герцена.

На основании данных испытаний *in vitro* на опухолевых клетках человека в NCI и *in vivo* на зародышах морского ежа были выбраны наиболее активные изоксазолы с 4-метоксифенильным и 3,4,5-трисметоксифенильным фрагментами **11t**, **11x**, **18c** и **18d** для последующих испытаний в НМИЦ радиологии им. П.А. Герцена на клетках карциномы легкого А-549 и аденокарциномы предстательной железы РС-3. Динатриевая соль фосфата комбретастина А-4 (СА4Р, OxiGen, США) служила положительным контролем. Было обнаружено, что соединения **18d** и **11x** угнетали рост опухолевых клеток человека в значительно более низких концентрациях (Таблица 6), чем СА4Р, что коррелировало с результатами, полученными на зародышах морского ежа.

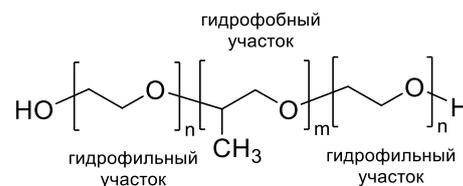
Таблица 6. Результаты тестирования изоксазолов **11t**, **11x**, **18c** и **18d** на опухолевых клетках.

Культура клеток	<b>11t</b> IC <sub>50</sub> , nM	<b>11x</b> IC <sub>50</sub> , nM	<b>18c</b> IC <sub>50</sub> , nM	<b>18d</b> IC <sub>50</sub> , nM	<b>СА4Р</b> IC <sub>50</sub> , nM
А-549	810	8	331	0.8	88
РС-3	512	5	150	0.72	21

Для успешного клинического применения веществ, показавших высокую цитотоксичность по отношению к раковым клеткам человека в культуре, важно наличие благоприятных физико-химических и фармакокинетических показателей, таких как водорастворимость, минимальный побочный эффект, устойчивость к ферментному расщеплению и др. Несмотря на то, что **11x** и **18d** проявили сопоставимую активность, к моменту написания диссертации по комплексу свойств, оптимальных для доклинических исследований, в первую очередь был выбран диарилизоксазол **18d**.

С помощью <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии установлено, что изоксазол **18d** в исходном растворе ДМСО, используемом в биологических испытаниях, не разлагается в течение полугода при хранении при комнатной температуре, а его растворимость в ДМСО составила 59 мг/мл. К сожалению, растворимость **18d** в водной среде не превышала 0.03%, и при такой низкой концентрации исследования на мышах невозможны. Поэтому была разработана его водорастворимая форма с использованием полимера плюроники F-127 (5%), что позволило

увеличить концентрацию **18d** в водной среде более чем в 10 раз, до 0.34%. Плуороник F-127 представляет собой нетоксичный амфифильный триблок-сополимер, состоящий из гидрофобных полипропиленоксидных и гидрофильными полиэтиленоксидных звеньев. В тестах на зародышах морского ежа было установлено, что F-127 как минимум в 10 раз менее токсичен, чем применяемые солюбилизаторы кремофор, твин-20 и твин-80. Испытания препаративной формы **18d**-F-127 на раковых клетках А-549 и РС-3 и на зародышах морского ежа показали, что активность сохраняется. В настоящее время эта препаративная форма проходит доклинические испытания на мышах с привитыми опухолями рака простаты РС-3 и рака легкого А-549 в НМИЦ радиологии им. П.А. Герцена.



Таким образом в ходе работы было установлено, что некоторые орто-диариллизоксазолы, незамещенные в 3-м либо 5-м положении, являются мощными дестабилизаторами микротрубочек, подавляющими рост опухолевых клеток человека в наномольной, а в ряде случаев субнаномольной концентрации, что сопоставимо или превышает активность СА4.

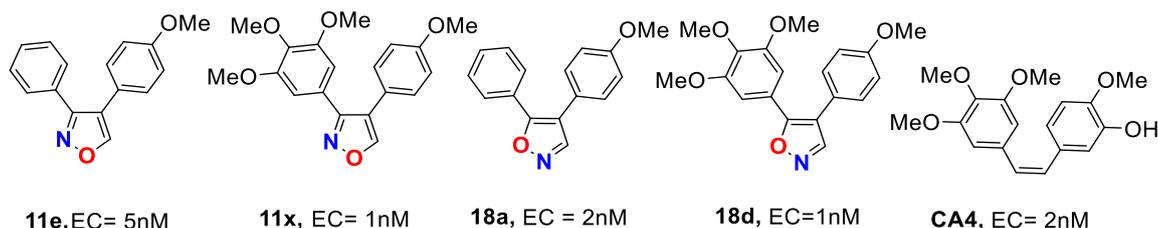


Рис. 7. Структуры наиболее активных изоксазолов, выявленные в испытаниях на зародышах морского ежа.

