

На правах рукописи

КОРАБЛИНА ДИАНА ДМИТРИЕВНА

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
4,5-ДИГИДРО-1Н-ПИРАЗОЛА**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

Доктор фармацевтических наук, доцент

Каленикова Елена Игоревна

Кандидат химических наук

Ворожцов Николай Игоревич

Официальные оппоненты:

Белобородов Владимир Леонидович, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры химии Института фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Макаров Вадим Альбертович, доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией биомедицинской химии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «14» февраля 2019 г. в __ час. __ мин. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 201_ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.001,
кандидат химических наук, доцент

Успенская Елена Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Одной из важнейших задач фармацевтической химии является получение новых фармакологически активных соединений. Их исследование и выявление закономерности между строением и биологическими свойствами необходимы для создания препаратов, обладающих достаточной эффективностью и минимальной токсичностью.

В настоящий момент значительная часть синтетических лекарственных средств представлена различными азотистыми гетероциклическими соединениями. Среди них производные пиразола (метамизол натрия, фенилбутазон и др.) уже нашли своё применение в качестве ненаркотических анальгетиков, а исследования последних лет показывают наличие у этой группы веществ и других фармакологических эффектов.

В последнее время объектом пристального внимания исследователей, осуществляющих поиск новых фармакологически активных веществ, становятся координационные соединения переходных металлов. Для комплексов меди, никеля и некоторых других металлов с различными гетероциклическими лигандами есть данные о противоопухолевой и противомикробной активностях. Развитие химии 4,5-дигидро-1H-пиразола (пиразолина-2) в данном направлении является весьма перспективным по нескольким причинам. Во-первых, атомы азота этого гетероцикла способны участвовать в образовании координационной связи; при этом состав, геометрию и устойчивость таких координационных соединений с выбранным металлом можно варьировать путём введения различных заместителей в 1, 3 и 5 положения дигидропиразольного цикла. Кроме того, различные производные пиразолина обладают широким спектром биологической активности, и создание лигандов на их основе может способствовать проявлению большего фармакологического эффекта комплексного соединения.

Таким образом, перспективной представляется разработка методов синтеза и получение новых полифункциональных производных пиразолина, интересных как с точки зрения собственной биологической активности, так и возможности получения различных координационных соединений на их основе.

Цель работы. В соответствии с вышеизложенным, целью данной работы является получение новых производных 4,5-дигидро-1H-пиразола и их координационных соединений, обладающих биологической активностью.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать или разработать наиболее простые и оптимальные методы синтеза целевых бисгетероциклических производных 4,5-дигидро-1Н-пиразола и осуществить синтез ряда предложенных соединений, доказать их состав и структуру.

2. Изучить возможность комплексообразования полученных соединений. Подобрать оптимальные условия получения комплексов, установить их состав и структуру.

3. Провести первичный скрининг биологической активности полученных соединений.

Научная новизна. Осуществлён синтез ранее неизвестных бисгетероциклических производных на основе 4,5-дигидро-1Н-пиразола, содержащих пиридиновые, тетразольные, триазольные и тиогидантоиновые фрагменты. Изучено комплексообразование полученных веществ и установлены состав и структуры новых координационных соединений с солями меди и никеля. Впервые показано, что комплексообразование 3-пиридилпиразолинов с хлоридом меди (II) при комнатной температуре идет без окисления гетероцикла, тогда как в более жестких условиях на примере 1-ацетил-3-пиридил-5-фенилпиразолина зафиксировано окисление пиразолина в пиразол, сопровождающееся формированием координационного соединения другого состава, а затем деструкция цикла. Впервые зафиксировано раскрытие пиразолинового цикла в составе координационного соединения меди в среде метанола. Выявлено, что комплексообразование пиразолил-тиогидантоинового лиганда с перхлоратом меди сопровождается восстановлением Cu(II) до Cu(I).

Получены данные о цитотоксическом действии синтезированных органических соединений и их комплексов в отношении ряда опухолевых и неопухолевых линий клеток, а также изучена их антибактериальная и противовирусная активности *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе исследования разработаны или усовершенствованы препаративные методы синтеза 3-пиридил-4,5-дигидро-1Н-пиразолов с различными заместителями при N1, 4,5-дигидро-1- α -тетразолобензил-1Н-пиразолов и 5-пиразолинилметиленовых производных тиогидантоинов, а также их координационных соединений.

В рамках работы синтезировано 60 неописанных в литературе соединений. В результате их первичного биологического скрининга выявлено 3 вещества с высокой

активностью и селективностью в отношении вируса гриппа H1N1, а также показано, что 4,5-дигидро-3-(пиридин-2-ил)-5-(3,4,5-триметоксифенил)-1-фенилтиокарбамоил-1H-пиразол и несколько комплексов меди с лигандами на основе фенилтиокарбамоилдигидропиразола, обладают значительным цитотоксическим действием в отношении различных опухолевых линий клеток. Выявленные соединения-лидеры перспективны для более детального изучения механизмов их действия и дальнейшего целенаправленного синтеза активных родственных структур с целью создания оригинальных лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования. Теоретическую методологическую основу исследования составили данные работ российских и зарубежных ученых в области синтеза и исследования фармакологически активных соединений, в частности производных 4,5-дигидро-1H-пиразола. Для решения поставленных задач были использованы современные методы органического синтеза, выделения и очистки продуктов реакций. Для доказательства состава, строения и чистоты новых соединений применялся комплекс методов тонкослойной хроматографии, элементного анализа, ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения, рентгеноструктурного анализа.

