

Тихонова Татьяна Андреевна

«Разработка новых аллостерических модуляторов рецепторов
γ-аминомасляной кислоты типа А»

Шифр специальности – 02.00.03 Органическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 002 222 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

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института

<http://zioc.ru/>

13 октября 2020 года

Дата приема к защите

14 октября 2020 года

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

16 октября 2020 года

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

На правах рукописи



**ТИХОНОВА
ТАТЬЯНА АНДРЕЕВНА**

**Разработка новых аллостерических модуляторов
рецепторов γ -аминомасляной кислоты типа А**

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории химии стероидных соединений №22
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Волкова Юлия Алексеевна

к.х.н., с.н.с. лаборатории химии стероидных соединений (№22) ФГБУН ИОХ им. Н. Д. Зелинского РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Аверина Елена Борисовна

д.х.н. профессор кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова

Зубков Федор Иванович

к.х.н., доцент кафедры органической химии факультета физико-математических и естественных наук ФГАОУ ВО РУДН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

МИРЭА – Российский технологический университет – Институт тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «16» декабря 2020 г. в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.222.01 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 _____ октября 2020 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

Д 002.222.01 ИОХ РАН

доктор химических наук



Газиева Г. А.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Одной из наиболее актуальных научных проблем в области органической и медицинской химии в течение десятилетий остается разработка новых методологий направленного синтеза гетероциклических соединений с заданным типом биологической активности. Отдельного внимания заслуживает задача получения новых классов модуляторов рецепторов γ -аминомасляной кислоты типа А (ГАМК_А-рецепторов), играющих важную роль в медицине и смежных областях. Важно отметить, что данное направление медицинской химии в равной степени отличается как своей обширностью, так и сложностью. С одной стороны, оно имеет богатую историю исследований и широкий спектр исторически зарекомендовавших себя препаратов. С другой стороны, сама фармакологическая мишень – ГАМК_А-рецептор – сложный макромолекулярный комплекс, селективная модуляция функции которого является далеко не тривиальной задачей. Именно это делает работы в данном направлении неизменно интересными и актуальными.

Известно, что существует множество различных методологий создания новых биологически активных соединений, от постмодификации уже известных лекарственных препаратов, до тотального скрининга широких библиотек неизученных ранее лигандов. В области трансформации структур классических препаратов интересным шагом могло бы стать осуществление приема тио-изостерной замены в структуре снотворных и анксиолитических препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда. При рациональном подходе введение в их каркас новых атомов и групп могло бы обеспечить как увеличение стабильности молекулы, так и улучшение ее характера связывания с фармакологической мишенью. Однако возможность осуществления таких трансформаций в области создания ГАМК-модулирующих препаратов практически не изучена. В области исследования принципиально новых структур, перспективных с точки зрения нейротропной активности, актуальным направлением могло бы стать создание «жестко-каркасных» аналогов препаратов диазепинового ряда. Введение дополнительных аннелированных колец в структуру, а следовательно и усиление ее жесткости могло бы принципиальным образом повлиять на механизм связывания лигандов с ГАМК_А-рецептором и при должной оптимизации структур нивелировать характерные для данного класса препаратов нежелательные побочные эффекты. Кроме того, значимым не только с практической, но и с фундаментальной точек зрения могло бы стать создание гибридных молекул на основе фармакофорных фрагментов с подтвержденной ГАМК-модулирующей активностью.

Цели работы. (1) Разработка нового класса модуляторов ГАМК_А-рецепторов методом тио-изостерной замены в каркасе препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда. (2) Создание

новых «жестко-каркасных» аналогов препаратов диазепинового ряда; разработка эффективного метода их синтеза и оценка ГАМК-модулирующей активности. (3) Изучение возможности создания гибридных молекул с ГАМК-модулирующей активностью на основе лигандов как природного, так и синтетического происхождения.

Научная новизна работы. Впервые показана возможность создания тио-изостерных аналогов препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда и гибридных молекул с заданной ГАМК-модулирующей активностью с использованием лигандов как природного, так и синтетического происхождения. Впервые изучена возможность получения «жестко-каркасных» аналогов препаратов диазепинового ряда на основе дибензо[*d,f*][1,3]диазепиновых производных. В результате исследований разработаны новые методы синтеза амидов бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов, дибензо[*d,f*][1,3]диазепинов, а также гибридных молекул на основе аллопрегнанолона, авермектинов и имидазо[1,2-*a*]пиридинов. Для всех предложенных лигандов впервые *in vitro* и *in vivo* исследована биологическая (ГАМК-модулирующая) активность.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что были изучены общие наиболее актуальные подходы к созданию новых гетероциклических соединений с заданным типом биологической активности. В результате чего в качестве новых перспективных модуляторов ГАМК_A-рецептора предложены тио-изостерные аналоги препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда – производные бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов, «жестко-каркасные» аналоги препаратов диазепинового ряда – производные дибензо[*d,f*][1,3]диазепинов и гибридные молекулы на основе аллопрегнанолона, авермектинов и производных имидазо[1,2-*a*]пиридинов. Разработаны общие методы синтеза предложенных лигандов и проведено обширное исследование профиля их биологической активности с применением тестов *in vitro* и *in vivo*, установлены корреляции «структура-активность». Показана высокая перспективность ряда полученных соединений для последующего развития как в качестве лекарственных препаратов с выраженной ГАМК-модулирующей активностью, так и в качестве удобных инструментов для проведения дальнейших фундаментальных исследований в области молекулярной биологии и физиологии ГАМК_A-рецепторов.

Личный вклад автора состоял в систематизации литературных данных, проведении синтезов, анализе составов реакционных смесей и строения продуктов реакций (по данным спектров ЯМР, ИК и МАСС), проведении ряда биологических испытаний, интерпретации экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации и представлении полученных результатов на конференциях.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов обеспечивается тем, что экспериментальные работы и аналитические исследования выполнены на современном сертифицированном оборудовании, обеспечивающем получение надежных данных. Состав и структура соединений, обсуждаемых в диссертационной работе, подтверждены данными ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопии, элементных анализов, масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) и ИК-спектроскопии. Используются современные системы сбора и обработки научно-технической информации: электронные базы данных Reaxys (Elsevier), SciFinder (CAS), Web of Science (Thomson Reuters), а также полные тексты статей и книг.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях и конгрессах: 27th International Symposium on Organic Chemistry of Sulfur “From fundamental research to application” (Йена, Германия, 2016), “Элементоорганические соединения, полимеры, органическая химия, теоретическая и физико-химические методы исследования строения веществ” (Москва, Россия, 2016), “Успехи синтеза и комплексообразования” (Москва, Россия, 2016), Международный молодежный научный форум «Ломоносов» 2016, Инновации в химии/Органическая химия (Россия, Москва, 2016), Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2016 (Красновидово, Россия, 2016), III Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике (Севастополь, Крым, 2017), Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2017 (Россия, Москва, 2017), Международный молодежный научный форум «Ломоносов» 2017, Инновации в химии/Органическая химия (Москва, Россия, 2017), The Fourth International Scientific Conference “Advances in Synthesis and Complexing” (Москва, Россия, 2017), VII Молодежная конференция ИОХ РАН (Россия, Москва, 2017), MedChem Russia 2017, 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Казань, Россия, 2017), Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2018 (Россия, Москва, 2018), Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2019 (Россия, Москва, 2019), The Fifth International Scientific Conference “Advances in Synthesis and Complexing” (Россия, Москва, 2019), VIII Молодежная конференция ИОХ РАН (Россия, Москва, 2019), VI Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии «МОБИ-ХимФарма2020» (Россия, Нижний Новгород, 2020).

Публикации по теме работы. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, отвечающих требованиям ВАК, и 16 тезисов докладов российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, посвященного последних достижений в области разработки модуляторов ГАМК_A-рецепторов, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Материал диссертации изложен на 219 страницах машинописного текста, включает 17 таблицы, 218 рисунков и 23 схем. Библиография насчитывает 270 ссылок.

Благодарности. Автор диссертационной работы благодарит научного руководителя с.н.с., к.х.н. Волкову Юлию Алексеевну за интересную тему работы, ценные рекомендации и полезные советы при проведении исследований. Выражает глубокую благодарность сотрудникам Лаборатории химии стероидных соединений №22 – заведующему лабораторией д.х.н. Заварзину Игорю Викторовичу и с.н.с. к.х.н. Чернобуровой Елене Ивановне за ценные научные замечания, рекомендации и всестороннюю поддержку, Щетининой Марине Анатольевне и к.х.н. Рассохиной Ирине Владимировне за совместно проведенные исследования, к.х.н. Козлову Михаилу Александровичу и асп. Бирюковой Валентине Евгеньевне за полезные диспуты в период создания данного материала.

Признательность сотрудникам ИОХ РАН Даевой Елене Дмитриевне, Колотыркиной Наталье Георгиевне и Борисовой Ирине Александровне за физико-химические исследования синтезированных соединений, а также д.м.н., профессору Ковалеву Ивану Георгиевичу, к.м.н. Кондрахину Евгению Анатольевичу (ФГБНУ НИИ Фармакологии), д.б.н. Шароновой Ирине Николаевне, к.б.н. Рассохину Алексею Владимировичу (ФГБНУ Научный Центр Неврологии) за проведение биологических испытаний и д.х.н. Лысенко Константину Александровичу (ИНЭОС РАН) за проведение рентгено-структурного анализа.

Отдельные слова благодарности заведующей аспирантурой с.н.с., к.х.н. Веселе Ирине Васильевне за помощь и советы по ходу обучения.