В НМИЦ радиологии им. П.А. Герцена запланированы последующие расширенные доклинические испытания соединений **11e**, **11x**, **18a** и **18d**.

## Выводы

1. Разработан селективный способ синтеза 5-незамещенных 3,4-диарилизоксазолов – высокоактивных дестабилизаторов микротрубочек, аналогов природного цитостатика комбретастина А-4.
2. Методом рециклизации 5-карбоксамидо-изоксазолин-N-оксидов в присутствии DBU с высокими выходами синтезированы 3,4-диарилизоксазол-5-карбоксамиды, которые являются близкими аналогами протипоопухолевых изоксазолов - ингибиторов белка теплового шока Hsp-90. При рециклизации 5-этоксикарбонил-3,4-диарилизоксазолин-N-оксидов в присутствии DBU был получен представитель редкого класса гетероциклов – диарил-оксазинон (5-гидрокси-4-(2,5-диметокси-3,4-метилendioксифенил)-3-фенил-6H-1,2-оксазин-6-он).
3. Установлено, что при наличии нитро-групп в арильных заместителях рециклизация изоксазолин-N-оксидов протекает атипично, приводя к эфирам 3,4-диарилизоксазол-5-карбоновых кислот, омыление которых с высокими выходами позволяет получить соответствующие карбоновые кислоты, представляющие интерес в качестве противовоспалительных лекарственных средств нового поколения.
4. Разработаны эффективные препаративные способы синтеза ключевых полупродуктов - арилнитрометанов - как с акцепторными, так и с донорными заместителями, в том числе с природными полиалкокси-фрагментами.
5. Разработан эффективный способ получения  $\alpha$ -нитростильбенов – нитрозамещенных аналогов комбретастина А-4, реакцией метильных оснований Шиффа бензальдегидов с арилнитрометанами, что позволило увеличить выходы  $\alpha$ -нитростильбенов в 2 - 3 раза.
6. При исследовании антимитотической и противоопухолевой активности орто-диарилизоксазолов на зародышах морского ежа *Paracentrotus lividus* и на 60 линиях опухолевых клеток человека выявлены молекулы, подавляющие деление опухолевых клеток в концентрации 1-10 нМ, более активные, чем природный цитостатик комбретастин А-4.
7. Способность о-дифенилизоксазолов взаимодействовать с колхициновым сайтом тубулина подтверждена методами компьютерного моделирования, в том числе методом молекулярной динамики, расчетом аффинности связывания на примерах монометоксизамещенных изомеров диарилизоксазолов. Рассчитанные величины  $\Delta G$  согласуются с данными биологических испытаний.
8. По комплексу противоопухолевых и физико-химических свойств среди о-диарилизоксазолов выбран **18d**, разработана его водорастворимая форма на основе плуроника F-127, которая в настоящее время проходит доклинические испытания в НМИЦ радиологии им. П.А. Герцена. По предварительным данным, **18d** при однократной дозе 10мг/кг на четвертые сутки после введения ингибирует рост саркомы мышей S37 на 50%.