Апробация результатов. Основные результаты работы представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2013-2016), Всероссийских научных конференциях студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2013, 2016), Международном кластере конференций по органической химии «DOCC-2016» (Домбай, 2016), Всероссийской конференции с международным участием «WSOC 2018. Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней» (Красновидово, 2018).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Синтез и строение новых производных 4,5-дигидро-1H-пиразола с фрагментами пиридина, тетразола, триазола и тиогидантоина;
2. Комплексообразующие свойства новых бисгетероциклических производных 4,5-дигидро-1H-пиразола;

3. Результаты исследования биологической активности полученных в работе веществ, выбор перспективных соединений для дальнейших фармакологических исследований.

Личный вклад автора. Автор непосредственно участвовал в поиске, анализе и обобщении данных научной литературы; синтезе органических и координационных соединений; подтверждении структур синтезированных соединений; обработке и обобщении полученных результатов биологических испытаний; апробации результатов исследования; подготовке и написании научных публикаций по результатам выполненной работы.

Соответствие работы паспорту научной специальности. Выполненная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», пункту 1 – исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

Публикации материалов исследования. Основные результаты научных исследований отражены в 12 публикациях: 4 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, 1 статья в сборнике конференции, 7 тезисов докладов на конференциях различного уровня.

Структура и объем работы. Материалы исследования изложены на 123 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений, списка литературы и приложений. Библиография включает 254 отечественных и зарубежных источника. Работа содержит 4 таблицы и 29 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературных данных показывает, что наличие и вид биологической активности производных дигидропиразола (пиразолина) в большинстве случаев зависит от вводимых в пиразолиновое ядро фармакофорных фрагментов и других заместителей. В связи с этим интересным представляется расширение возможностей химии данного класса соединений за счёт синтеза новых функционально-замещённых производных пиразолина. В качестве заместителей целесообразно выбрать фрагменты биологически активных молекул, содержащие гетероатомы, способные образовывать координационные связи, для создания гибридных структур на основе дигидропиразольного ядра, не только обладающих

собственным фармакологическим действием, но и являющихся хорошими комплексообразователями.

1. Синтез и строение новых производных 4,5-дигидро-1H-пиразола с фрагментами пиридина, тетразола, триазола и тиогидантоина

Анализ работ по синтезу производных дигидропиразола позволил предположить, что наиболее препаративным и удобным способом получения пиридин-пиразолиновых соединений является формирование пиразолинового цикла на основе пиридиновых аналогов халконов, полученных в свою очередь из 2-ацетилпиридина и соответствующего ароматического альдегида. Основываясь на данной стратегии, в рамках работы был осуществлён синтез 15 неизвестных ранее 3-пиридилпиразолиновых соединений с ацетильным, карбамоильным и тиокарбамоильными заместителями при первом атоме азота по схеме, представленной на рисунке 1.

Целевые соединения **3a, c, 4a-b, 5a-j** и **6** были синтезированы впервые, их состав и чистота однозначно подтверждаются данными элементного анализа, а строение – спектральными данными.