Основное содержание работы

Работа была направлена на создание новых аллостерических модуляторов рецепторов γ -аминомасляной кислоты типа А (рис. 1) на основе соединений как синтетического, так и природного происхождения. Ключевыми стадиями исследования стали дизайн и синтез тио-изостерных аналогов препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда - бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов, разработка новых аналогов препаратов диазепинового ряда - дибензо[*d,f*][1,3]диазепинов, а также изучение возможности создания гибридных несимметричных аллостерических модуляторов ГАМК_A-рецепторов на основе производных нейростероидов, авермектинов и имидазо[1,2-*a*]пиридинов.

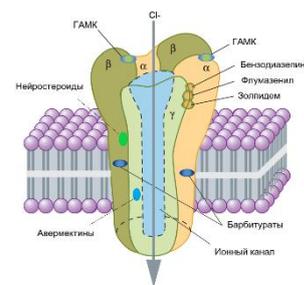


Рисунок 1. Строение ГАМК_A-рецепторов.

I. Синтез и оценка биологической активности производных бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов

На первом этапе работы основные усилия были сфокусированы на изучении возможности применения приема тио-изостерной замены в отношении препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда (*Золпидем*, *Алпидем*) с целью получения новых более эффективных аналогов снотворных и анксиолитических лекарственных средств (схема 1).

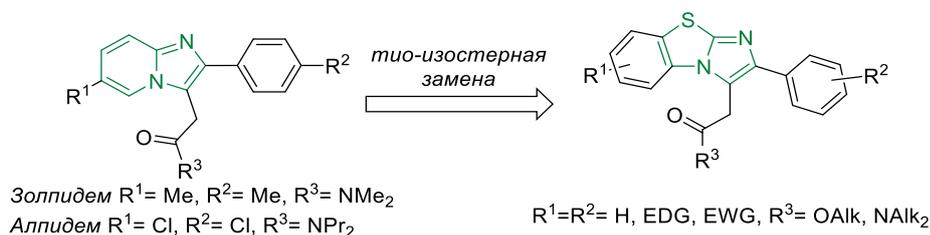


Схема 1. Тио-изостерная замена в имидазо[1,2-*a*]пиридиновом каркасе.

С опорой на молекулярное моделирование мы предположили, что бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолы, полученные заменой пиридинового цикла в имидазо[1,2-*a*]пиридиновом каркасе на тиазольный, могут обладать модулирующей активностью в отношении бензодиазепинового сайта ГАМК_A-рецепторов. В рамках поиска эффективного синтетического подхода к целевым бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазольным производным мы обратились к разработанной нами ранее стратегии получения 1,3-имидазол-аннелированных гетероциклов на основе А³-конденсации – трехкомпонентной реакции альдегидов, алкинов и аминов, катализируемой солями переходных металлов (схема 2).

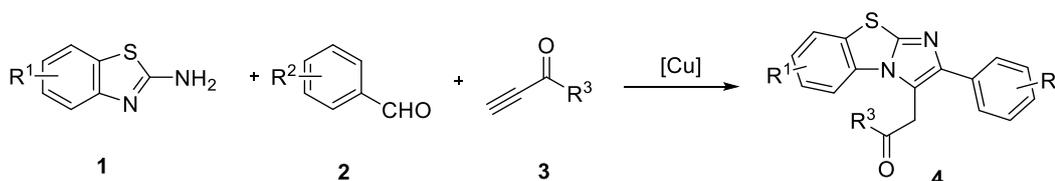
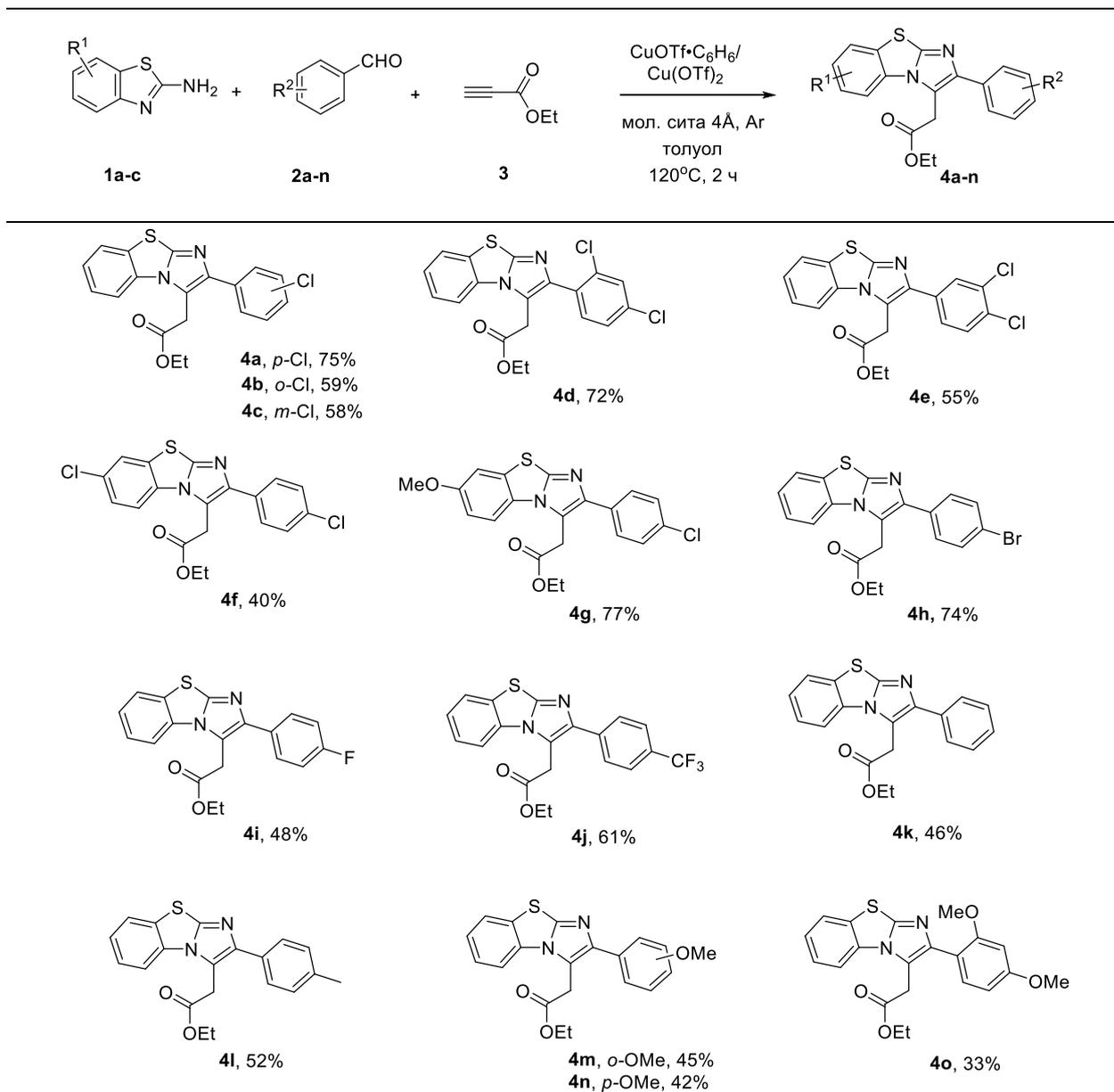


Схема 2. Стратегия получения 1,3-имидазол-аннелированных гетероциклов.

Методика синтеза эфиров бензоимидазотиазолов **4** включала в себя выдерживание в инертной атмосфере при 120°C смеси 2-аминобензотиазола **1**, альдегида **2** и этилпропиолата (**3**) в присутствии $\text{CuOTf}\cdot\text{C}_6\text{H}_6/\text{Cu}(\text{OTf})_2$. Варьированием различных замещенных бензальдегидов и бензотиазолов были получены соединения **4a-n** с хорошими выходами (таблица 1).

Таблица 1. Получение функционализированных эфиров бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов.^{a,б}