## Список опубликованных научных работ

### Статьи:

1. А. Д. Плютинская, Е. Р. Немцова, А. А. Панкратов, П. В. Шегай, С. С. Крылов, В. Н. Искандарова, А. С. Максименко, Д. В. Демчук, Т. С. Купцова, М. Н. Семенова, В. В. Семенов. Цитостатическая активность производных Комбретастина А-4 в системе *in vitro*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **2022**, Том 174, № 8 С. 184
2. A. S. Maksimenko, P. A. Buikin, E. D. Daeva, V. P. Kislyi, V. V. Semenov. Preparation of Ring-Methoxylated Arylnitromethanes By The Victor Meyer Reaction. *Synthesis*, **2022**, 54 (11), 2724-2730
3. E. A. Silyanova, V. I. Ushkarov, A. V. Samet, A. S. Maksimenko, I. A. Koblov, V. P. Kislyi, M. N. Semenova, V. V. Semenov. A comparative evaluation of monomethoxy substituted *o*-diarylazoles as antiproliferative microtubule destabilizing agents. *Mendeleev Commun*, **2022**, 32, 120-122.
4. A. S. Maksimenko, I. A. Koblov, N. B. Chernysheva, V. P. Kislyi, V. V. Semenov. Convenient preparation of arylnitromethanes by oxidation of benzaldoximes with urea hydrogen peroxide. *Mendeleev Commun.*, **2021**, 31, Iss. 6, P. 818-820.
5. V. S. Stroylov, I. V. Svitanko, A. S. Maksimenko, V. P. Kislyi, M. N. Semenova, V. V. Semenov. Computational modeling and target synthesis of monomethoxy-substituted *o*-diphenylisoxazoles with unexpectedly high antimitotic microtubule destabilizing activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2020**, 30, Iss.23, 127608
6. A. S. Maksimenko, V. P. Kislyi, N. B. Chernysheva, Y. A. Strelenko, Y. V. Zubavichus, V. N. Khrustalev, M. N. Semenova, V. V. Semenov. Effective Synthesis of 3,4-Diaryl-isoxazole-5-carboxamides and their Antiproliferative Properties // *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, P. 4260–4270.
7. M. N. Semenova, D. V. Demchuk, D. V. Tsyganov, N. B. Chernysheva, A. V. Samet, E. A. Silyanova, V. P. Kislyi, A. S. Maksimenko, A. E. Varakutin, L. D. Konyushkin, M. M. Raihstat, A. S. Kiselyov, V. V. Semenov Sea Urchin Embryo Model As a Reliable *In Vivo* Phenotypic Screen to Characterize Selective Antimitotic Molecules. Comparative evaluation of Combretapyrazoles, -isoxazoles, -1,2,3-triazoles, and -pyrroles as Tubulin-Binding Agents // *ACS Comb. Sci.*, **2018**, 20, Iss.12, P 700–721.
8. N. B. Chernysheva, A. S. Maksimenko, F. A. Andreyanov, V. P. Kislyi, Y. A. Strelenko, V. N. Khrustalev, M. N. Semenova, V. V. Semenov. Regioselective synthesis of 3,4-diaryl-5-unsubstituted isoxazoles, analogues of natural cytostatic combretastatin A4 // *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 146, P 511-518.
9. N. B. Chernysheva, A. S. Maksimenko, F. A. Andreyanov, V. P. Kislyi, Y. A. Strelenko, V. N. Khrustalev, M. N. Semenova, V. V. Semenov. Synthesis of 3,4-diaryl-5-carboxy-4,5-dihydroisoxazole 2-oxides as valuable synthons for anticancer molecules // *Tetrahedron*, **2017**, 73, P 6728-6735.

### Тезисы конференций:

1. А.С. Максименко, В.П. Кислый, И.А. Коблов, В.В. Семенов, М.Н. Семенова. Синтез, биологическая активность и антипролиферативные свойства  $\alpha$ -нитростильбенов. VII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии МОБИ-ХимФарма2021», Москва, **2021**, с. 35 (устный доклад)
2. А.С. Максименко, В.П. Кислый, М.Н. Семенова, В.В. Семенов. Синтез и исследование зависимости структура активность антитубулиновых соединений на основе арилнитрометанов. Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021, Новосибирск **2021**, с. 97 (устный доклад)
3. Anna Maksimenko, Victor Kislyi, Victor Stroylov, Igor Svitanko, Marina Semenova, Victor Semenov. Target synthesis of diarylisoxazoles as tubulin polymerization inhibitors. EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual poster session. September 9, **2020**. Virtual event, Poster#095, P. 108
4. Максименко А.С., Кислый В.П., Буйкин П.А., Семенов В.В. Оптимизация препаративных способов получения арилнитрометанов. Всероссийская научная конференция Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней Школа-конференция молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность», Красновидово **2020**, с. 67 (устный доклад)
5. А.С. Максименко, В.П. Кислый, Я.В. Зубавичус, В.В. Семенов. Рециклизация *o*-диарил изоксазолин-N-оксидов в соответствующие изоксазолы и их биологическая активность. V Междисциплинарная конференция «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии МОБИ-ХимФарма2019» Судак, **2019**. с. 57. (устный доклад)
6. А.С. Максименко, В.П. Кислый, Я.В. Зубавичус, В.В. Семенов. Рециклизация изоксазолин-N-оксидов в 3,4-диарилизоксазол-5-карбоксамиды и 5-гидрокси-3,4-диарил-6H-1,2-оксазины. VIII Молодежная конференция ИОХ РАН, Москва, **2019**, с. 68 (флеш-доклад)
7. Kislyi V.P., Maksimenko A.S., Daeva E.D., Zubavichus Y.V., Khrustalev V.N., Semenov V.V. Recyclization of isoxazoline-N-oxides into 3,4-diaryl-isoxazol-5carboxamides and 5-hydroxy-3,4-diaryl-6H-1,2-oxazin-6-ones // Advances in synthesis and complexing. Organic chemistry section, Moscow, **2019**, p. 163 (poster session)
8. Maksimenko A.S. Рециклизация 5-(этоксикарбонил)-4,5-дигидроизоксазол-N-оксидов в 5-незамещенные изоксазолы и 5-гидрокси-1,2-оксазин-6-оны. Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2018», Москва, **2018**.
9. Chernysheva N.B., Maksimenko A.S., Andreyanov F.A., Kislyi V.P., Semenov V.V. Recyclization of 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxylates into 5-unsubstituted 3,4-diaryl-isoxazoles // Advances in synthesis and complexing. Organic chemistry section, Moscow, **2017** p. 162.