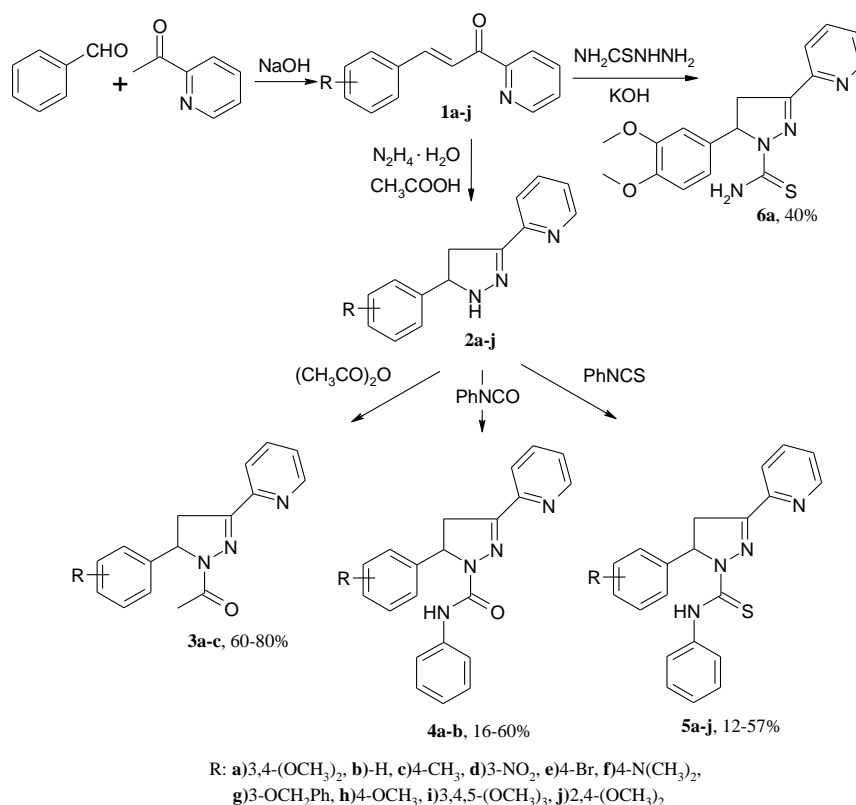
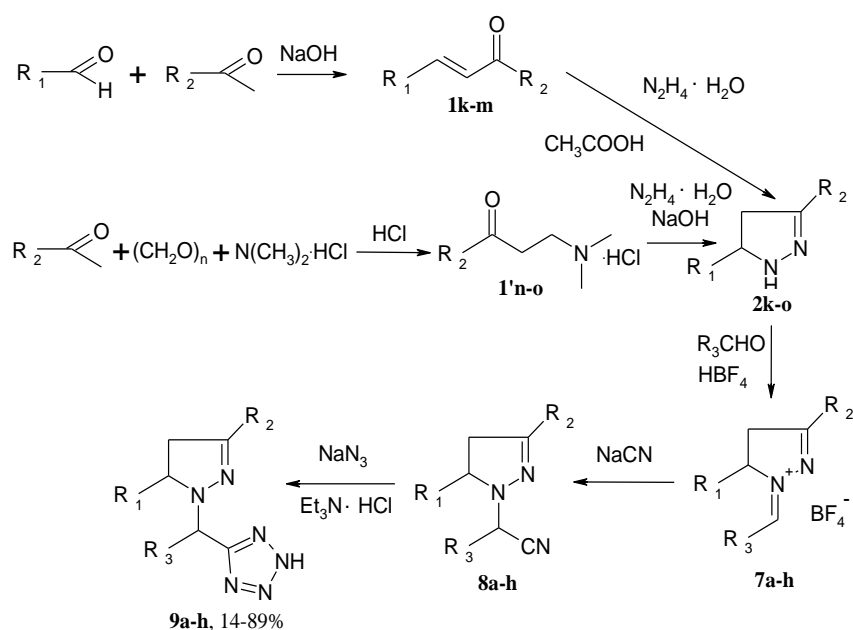


Рисунок 1 - Синтез целевых 3-пиридилпиразолиновых соединений (после шифров соединений указаны их выходы на последней стадии в процентах)

Ещё одной эффективной комбинацией гетероциклов в одной молекуле являются бисазольные структуры. Для того, чтобы соединения могли образовывать комплексы с переходными металлами, а также с учётом синтетической доступности исходных веществ было решено изучить возможность получения неизвестной ранее системы 5- α -(4,5-дигидропиразол-1-ил)-бензилтетразолов на основе 4,5-дигидро-1- α -цианобензил-пиразолов.

Итоговая последовательность проводимых реакций при получении целевого соединения представлена на рисунке 2.



- 1: k) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ph}$; l) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$; m) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{CH}_3$; 1': n) $R_2 = \text{Ph}$; o) $R_2 = 4\text{-ClPh}$;
 2: k) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ph}$; l) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$; m) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{CH}_3$; n) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ph}$;
 o) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = 4\text{ClPh}$;
 7, 8, 9: a) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{Ph}$; b) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$, $R_3 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$;
 c) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$, $R_3 = 4\text{-BrPh}$; d) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = 2\text{-OCH}_3\text{Ph}$;
 e) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{Ph}$; f) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = 4\text{-ClPh}$; g) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = 4\text{-OCH}_3\text{Ph}$;
 h) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = 4\text{-ClPh}$, $R_3 = 4\text{-BrPh}$;

Рисунок 2 - Синтез 5- α -(4,5-дигидропиразол-1-ил)-бензилтетразолов **9**

Нами было опробовано несколько методик с использованием различных мягких кислотных агентов, описанных в литературе по синтезу тетразольных производных на основе нитрилов. Наиболее удачным является проведение реакции в среде кипящего диоксана при постоянном перемешивании в течение 36 ч. По данной методике впервые удалось получить соединения **9a-h** с выходами от 14 до 98%.

Альтернативным вариантом создания бисазольной структуры является объединение двух фрагментов готовых исходных гетероциклов. Для сравнения биологической активности, с использованием коммерчески доступных аминотриазолов и аминотетразола в качестве исходных нами также было получено несколько неизвестных ранее оснований

Шиффа **10a-c** с 3-формилпиразолином **2''a** (см. рисунок 3). Было показано, что реакция образования оснований Шиффа **10a-c** протекает с хорошими выходами при кипячении в спирте и ограничена лишь набором исходных аминоазолов и 3-формилпиразолинов.