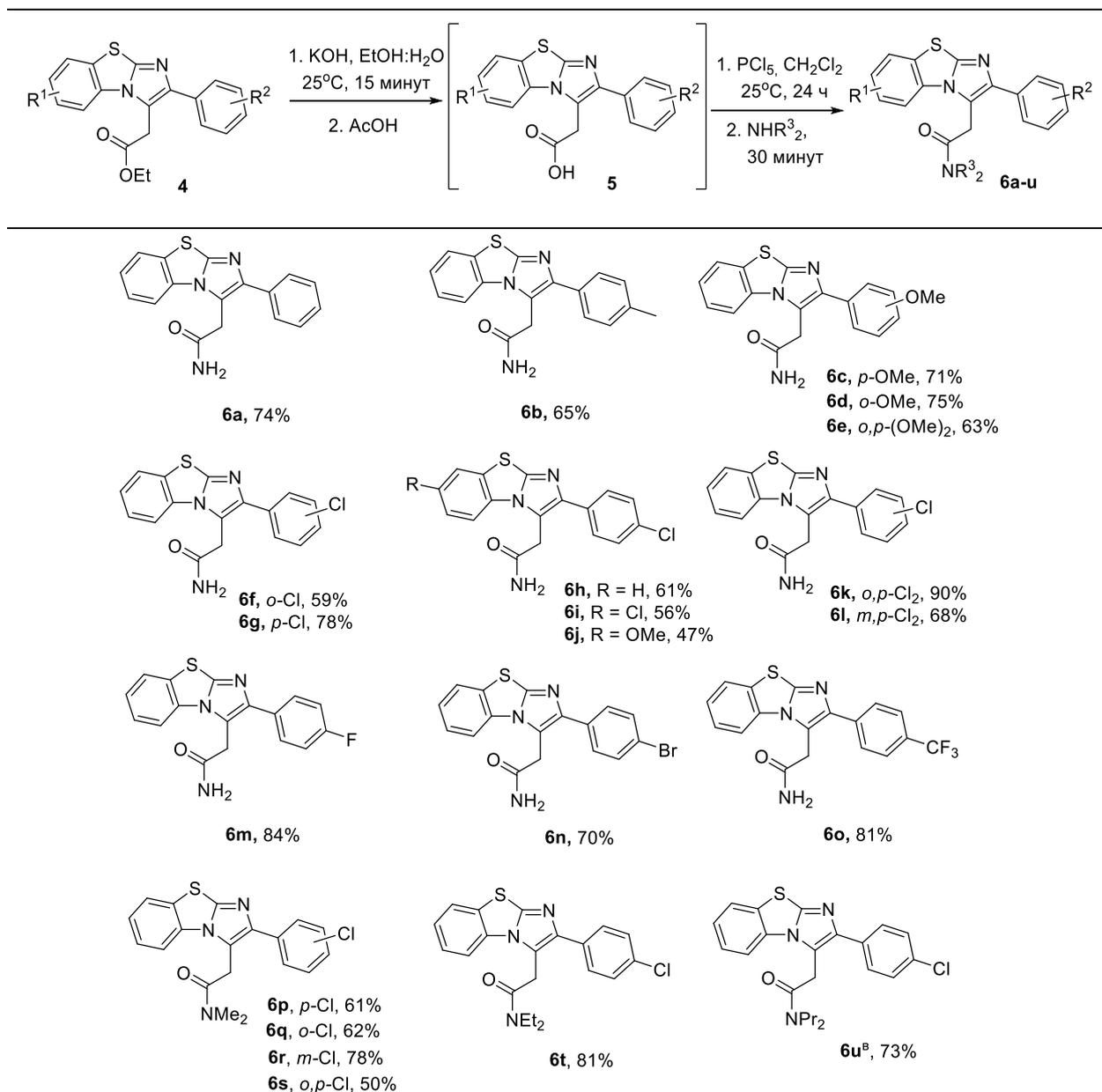


^aУсловия реакции: 1) амин **1a-c** (0.2 ммоль, 1.0 экв.), альдегид **2a-n** (1.1 экв.), этилпропионат (**3**) (2.0 экв.), $\text{CuOTf}\cdot\text{C}_6\text{H}_6$ (10 мол.%), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (10 мол.%), молекулярные сита 4 Å и толуол (1 мл) в закрытом микрореакторе в инертной атмосфере в течение 2 часов при 120°C. ^бВыходы определены после выделения методом колоночной хроматографии.

Стандартные условия гетероциклизации оказались эффективными только для получения эфиров имидазобензотиазолов, тогда как получение амидов в этих условиях было малоэффективным. В связи с этим, было принято решение модифицировать исходную

синтетическую стратегию. Целевые амиды **6** были получены в две стадии последовательным гидролизом этиловых эфиров **4** и амидированием генерируемого *in situ* хлорангидрида **5**. Была выделена широкая серия амидов бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов **6a-o** с выходами от 47 до 90% после очистки методом колоночной хроматографии (таблица 2).

Таблица 2. Получение амидов бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов.^{a-b}



^aУсловия реакции: 1) эфир **4** (0.60 ммоль, 1.0 экв.), KOH (67 мг, 1.20 ммоль, 2.0 экв.), EtOH/H₂O (2:1, 15 мл), CH₃COOH (0.8 мл) при комнатной температуре в течение 10 мин. 2) PCl₅ (125 мг, 0.60 ммоль, 1.0 экв.), CH₂Cl₂ (5 мл) 40 мин. при 40 °С. Газообразный NH₃ (1.0 экв.) барбатированием в течение 30 мин. ^bВыходы продуктов определены после очистки методом колоночной хроматографии. ^cСоединение получено напрямую из соответствующего амида пропиоловой кислоты в условиях обозначенных в табл.1.

Изучение ГАМК-модулирующей активности синтезированных соединений **4**, **6** проводилось *in vitro* и *in vivo* на базах НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова, Научного Центра Неврологии, а также на базе биологического модуля нашей лаборатории.

Степень сродства к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора соединений **4**, **6** оценивалась методом радиолигандного конкурентного связывания при вытеснении [³H]Флунитразема с мембраны нейронов мозга крыс. В качестве препарата сравнения использовался снотворный препарат *Золпидем*. В ходе эксперимента было найдено, что большинство изученных лигандов обладают выраженной аффинностью к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора (IC₅₀ 70-471 нМ), а некоторые обладали сопоставимым или превосходящим препарат сравнения (IC₅₀ 43 нМ) сродством. Так, для лигандов **6b**, **6p**, **6q**, **6r**, **6s** значения IC₅₀ составили 73, 69, 6, 48, 12 нМ, соответственно.

Кроме того, для всех соединений **4**, **6** была проведена оценка биологической активности *in vivo*. В качестве удобного метода оценки влияния синтезированных бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов был выбран эксперимент «Новый аквариум» с использованием в качестве модельных организмов рыб вида Данио рерио (лат. *Danio rerio*). В качестве препарата сравнения также использовался снотворный препарат *Золпидем*. Статистический анализ ряда стандартных поведенческих критериев (время, проведенное в верхней части аквариума и первого пересечения средней линии, а также число пересечений средней линии) для представительных групп модельных организмов, обработанных растворами лигандов, позволил выделить соединения **6b**, **6p**, **6q**, **6r** как наиболее близкие к препарату сравнения по профилю активности (рис. 2).

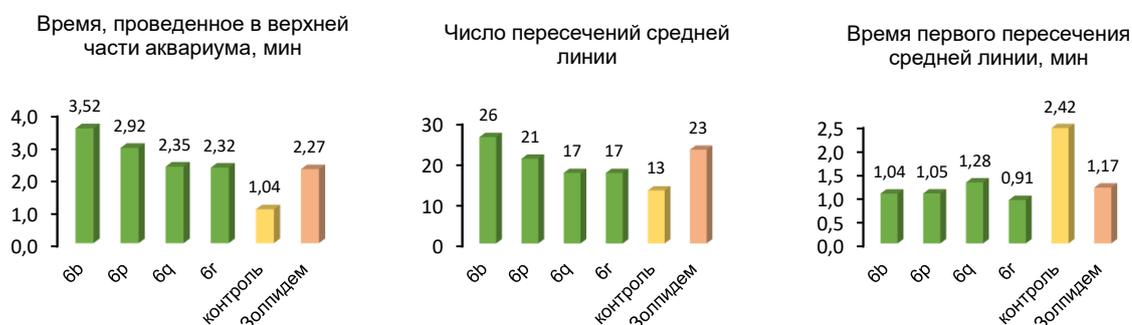


Рисунок 2. Поведенческие эффекты соединений-лидеров эксперименте *in vivo* на модели *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум».

Данные лиганды в концентрации 1 мг/л вызывали выраженный анксиолитический эффект у модельных животных, который, как было дополнительно подтверждено в электрофизиологических исследованиях (на примере лиганда **6q**), опосредован непосредственно модуляцией ГАМК_A-рецепторного комплекса и формируется при взаимодействии исследуемых бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_A-рецептора. Таким образом нами была показана принципиальная возможность осуществления тио-изостерной замены в отношении препаратов имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда.

II. Синтез и оценка биологической активности производных дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов

На следующем этапе работы в качестве объекта исследования нами был выбран класс бензодиазепиновых препаратов – неселективных, но высокоактивных модуляторов ГАМК_A-рецепторов, низкий уровень селективности которых практически не удается скорректировать с помощью небольших модификаций бензодиазепинового каркаса. В связи с чем представляло интерес изучить влияние введения дополнительного аннелированного цикла в структуру классических бензодиазепинов на характер связывания с мишенью и активность лигандов. В качестве возможных аналогов бензодиазепиновых препаратов нами были предложены производные дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов (схема 3).

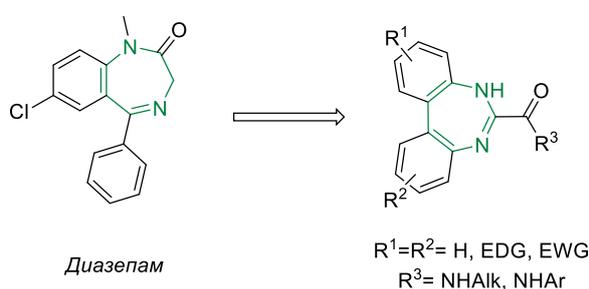


Схема 3. Жестко-каркасные аналоги препаратов бензодиазепинового ряда.

В качестве синтетического подхода к дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинам впервые была реализована гетероциклизация 2,2'-бифенилдиаминов **7** с производными галогенуксусной кислоты **8** в присутствии молекулярной серы (схема 4).

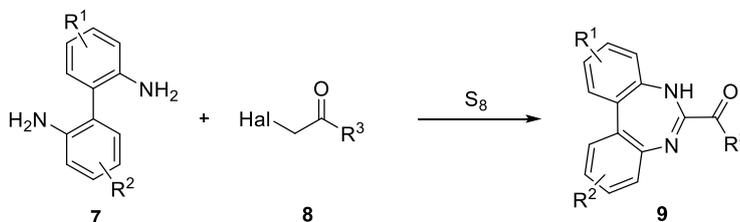
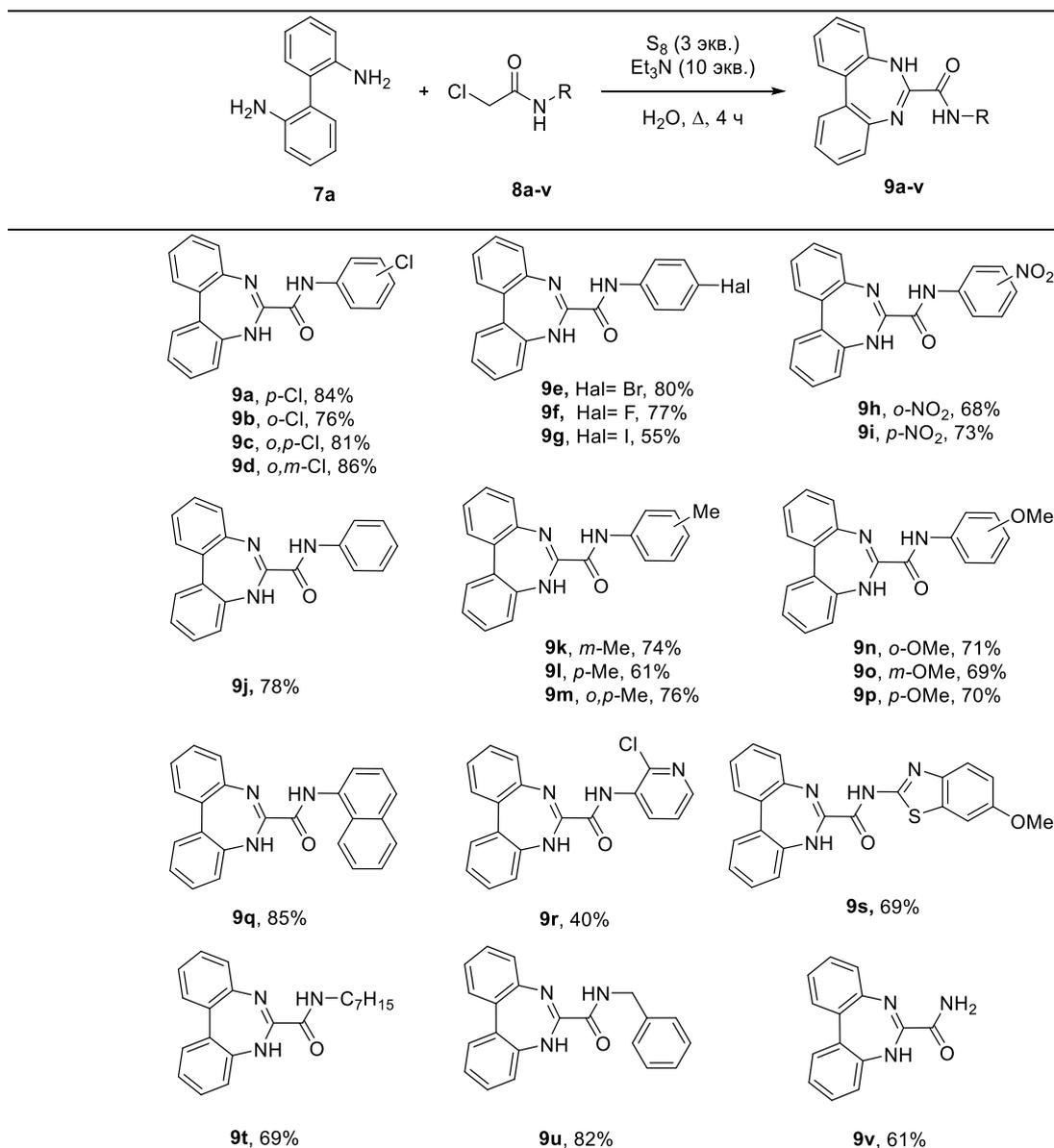


Схема 4. Стратегия получения функционализированных дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов.

Оптимизация предложенного метода синтеза дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов **9** была проведена с использованием 2,2'-бифенилдиамина **7a** в качестве модельного субстрата. Варьировались такие параметры, как соотношение реагентов, растворитель (ДМФА, 1,4-диоксан, ДМСО, *n*-гексан, CHCl_3 , H_2O), температурный режим (60–100°C) и добавки (Et_3N , DIPEA). На основании установленных закономерностей было найдено, что максимальные выходы целевых продуктов достигаются при проведении реакции с 2-хлорацетамидами в воде в условиях кипячения в течение 4 часов в присутствии 10 эквивалентов Et_3N и 3 эквивалентов серы. В ходе определения границ применимости метода в отработанных условиях в реакцию вводились различные производные 2,2'-бифенилдиамина **7** и амиды хлоруксусной кислоты **8**. Изучение реакции с замещенными хлорацетамидами **8a-v** показало, что данный метод носит

общий характер для ароматических, алифатических и гетероциклических производных хлорацетамидов. Была получена широкая серия амидов **9a-v**, функционализированных фенильным, нафтильным, бензильным, пиридиновым, бензотиазольным и гептильным остатками. Выходы продуктов **9a-v** варьировались от 40% до 86% (таблица 3). Кроме того, возможным оказалось введение в реакцию незамещенного 2-хлорацетамида (**8v**); соответствующий диазепин **9v** был выделен с выходом 61%.

Таблица 3. Варьирование 2-хлорацетамидов в синтезе амидов дибензо[*d,f*][1,3]диазепинов.^{a,б}



^a Условия реакции: 2,2'-бифенилдиамин (**7a**) (100 мг, 0.54 ммоль, 1 экв.), 2-хлорацетамид **8** (1.08 ммоль, 2 экв.), S₈ (414 мг, 1.62 ммоль, 3 экв.), Et₃N (0.75 мл, 5.40 ммоль, 10 экв.) и H₂O (5 мл). ^б Выходы определены после выделения методом колоночной хроматографии.

Структуры дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов были подтверждены монокристаллическим рентгеновским анализом на примере соединения **9k** (рис. 3).

Было показано, что метод носит общий характер также для различных симметрично и несимметрично замещенных 2,2'-бифенилдиаминов (Таблица 4). Диамины **7b-g**, содержащие как электроноакцепторные группы (5,5'-*Cl*, 5,5'-*Br* и 5'-*Cl*), так и электронодонорные группы (5,5'-*Me*₂ и 4,6-*Me*₂), оказались эффективными субстратами. Их использование в гетероциклизации привело к соответствующим дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинам **9w-ab**. Выходы продуктов составили от 71% до 87% для 5,5'-симметрично замещенных продуктов.

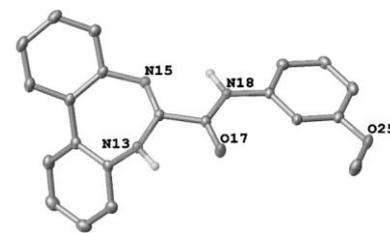
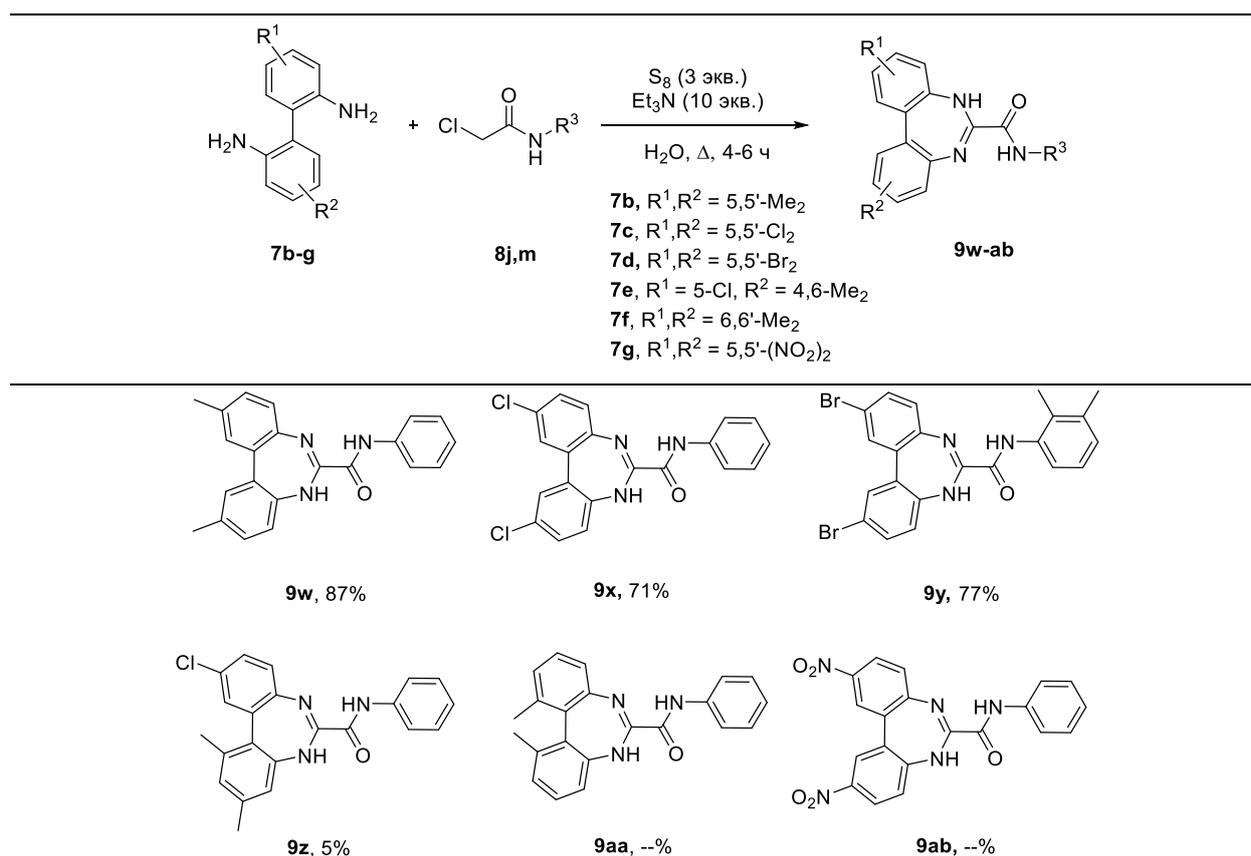


Рисунок 3. Общий вид рентгеновской структуры соединения **9k** с тепловыми эллипсоидами с вероятностью 50%

Таблица 4. Варьирование 2,2'-бифенилдиаминов в синтезе дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов.^{a,б}



^a Условия реакции: 2,2'-бифенилдиамин **7** (0.54 ммоль, 1 экв.), 2-хлорацетамид **8** (1.08 ммоль, 2 экв.), S₈ (414 мг, 1.62 ммоль, 3 экв.), Et₃N (0.75 мл, 5.40 ммоль, 10 экв.) и H₂O (5 мл). ^б Выходы определены после выделения методом колоночной хроматографии.