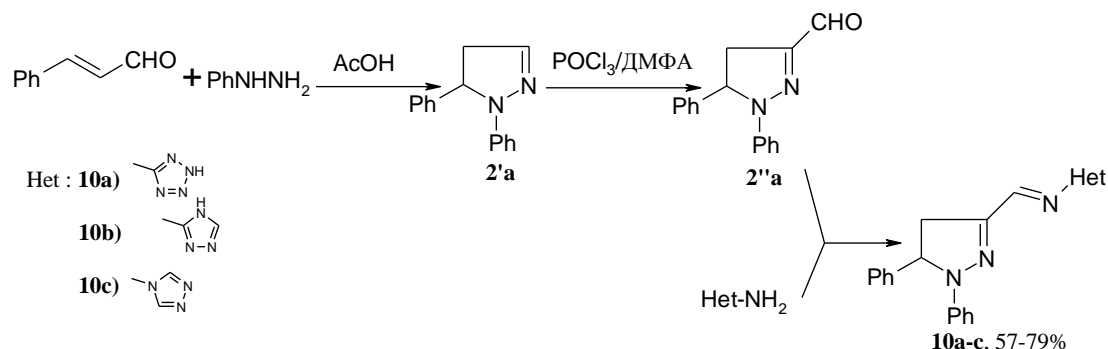
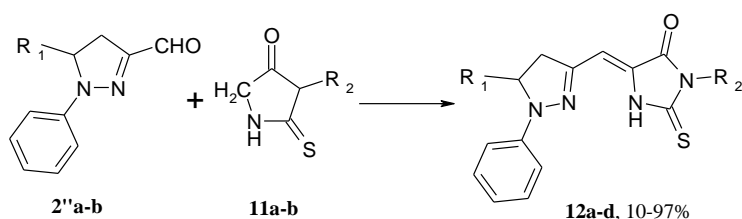


Рисунок 3 – Синтез соединений **10a-c**

Получение формилпиразолинов позволяет не только синтезировать различные основания Шиффа на их основе, как было отмечено выше, но и вводить их в реакции конденсации с гетероциклами, способными выступать в роли метиленовой компоненты. Одним из интересных вариантов таких гетероциклов являются тетрагидро-2-тиоксо-4Н-имидазол-4-оны (тиогидантоины). Первая стадия конденсации 3-формилпиразолинов и тиогидантоинов изображена на рисунке 4¹.



2'': a) $R_1 = \text{Ph}$; b) $R_1 = \text{H}$;
11: a) $R_2 = \text{All}$; b) $R_2 = \text{Ph}$;
12: a) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{All}$; b) $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ph}$; c) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{All}$; d) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ph}$

Рисунок 4 – Схема синтеза соединений **12a-d**

Установлено, что описанные в литературе методы получения 5-арилдензамещённых тиогидантоинов из соответствующих незамещённых тиогидантоинов применимы и в случае пиразолинидтиогидантоинов, но требуют небольшой модификации методов очистки. Таким образом, конденсацию исходных соединений **2''a-b** и аллилтиогидантоина **11a** проводили при кипячении в уксусной кислоте с добавлением безводного ацетата натрия, для фенилтиогидантоина **11b** более

¹ Исследование выполнено совместно с О.С.Григоркевич (дипломницей лаборатории БАОС кафедры органической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова)

удачным вариантом проведения реакции оказалась конденсация с формилпиразолинами **2''a-b** в спиртовом растворе КОН при комнатной температуре.

Стоит отметить, что полученные соединения **12a-d**, были выделены в виде единственных *Z*-измеров, что подтверждается наличием для каждого из них в спектрах ЯМР ^1H только одного сигнала винильного протона в области 6.13-6.45 м.д. Это согласуется с литературными данными о большей термодинамической стабильности *Z*-измеров других 5-арилидензамещённых тиогидантоинов и в данном случае также может быть связано с образованием внутримолекулярной водородной связи между N2 атомом пиразолина и NH группой тиогидантоина.

В спиртовом растворе КОН соединения **12** переходят в тиольную форму, что позволяет получать из них различные *S*-алкилпроизводные. При использовании в качестве алкилирующих агентов метилйодида и этилхлорацетата нами были получены соединения **13** и **14** (см. рисунок 5).

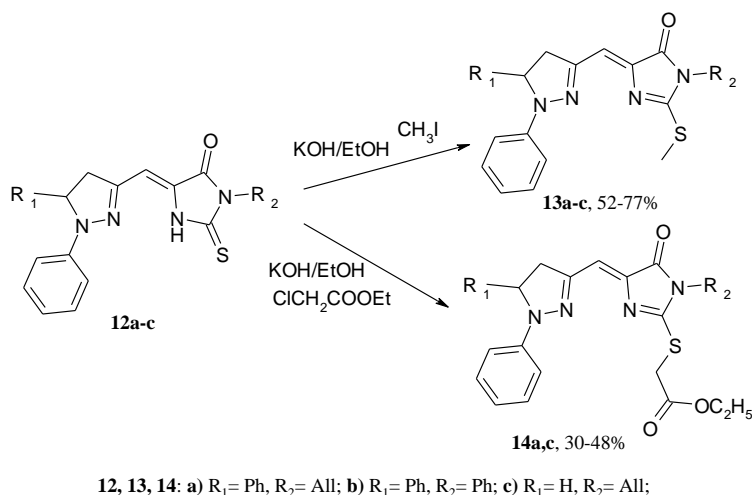


Рисунок 5 – Схема синтеза соединений **13, 14**

На примере соединения **13b** была показана возможность мягкого окисления 5-пиразолметилзамещённых *S*-алкилтиогидантоинов с хорошим выходом. Использование тетраацетата свинца позволяет селективно окислять пиразолиновый цикл в пиразольный, не затрагивая при этом другие фрагменты молекулы (см. рис.6).