Низкий выход продукта **9z** можно объяснить дестабилизирующим стерическим влиянием на дибензо[*d,f*][1,3]дiazепиновый цикл метильной группы. Как и ожидалось, стерически

неблагоприятные субстраты, такие как 6,6'-диметил-[1,1'-бифенил]2,2'-диамин (**7f**), не вступали в реакцию в оптимизированных условиях. Попытки провести реакцию с электроноакцепторным 5,5'-динитро-[1,1'-бифенил]-2,2'-диамином (**7g**) также потерпели неудачу (соединение **9ab**); реакция приводила к образованию сложной смеси трудноразделимых продуктов.

Было найдено, что в кислых условиях в присутствии воды синтезированные дибензо[*d,f*][1,3]дiazепины **9** могут претерпевать раскрытие 1,3-diazепинового цикла с образованием несимметрично замещенных *N*-арил оксамидов **10** – биологически активных соединений, эффективных хелатирующих лигандов и «строительных блоков» для создания антиферромагнитных систем и супрамолекулярных структур. Широкая серия алкил- и арилзамещенных оксамидов **10** была получена с выходами от 55 до 89% (схема 5).

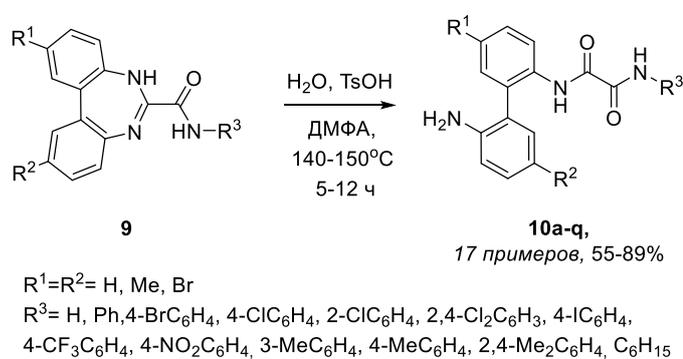


Схема 5. Получение несимметрично замещенных *N*-арил оксамидов.

Важно отметить, что при взаимодействии 2,2'-бифенилдиамина (**7a**) с хлоруксусной кислотой (**11a**) или этилхлорацетатом (**11b**) в присутствии элементарной серы в оптимизированных условиях в виде единственного продукта был выделен 5,7-дигидродибензо[*d,f*][1,3]diazепин-6-тион (**12**) с выходом 82 и 63%, соответственно (схема 6).

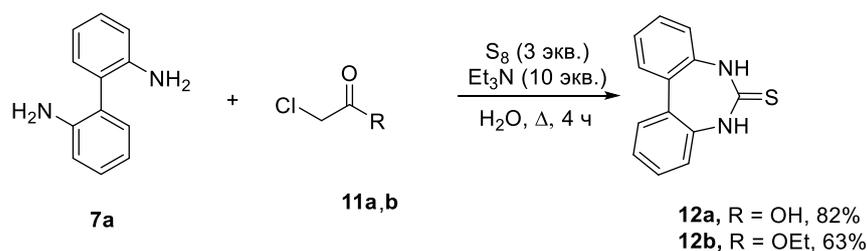


Схема 6. Синтез 5,7-дигидродибензо[*d,f*][1,3]diazепин-6-тиона (**12**).

Кроме того, было найдено, что все реакции могут быть легко масштабированы на мультиграммовые количества без потери выхода продукта вне зависимости от функциональных групп в производном хлоруксусной кислоты. Так, продукты **9c**, **9v**, **12** были получены в стандартных условиях с выходами 60-85% в количествах от 1.5 г до 1.9 г.

Важно отметить, что 5,7-дигидродибензо[*d,f*][1,3] diaзепин-6-тион (**12**) является ценным соединением, поскольку предоставляет доступ к созданию других функционализированных дибензо[*d,f*][1,3] diaзепинов. Схема 7 демонстрирует несколько примеров его трансформаций в продукты различной структуры. Было найдено, что десульфуризацией тиомочевины **12** в смеси H₂O/CH₃CN в присутствии карбоната серебра может быть получена 2,2'-бифениленмочевина (**13**). Также было показано, что алкилирование соединения **12** бромуксусной кислотой дает вторичный тиол **14** с удовлетворительным выходом. Ступенчатая обработка тиомочевины **12** метилйодидом и 2-амино-4,6-диметилпиримидином позволила получить циклический продукт **16** с выходом 76%.

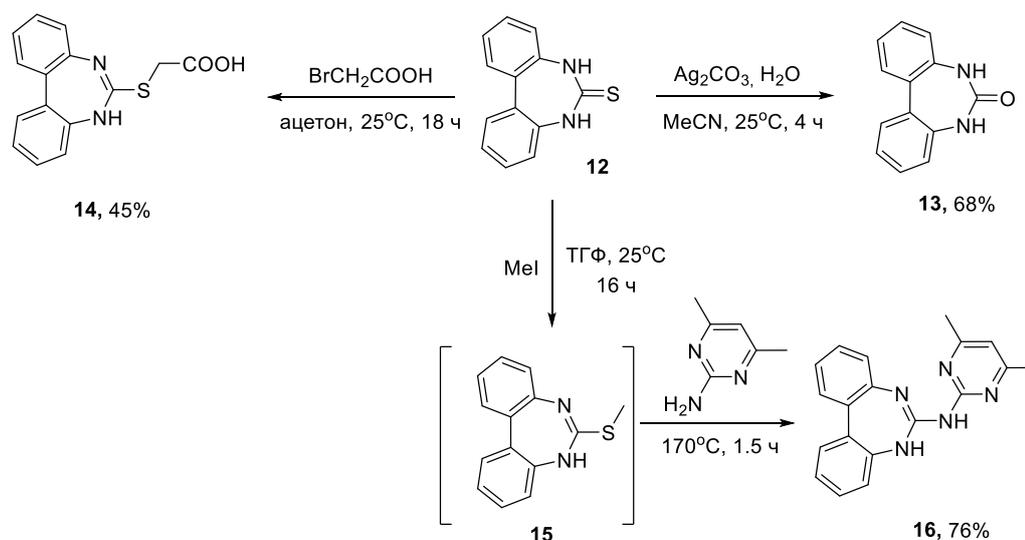


Схема 7. Трансформации 5,7-дигидродибензо[*d,f*][1,3] diaзепин-6-тиона (**12**).

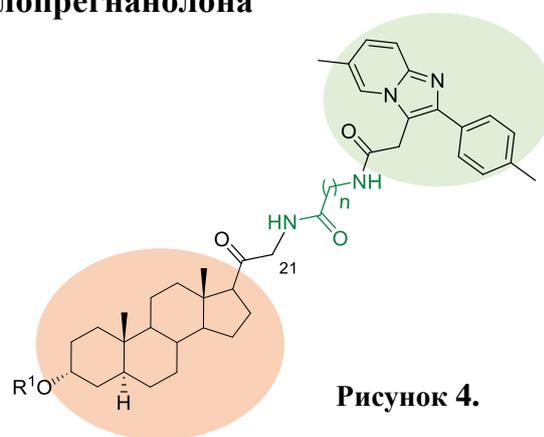
На базе НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова для всех полученных соединений **9** была *in vitro* определена степень сродства к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора методом радиолигандного конкурентного связывания при вытеснении [³H]Флунитразепама с мембраны нейронов мозга крыс. В качестве препарата сравнения использовался снотворный препарат *Золпидем*. Кроме того, была проведена оценка поведенческих эффектов серии полученных дибензо[*d,f*][1,3] diaзепинов *in vivo* в тесте «Новый аквариум» на модельных животных - рыбах вида *Danio rerio* семейства карповых (лат. *Cyprinidae*). Однако, ни в одном из тестов положительных результатов получено не было, полученные лиганды обладали низкой аффинностью к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора, а также не вызывали статистически достоверных изменений в характере поведения рыб. Таким образом было показано, что введение дополнительного аннелированного фрагмента в структуру классических бензодиазепиновых препаратов в рамках предложенного нами подхода приводит к полной потере ГАМК-модулирующей активности.

III. Синтез и оценка биологической активности гибридных модуляторов ГАМК_A-рецепторов

На следующем этапе работы представляло интерес изучить возможность получения гибридных лигандов на основе модуляторов ГАМК_A-рецепторов как эндогенного, так и экзогенного происхождения. В качестве объектов исследования нами были выбраны нейростероид аллопрегнанонон, производные авермектинов в сочетании с производным имидазо[1,2-*a*]пиридинового ряда (*Золтидем*), являющиеся эффективными модуляторами ГАМК_A-рецепторов, аффинными к различным специфическим сайтам связывания. Соединения подобного типа могут представлять как фундаментальный, так и практический интерес в качестве несимметричных аллостерических модуляторов ГАМК_A-рецепторов, способных связываться одновременно с несколькими сайтами мишени.