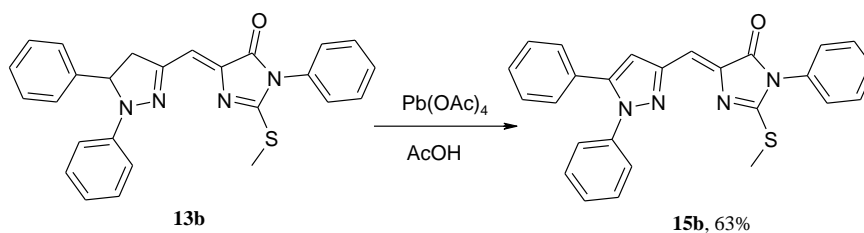


Рисунок 6 – Схема синтеза соединения **15b**

2. Комплексообразующие свойства новых бисгетероциклических производных 4,5-дигидро-1H-пиразола

Среди ряда синтезированных 3-пиридилпиразолиновых соединений меньшую способность к комплексообразованию проявили 1-ацетилпиразолиновые производные. Из трех полученных ацетилдигидропиразолов **3a-c** только для пиразолина с фенильным заместителем в 5 положении удалось выделить координационное соединение с хлоридом меди (II) **3.1b**, имеющее состав $L \cdot CuCl_2 \cdot H_2O$, строение которого подтверждается данными рентгеноструктурного анализа (РСА) (см. рисунок 7).

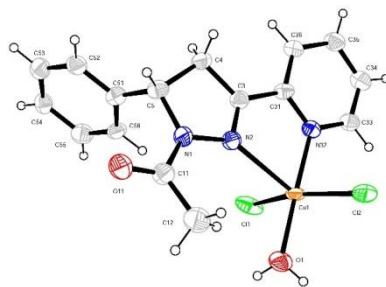


Рисунок 7 - Структура комплексного соединения **3.1b** по данным РСА

Установлено, что проведение реакции в более жестких условиях (кипячение в бутаноле) первоначально приводит к образованию того же комплекса **3.1b**, а затем преимущественному окислению пиразолина в пиразол, сопровождающемуся дезацилированием и формированием нового комплекса **3.1b'**, а также дальнейшей деструкции лиганда с появлением незначительного количества комплекса **3.1b''** (см. рисунок 8). В случае других ацетил-пиразолиновых лигандов выделить комплексы после проведения реакций в аналогичных условиях не удалось. Строение координационных соединений **3.1b'** и **3.1b''** также было подтверждено данными РСА.

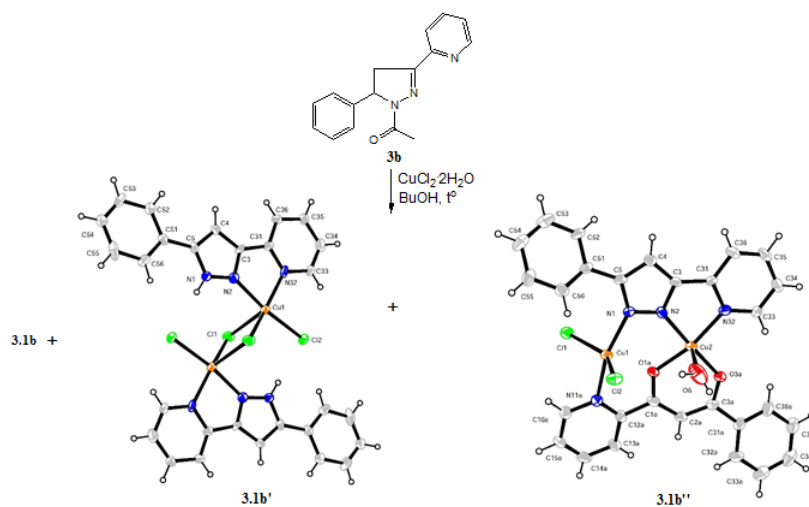


Рисунок 8 - Комплексообразование **3b** с $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ при кипячении в BuOH

Карбамоильные производные пиразолина **4a-b** при взаимодействии с $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ образуют комплексы **4.1a** и **4.1b** другого типа. На основании данных элементного анализа и ИК-спектроскопии для них можно предложить следующий состав и строение: $\text{L}_2 \cdot \text{CuCl}_2 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$, (см. рисунок 9).

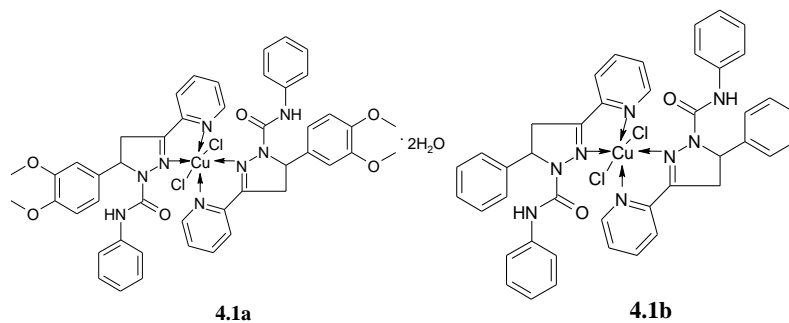


Рисунок 9 - Структуры комплексных соединений **4.1a** и **4.1b**

Комплексы **4.1a** и **4.1b** представляют собой порошки, которые имеют крайне низкую растворимость в ДМСО, практически нерастворимы в воде, спирте и других стандартных органических растворителях. Подобные физико-химические характеристики нежелательны для потенциальных лекарственных веществ, так как сильно осложняют проведение *in vitro* и *in vivo* исследований по оценке их биологической активности.

Наиболее удачными комплексообразователями оказались тиокарбамоильные производные дигидропиразола **5** и **6**. Для всех синтезированных веществ данного класса удалось получить координационные соединения с хлоридом меди (II) с соотношением лиганда к CuCl_2 1:1, что подтверждается данными элементного анализа, а строение - данными РСА.

Учитывая хорошие комплексообразующие свойства тиокарбамоильных производных пиразолина **5** и **6**, для части из них было также изучено взаимодействие с хлоридом никеля (II), так как для некоторых никелевых комплексов различных нециклических тиосемикарбазонов показано цитотоксическое действие на опухолевых линиях клеток. Было обнаружено, что фенилтиокарбамоилдигидропиразолы **5f-j** при взаимодействии с $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ образуют комплексы **5.2f-j** состава $\text{L}_2 \cdot \text{NiCl}_2 \cdot x(\text{solv})$, (где L – соединения **5f-j**, solv – молекулы растворителя), о чем свидетельствуют данные элементного анализа и РСА. Общая схема получения комплексных соединений из фенилтиокарбамоилпиразолинов представлена на рисунке 10.

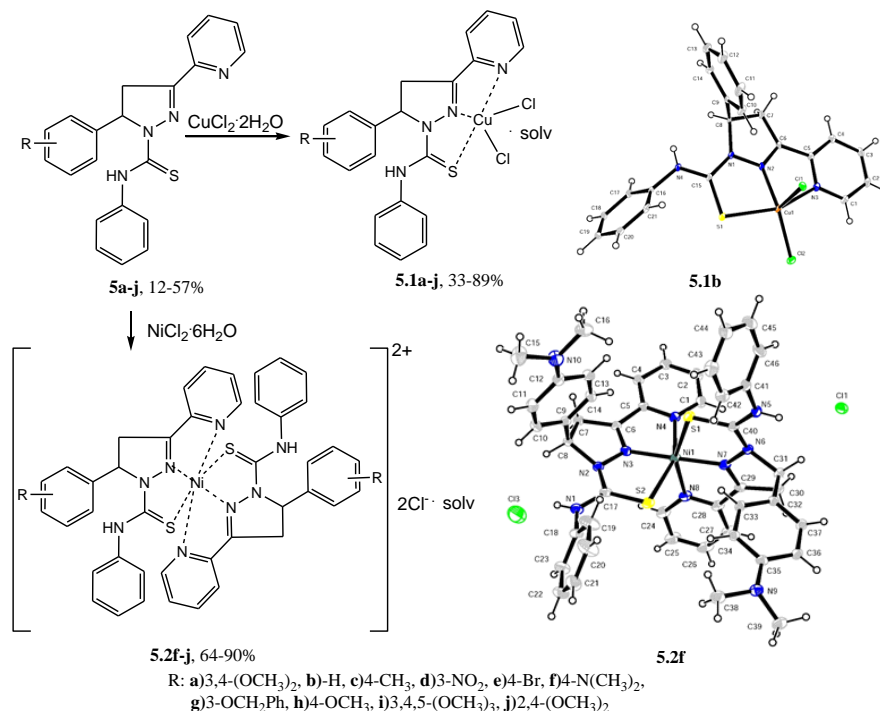


Рисунок 10 - Комплексообразование **5a-j** с $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ и $NiCl_2 \cdot 6H_2O$

УФ-спектры растворов всех никелевых комплексов **5.2f-j** имеют два заметных максимума поглощения: в области (338-341 нм), близкой к области абсорбции соответствующих лигандов, но с большей интенсивностью, и в области 413-418 нм, что соответствует d-d переходам никеля. В спектрах растворов координационных соединений меди **5.1g-j** можно видеть небольшой батохромный сдвиг максимума поглощения лиганда до 345-348 нм, едва заметное плечо, вероятно относящееся к переходам Cu(II), а также малоинтенсивную широкую полосу поглощения в видимой области с максимумом при 745-746 нм. Однако УФ спектр раствора координационного соединения меди **5.1f** в ДМФА заметно отличается от спектров аналогичных комплексов: он имеет два различных максимума поглощения при 348 и 507 нм.