III.1. Гибридные производные Аллопрегнанонона

В качестве первого типа гибридных соединений с потенциальной ГАМК-модулирующей активностью были получены и исследованы производные аллопрегнанонона, содержащие имидазо[1,2-*a*]пиридиновый остаток в положении 21 через линкер варьируемой длины (рис.4).



Удобной функциональной группой для введения по положению 21 аллопрегнанонона линкеров различного строения была выбрана аминогруппа. Синтез производного аллопрегнанонона **19**, содержащего аминогруппу в положении 21, был реализован в две стадии из 21-бромпроизводного аллопрегнанонона **17** (схема 10). Ключевым промежуточным продуктом в синтезе амина **19** стал азид **18**, который был получен с выходом 72% обработкой соединения **17** азидом натрия при кипячении сухом ацетоне. Восстановление азиды **18** водородом в присутствии 10% Pd/C позволило с выходом 75% получить целевой амин **19**. (схема 8).

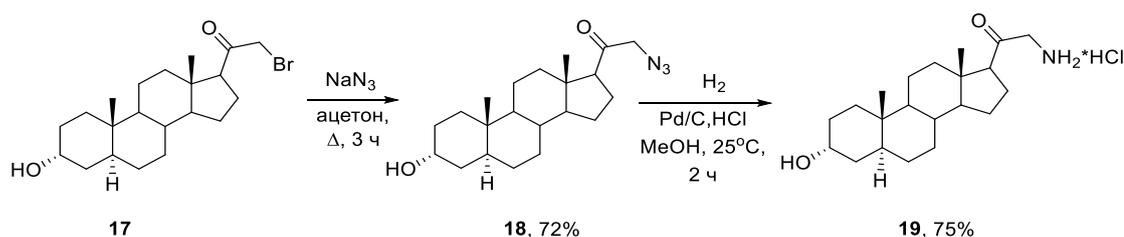


Схема 8. Синтез 21-аминозамещенного аллопрегнанонона **19**.

На финальной стадии синтез целевых гибридных соединений **29a-d** был реализован из амина **22a-d** и производного имидазо[1,2-*a*]пиридина **28**, полученного на основе кислоты **27** обработкой *N*-гидроксисукцинимидом (схема 12). Реакцию проводили при охлаждении в ДМФА в присутствии основания. Выходы продуктов **29a-d** составили от 41 до 78%.

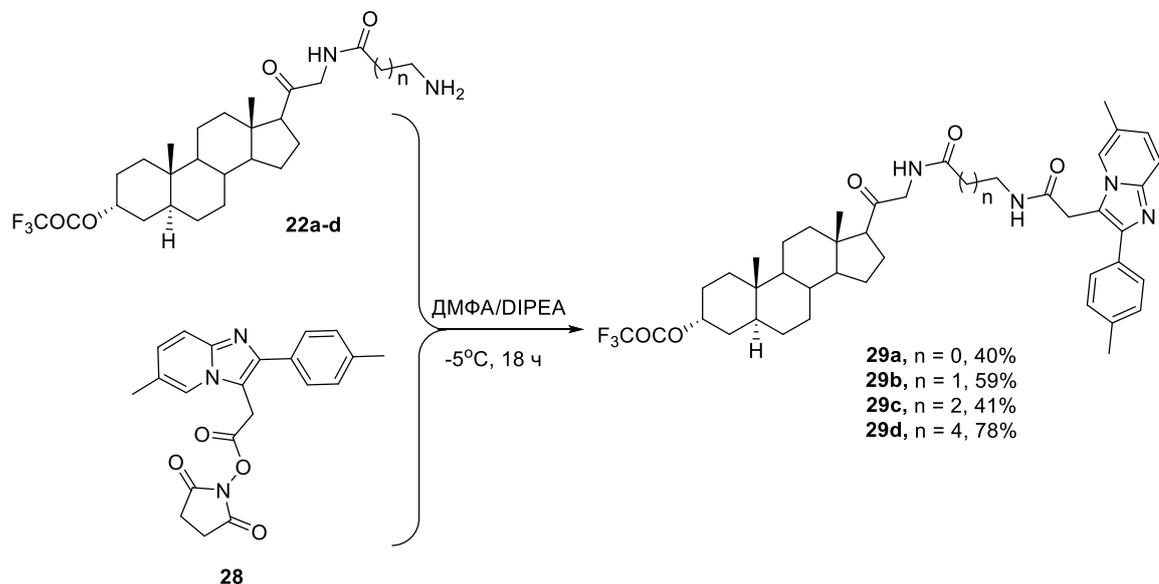


Схема 12. Синтез гибридных молекул **29a-d**.

Изучение ГАМК-модулирующей активности полученных гибридных молекул проводилось в комплексном исследовании включающем методики *in vitro* и *in vivo* на базах НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова, Научного Центра Неврологии, а также биологического модуля нашей лаборатории. В ходе изучения *in vitro* аффинности лигандов методом радиолигандного конкурентного связывания при вытеснении [³H]Флунитразема с мембраны нейронов было найдено, что несмотря на значительную потерю в аффинности относительно незамещенного предшественника имидазо[1,2-*a*]пиридинового фрагмента – *Золтидема* (IC₅₀ 43 нМ), большинство полученных лигандов сохранило способность связываться с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_A-рецептора в наномолярных концентрациях (IC₅₀ 297-831 нМ).

Однако, при переходе к исследованиям *in vivo*, в тесте «Новый аквариум» на модельных животных было найдено, что полученные гибридные лиганды не вызвали статистически достоверных изменений в характере поведения рыб. Одной из причин этого предположительно может являться блокирование трифторацетатной группой гидроксильного заместителя в положении 3 стероидного каркаса и, как следствие, нарушение способности стероидного фрагмента связываться со специфическими стероидными аллостерическими сайтами на поверхности ГАМК_A-рецептора.

III.2. Гибридные производные Авермектина В_{1а} и Ивермектина

В качестве второго типа гибридных соединений с потенциальной ГАМК-модулирующей активностью в работе были синтезированы и изучены структуры объединяющие в себе фармакофорные фрагменты лекарственных препаратов – авермектиновых производных и *Золтидема* (рис.5). Подобно нейростероидным соединениям, авермектины способны связываться со специфическими сайтами на поверхности ГАМК_A-рецептора и неселективно модулировать рецепторную функцию.

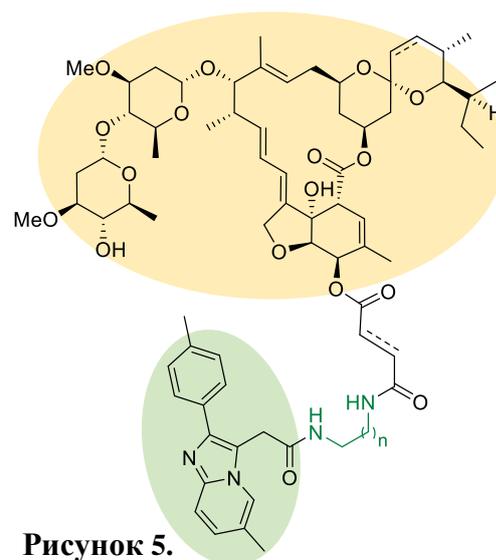


Рисунок 5.

Синтетический подход к исследуемым гибридным соединениям был предложен на основе литературных методик с использованием в качестве исходных субстратов Авермектина В_{1а} (**30**) и Ивермектина (**31**) (схема 13). На начальном этапе были получены макроциклические производные, несущие кислотные остатки в положении 5 (схема 13). Гемисукцинат Авермектина В_{1а} (**32**), гемисукцинат Ивермектина (**33**) и малонат Ивермектина (**34**) были получены обработкой авермектинов соответствующими ангидридами кислот. Региоселективность процесса достигалась за счет использования эквимольярной смеси реагентов в мягких условиях реакции. Продукты **32-34** были выделены с выходами 56–89%.

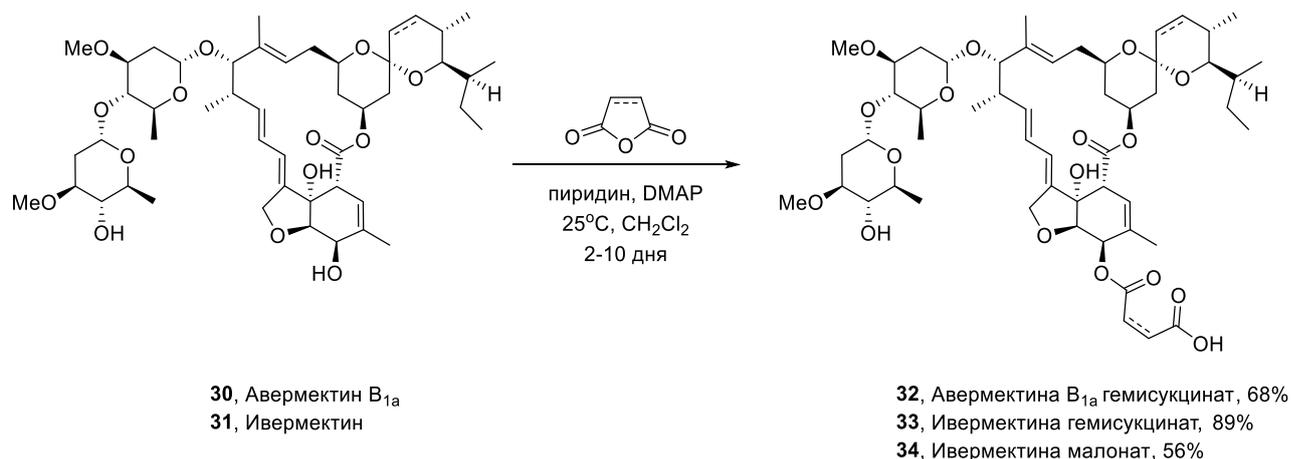


Схема 13. Получение сложноэфирных производных Авермектина В_{1а} и Ивермектина.

Синтез имидазо[1,2-*a*]пиридинового производного (схема 14), модифицированного линкерным фрагментом, осуществлялся на основе имидазо[1,2-*a*]пиридиновой кислоты **27**. Активация *in situ* кислотной функции соединения **27** *N*-гидроксисукцинимидом (NHS) с последующей конденсацией соответствующего имидазо[1,2-*a*]пиридинового производного с

Вос-замещенными аминами, позволила получить серию функционализированных имидазо[1,2-*a*]пиридинов **35a-g** с хорошими выходами. Последующее снятие *Boc*-группы с использованием ТФУК в CH_2Cl_2 привело к промежуточным соединениям **36a-g** с выходами от 70 до 81%.

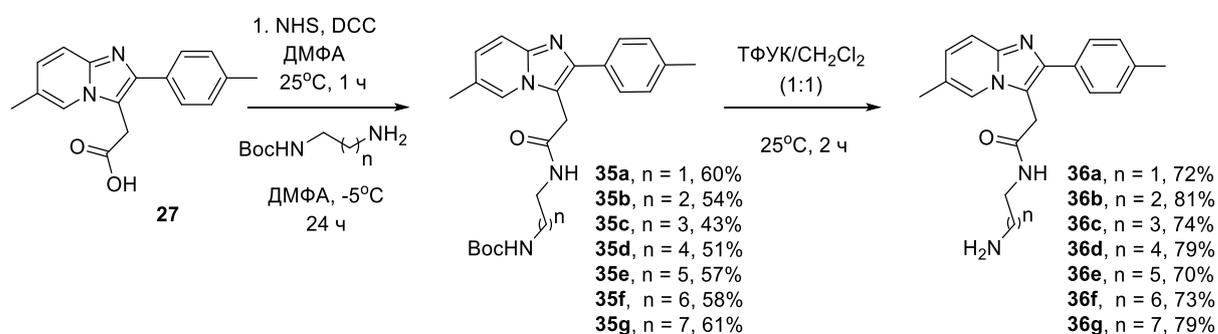


Схема 14. Синтез функционализированных имидазо[1,2-*a*]пиридинов **36a-g**.

Целевые гибридные молекулы на основе Авермектина В_{1а} были получены путем реакции сочетания имидазо[1,2-*a*]пиридинов **36a-g** с *NHS*-активированным гемисукцинатом Авермектина В_{1а} **37** (схема 15). Полная конверсия достигалась в основных условиях в ДМФА при -5°C в течение 24 часов. Продукты **37a-g** были выделены с выходами 38-78%.

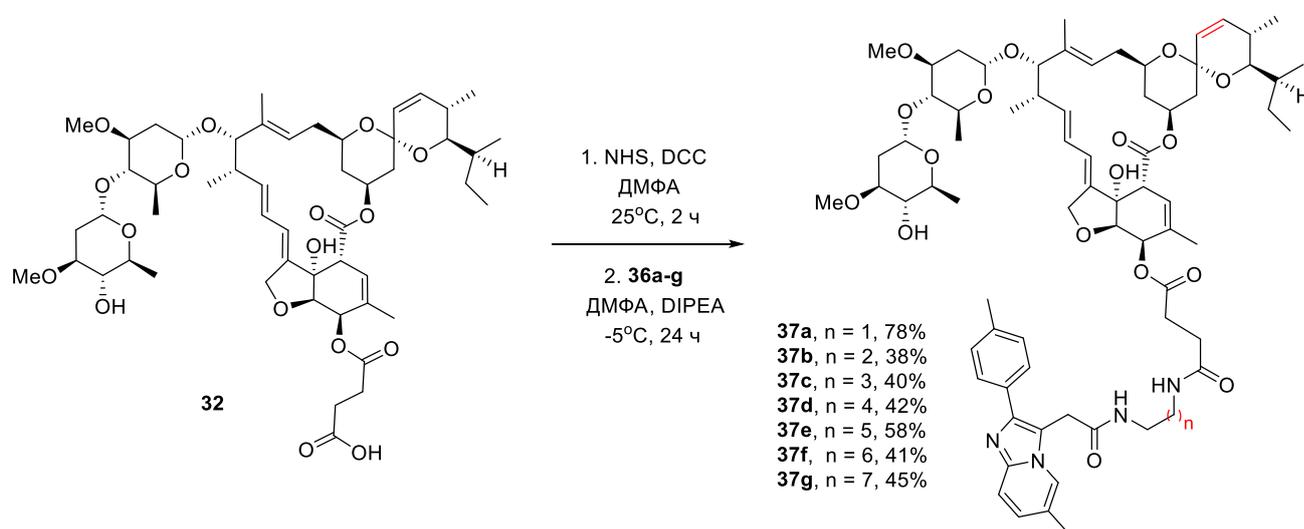


Схема 15. Синтез Авермектин В_{1а} – имидазо[1,2-*a*]пиридиновых гибридов **37a-g**.

Гибридные соединения на основе Ивермектина были получены с использованием аналогичного подхода обработкой имидазо[1,2-*a*]пиридинов **36a-g** *NHS*-активированными гемисукцинатом и малонатом Ивермектина **33** и **34** (схема 16). Целевые продукты **38** и **39a-g** были выделены с выходами 38-45% после очистки методом колоночной хроматографии.

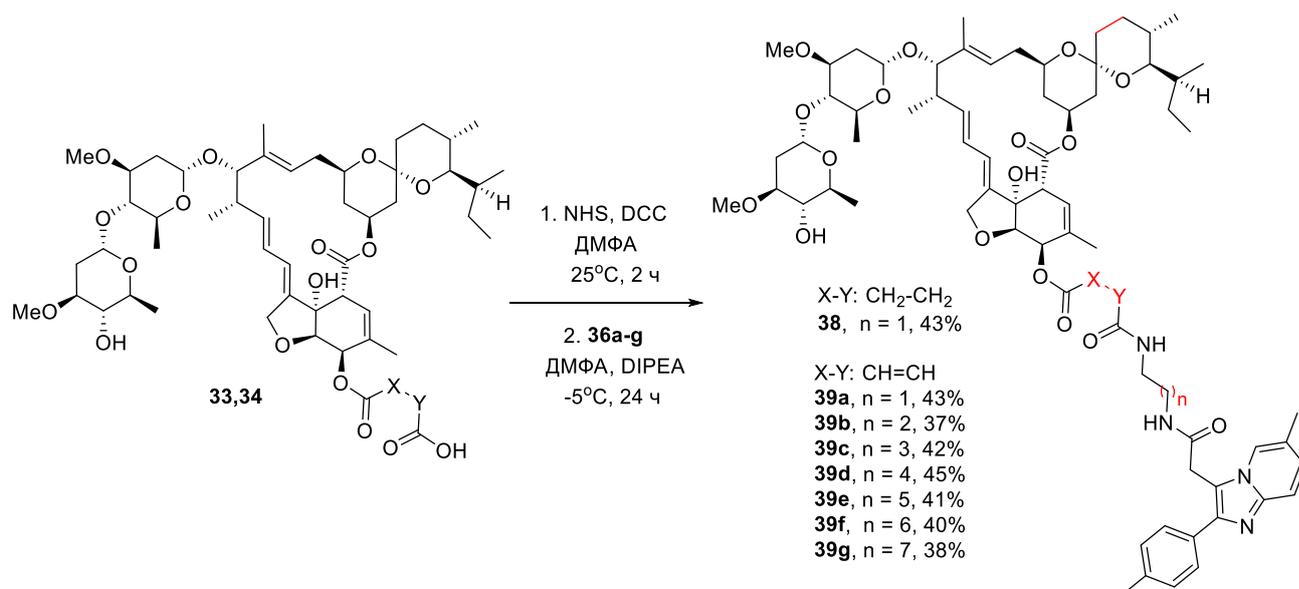


Схема 16. Синтез Ивермектин – имидазо[1,2-*a*]пиридиновых гибридов **38**, **39a-g**.

Все полученные гибридные молекулы **37-39** были изучены на предмет наличия ГАМК-модулирующей активности комплексом методов *in vitro* и *in vivo*. Аффинность соединений в отношении ГАМК_A-рецепторов была определена в тесте конкурентного радиолигандного связывания путем замещения связанного [³H]Флунитразема с ГАМК_A-рецепторов кортикальной коры крыс. В качестве препарата сравнения использовался *Золтидем* – близкий структурный аналог имидазо[1,2-*a*]пиридинового фармакофора. В ходе исследования было найдено, что два гибрида **37a** и **37e** на основе Авермектина В_{1a} проявляют сродство к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора на наномолярном уровне (IC₅₀ 359 и 207 нМ для соединений **37a** и **37e**, соответственно). В рамках изучения ГАМК-модулирующей активности *in vivo* все полученные лиганды были исследованы в тесте «Новый аквариум». Для полноценной характеристики поведенческих реакций у модельных организмов, индуцированных введением гибридных соединений, в качестве препаратов сравнения использовались Авермектин В_{1a}, Ивермектин и *Золтидем*. Следует отметить, что для получения сравнительных данных были исследованы не только растворы индивидуальных веществ, но и их смеси в комбинациях аналогичного состава полученных гибридных лигандов. Как и в случае оценки аффинности, наиболее активными показали себя гибриды **37a** и **37e** на основе Авермектина В_{1a}. Было найдено, что данные лиганды обладают выраженными поведенческими эффектами *in vivo*, при чем степень их активности напрямую коррелировала с длиной линкера (рис.6).