Координационное соединение меди **5.1f**, для которого был получен необычный электронный спектр, отличается также и электрохимическим поведением от других медных комплексов изучаемой серии. Исследование данного вещества при помощи вращающегося дискового электрода (ВДЭ) показывает наличие анодного тока, характерного для перехода $Cu(I) \rightleftharpoons Cu(II)^2$. Для объяснения этих различий можно предположить два варианта процессов, происходящих в растворителе (ДМФА) с комплексом **5.1f**: электронный перенос с тиокарбамоилпиразолинового фрагмента на атом

² Исследование выполнено совместно с н.с. А.А. Моисеевой, проф. Е.К. Белоглазкиной на кафедре органической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

меди, характеризующий данный лиганд как неинноцентный, или раскрытие пиразолинового цикла, сопровождающееся образованием комплекса с раскрытой формой лиганда, стабилизированной за счёт донорных свойств *n*-диметиламинофенильного фрагмента. В пользу второго механизма свидетельствуют результаты дальнейших экспериментов. В разбавленном метанольном растворе **5.1f** при комнатной температуре образовались кристаллы нового соединения **5.1f'**, представляющего собой комплекс меди (II) с лигандом, являющимся продуктом раскрытия пиразолинового цикла (разрыв связи N1-C5) и присоединения одной молекулы метанола. Его строение было определено при помощи РСА (см. рисунок 11).

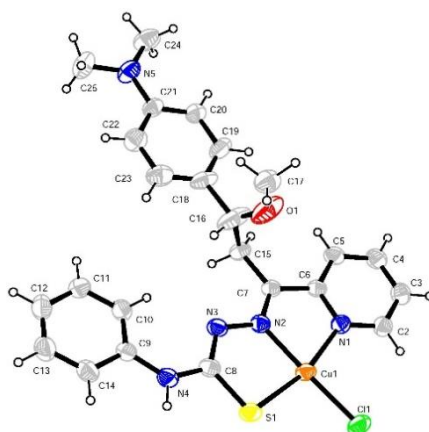


Рисунок 11 - Структура комплексного соединения **5.1f'** по данным РСА

Реакция комплексообразования тетразолилпиразолинов оказалась успешной только для производного **9f**, для которого было выделено координационное соединение с CuCl_2 . На основании данных элементного анализа соединения **9.1f** можно предположить, что состав полученного производного отвечает формуле $\text{L} \cdot \text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Пиразолидентиогидантоиновое производное **15b** показало интересные результаты при комплексообразовании с солями меди. Нам не удалось выделить координационное соединение при введении **15b** в реакцию с хлоридом меди (II), однако при взаимодействии с перхлоратом меди (II) были получены кристаллы, рентгеноструктурный анализ которых показал формирование комплекса **15.1b'** следующего состава $\text{L}_2 \cdot \text{CuClO}_4$ (см. рис.12). Лиганд при комплексообразовании не претерпевает никаких изменений, а восстановление меди(II) предположительно протекает за счет одного из растворителей (этанола).

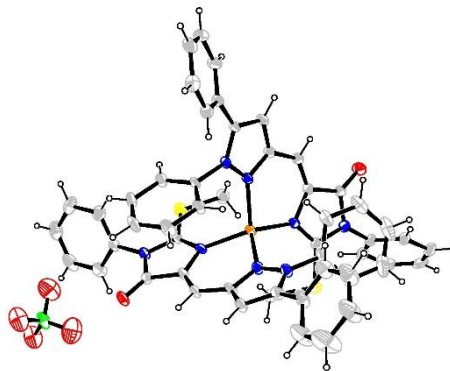


Рисунок 12 – Структура комплексного соединения **15.1b'** по данным РСА

3. Результаты исследования биологической активности полученных в работе веществ, выбор перспективных соединений для дальнейших фармакологических исследований

Все соединения, впервые полученные в данной работе, были испытаны на наличие антибактериальной активности³. Скрининг веществ на трансформированной pRFP CERTrpL2Ala плазмидой колонии клеток *E. coli* показал отсутствие у них значительного антибактериального действия (диаметр зон ингибирования тестируемых образцов был значительно меньше, чем эритромицина и левофлоксацина, взятых в качестве препаратов сравнения). Наиболее активными были пиразолин-тетразольные соединения **9f, h**, минимальные ингибирующие концентрации которых составили >200 и 50 мкг/мл, соответственно, тогда как для эритромицина и левофлоксацина это значения - 2.5 и 0.004 мкг/мл.

Для тиокарбамоилпиразолинов **5**, пиразолин-азолов **9, 10** и тиогидантоин-пиразолинов была также проведена первичная оценка противовирусного действия в отношении вируса гриппа H1N1 (A/Puerto Rico/8/34)⁴. Были определены следующие показатели: IC₅₀ - концентрация соединения, снижающая титр вируса вдвое по сравнению с контролем, CC₅₀ - концентрация соединения, при которых выживаемость клеток (не зараженных вирусом) в культуре составляла 50%. На основании полученных данных для каждого соединения рассчитывали индекс селективности (SI), представляющий собой отношение CC₅₀ к IC₅₀.