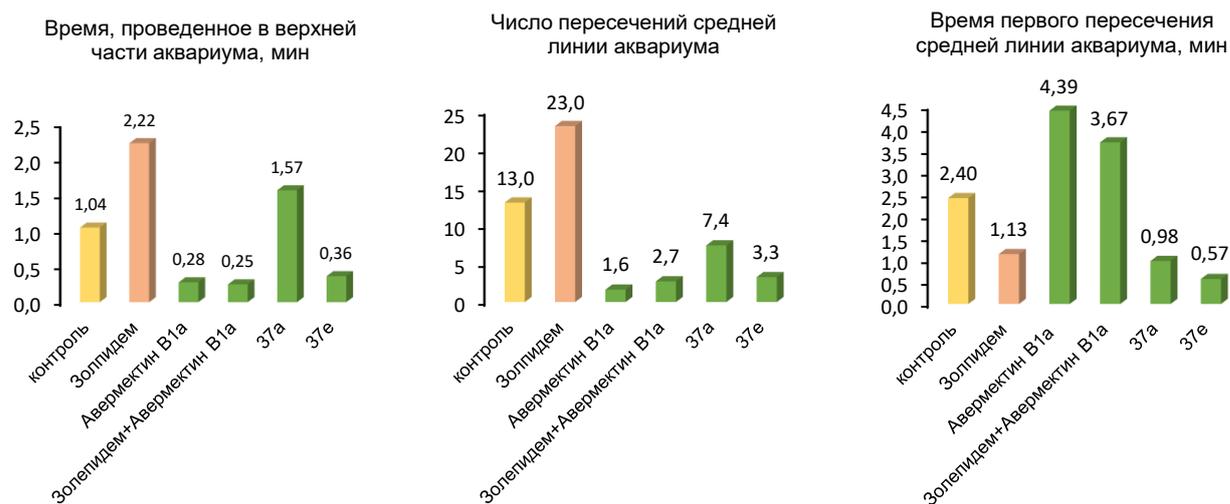


Рисунок 6. Влияние соединений **37а** и **37е** (концентрация 1 мг/л, 20-ти минутная экспозиция) на поведение Данио рерио в тесте «Новый аквариум».

Так, лиганд **37а** вызывал увеличение времени, проведенного в верхней части аквариума, уменьшая при этом число пересечений средней линии аквариума и снижая время первого всплытия, что является критериями анксиолитического влияния препаратов. При увеличении длины линкерного фрагмента (лиганд **37е**) поведенческие эффекты заметно усиливались с преобладанием тормозной активности. Кроме того, при введении растворов обоих лигандов регистрировались такие признаки анксиолитической активности как опущенный хвост и медленные движения у поверхности воды.

Данные результаты позволили предположить, что полученные нами гибридные лиганды действуют как двойные положительные аллостерические модуляторы, способные одновременно связываться как с бензодиазепиновым, так и с авермектиновыми сайтами на поверхности ГАМК_A-рецептора.

Подводя общий итог выполнения работы, можно отметить, что нами разработаны новые эффективные методы синтеза бензо[*d*]имидазо[2,1-*b*]тиазолов с амидными заместителями, функционализированных дибензо[*d,f*][1,3]диазепинов, *N*-арил замещенных оксамидов, кроме того предложены эффективные синтетические подходы к созданию гибридных производных на основе аллопрегнанолона, авермектинов и имидазо[1,2-*a*]пиридинов. Для всех полученных соединений впервые произведено исследование биологической активности комплексом методов *in vitro* и *in vivo*, по результатам которого выявлены наиболее перспективные с точки зрения ГАМК_A-модулирующей активности лиганды.

Выводы

1. Разработан эффективный метод синтеза бензо[d]имидазо[2,1-b]тиазолов с амидными заместителями, основанный на медь(I)-катализируемом трёхкомпонентном сочетании 2-аминобензотиазолов с ацетиленами и альдегидами. Получена широкая серия ранее неизвестных функционализированных бензо[d]имидазо[2,1-b]тиазолов.
2. Впервые показана эффективность приема тио-изостерной замены для препаратов имидазо[1,2-a]пиридинового ряда. На основании *in vitro* и *in vivo* экспериментов в ряду бензо[d]имидазо[2,1-b]тиазолов выявлены новые высокоэффективные модуляторы ГАМК_A-рецептора.
3. Предложен новый метод синтеза функционализированных дибензо[d,f][1,3]дiazепинов основанный на гетероциклизации 2,2'-бифенилдиаминов с производными галогенуксусной кислоты в присутствии молекулярной серы. Показано, что реакция носит общий характер для различных симметрично- и несимметрично-замещенных 2,2'-бифенилдиаминов, а также для амидов и эфиров хлоруксусной кислоты.
4. Разработана *one-pot* методика синтеза N-арил замещенных оксамидов из 2,2'-бифенилдиаминов, 2-хлорацетамидов, молекулярной серы и воды. Продемонстрирована общность подхода для различных 2,2'-бифенилдиаминов и 2-хлорацетамидов, предложены примеры постмодификации полученных оксамидов.
5. Предложен эффективный синтетический подход к ранее неизвестным имидазо[1,2-a]пиридиновым производным аллопрегнанолона, обладающим сродством к бензодиазепиновому сайту ГАМК_A-рецептора.
6. Разработан метод синтеза ранее неизвестных имидазо[1,2-a]пиридиновых производных авермектинов. За счет использования линкеров варьируемой длины получена представительная серия продуктов.
7. С помощью комплекса методов оценки ГАМК-модулирующей активности впервые показано, что имидазо[1,2-a]пиридиновые производные авермектинов могут рассматриваться как несимметричные гибридные модуляторы ГАМК_A-рецептора.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. I.V. Rassokhina, T.A. Tikhonova, S.G. Kobylskoy, I.Yu. Babkin, V.Z. Shirinian, V. Gevorgyan, I.V. Zavarzin, Y.A. Volkova. Synthesis of Imidazo[2,1-*b*]thiazoles via Copper-Catalyzed A³-Coupling in Batch and Continuous Flow // *J. Org. Chem.* – **2017**. – Т. 82, № 18. – С. 9682–9692.
2. T.A. Tikhonova, K.A. Lyssenko, I.V. Zavarzin, Y.A. Volkova. Synthesis of Dibenzo[*d,f*][1,3]Diazepines via Elemental Sulfur-Mediated Cyclocondensation of 2,2'-Biphenyldiamines with 2-Chloroacetic Acid Derivatives // *J. Org. Chem.* – **2019**. – Т. 84, №24. – С. 15817–15826.
3. T.A. Tikhonova, I.V. Rassokhina, E.A. Kondrakhin, M.A. Fedosov, J.V. Bukanova, A.V. Rossokhin, I.N. Sharonova, G.I. Kovalev, I.V. Zavarzin, Y.A. Volkova. Development of 1,3-Thiazole Analogues of Imidazopyridines as Powerful Positive Allosteric Modulators of GABA_A Receptors // *Bioorg. Chem.* – **2020**. – Т. 94. – С. 103334.
4. T.A. Tikhonova, N.V. Ilment, K.A. Lyssenko, I.V. Zavarzin, Y.A. Volkova. Sulfur-mediated synthesis of unsymmetrically substituted *N*-aryl oxalamides by the cascade thioamidation/cyclocondensation and hydrolysis reaction // *Org. Biomol. Chem.* – **2020**. – Т. 18, №26. – С. 5050-5060.
5. Т.А. Тихонова, Ю.А. Волкова, И.В. Заварзин. Разработка новых классов модуляторов рецепторов γ -аминомасляной кислоты типа А (ГАМК_А) // *VI Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии «МОБИ-ХимФарма2020»*, Нижний Новгород, **2020**, С. 236.
6. Т.А. Тихонова, Ю.А. Волкова, И.В. Заварзин. Новый метод синтеза дибензо[*d,f*][1,3]дiazепинов // *Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2019*, Красновидово, **2019**, С. 160.
7. Т.А. Тихонова, Н.В. Ильмент, Ю.А. Волкова, И.В. Заварзин. Диссимметризация дифенил-2,2'-диамина в условиях реакции Вильгеродта-Киндлера // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019»*, Москва, **2019**, С. 167.
8. T.A. Tikhonova, Y.A. Volkova, I.V. Zavarzin. Synthesis of dibenzo[1,3]diazepines // *The Fifth International Conference «Advances in Synthesis and Complexing»*, Москва, **2019**, С. 271.
9. Т.А. Тихонова, И.В. Рассохина. Синтез и оценка ГАМК_А-модулирующей активности имидазо[1,2-*a*]пиридиновых производных Авермектинов // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018»*, Москва, **2018**, С.167.
10. Т.А. Тихонова, И.В. Рассохина, Е.А. Кондрахин, Г.И. Ковалев, И.Н. Шаронова, Ю.А. Волкова, И.В. Заварзин. Имидазо[2.1-*b*]бензотиазолы: синтез и изучение ГАМК_А – модулирующей активности // *Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2018*, Красновидово, **2018**, С. 98.

11. T.A. Tikhonova, I.V. Rassokhina, E.A. Kondrakhin, I.N. Sharonova, G.I. Kovalev, Y.A. Volkova, I.V. Zavarzin. Imidazo[2.1-*b*]benzothiazoles: A Novel Molecular Scaffold for the GABA_A receptors modulators // *MedChem Russia 2017, 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry*, Казань, 2017, С. 86.