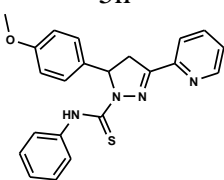
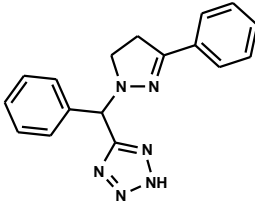
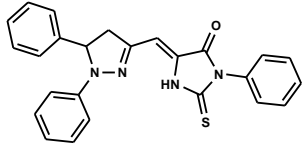
Учитывая быстрые темпы мутаций вируса гриппа целесообразно исследовать любые достаточно активные вещества с целью поиска соединений, действующих на штаммы,

³ Исследование проведено совместно со с.н.с. И. А. Остерманом на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

⁴ Исследование проведено совместно со с.н.с. В.В. Зарубаевым и н.с. А.В. Галочкиной в лаборатории экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

резистентные к существующим препаратам. Лучшие результаты показали три соединения (см. таблицу 1), относящиеся к разным классам синтезируемых в данной работе веществ: тиокарбамоилпиразолин **5h**, пиразолин-тетразольное производное **9e** и пиразолинил-тиогидантоин **12b**, значения индексов селективности которых значительно превышают соответствующее значение римантадина (SI=6), но меньше, чем аналогичный показатель осельтамивира (SI=833).

Таблица 1 – Противовирусная активность полученных соединений (вирус гриппа H1N1 A/Puerto Rico/8/34)

Соединение	CC ₅₀ , μM	IC ₅₀ , μM	SI
<p>5h</p> 	>772	25±4	30
<p>9e</p> 	228±15	13±2	18
<p>12b</p> 	>1178	13±2	93
Римантадин*	1743	330	6
Осельтамивир*	>160	0.192	833

*(Voronov A.A. et al. // Tetrahedron lett., 2018. Vol. 59, № 12. P. 1108–1111)

Цитотоксическое действие 3-пиридилпиразолиновых соединений и их комплексов исследовалось методом МТТ-теста (по способности восстановления желтой соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтераразола в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток) на опухолевых и неопухолевых клеточных линиях⁵: НСТ116 (рак толстой кишки), ФК (неопухолевые фибробласты кожи человека), K562 (миелоидный лейкоз), A549 (карцинома легкого), MCF7 (рак молочной железы), VA13

⁵ Исследование проведено совместно с А.Н. Атаевой (студ. ФММ МГУ), Б.В.Махмудовой (студ. ФММ МГУ) и н.с А.А. Марковой (ИНЭОС РАН) в лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ (зав.лаб. д.м.н. А.А. Штиль), а также с.н.с. Д.А. Скворцовым на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

(эмбриональные фибробласты легкого человека), НЕК293 (эмбриональные клетки почек человека). Препараты сравнения: доксорубин (докс.) и цисплатин (цисп.).

Большинство рассматриваемых 3-пиридилпиразолиновых лигандов (**3b**, **5b-j**) не обладает значительной цитотоксичностью ($IC_{50} > 50 \mu M$), за исключением соединения **5i**, которое было протестировано на трёх клеточных линиях. Значения IC_{50} данного вещества в отношении клеток рака толстой кишки (HCT116) и неопухолевых фибробластов кожи человека составляют $3,4 \pm 1,1$ и $3,5 \pm 0,5 \mu M$ соответственно, и несколько ниже для линии клеток миелоидного лейкоза K562 ($0,8 \pm 0,1 \mu M$), что в целом сопоставимо со значениями IC_{50} препаратов сравнения.

Возможное объяснение особенной активности соединения **5i** заключается в том, что это вещество содержит триметоксифенильный фрагмент в 5 положении пиразолина, что делает его похожим по структуре на известный ингибитор полимеризации тубулина - Комбретастатин А4 (см. рис. 13).

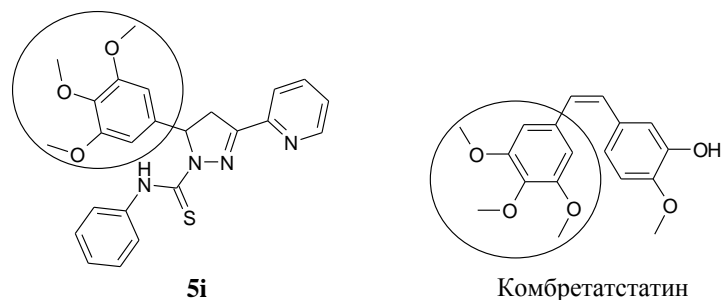


Рисунок 13 – Структуры соединения **5i** и Комбретастатина А4

Результаты исследования цитотоксичности координационных соединений представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения IC_{50} координационных соединений на опухолевых и неопухолевых линиях клеток

Шифр	IC_{50} , μM						
	Опухолевые линии				Неопухолевые линии		
	HCT116	K562	A549	MCF7	ФК	VA13	НЕК293
3.1b	29,6±4,4	17,8±0,7	22.0±8.3	48.2±21.3	17,9±0,8	39.6±8.4	19.1±9.6
5.1b	2,8±0,4	2,1±0,2	11.6±1.7	9.9±0.3	4,3±0,3	11.0±2.1	8.0±1.5
5.1c	2,7±0,4	0,7±0,1	9.5±0.8	12.1±1.5	4,3±0,2	8.2±0.5	8.1±1.3
5.1d	27,9±4,2	15±0,9	20.7±0.8	23.2± 0.9	34,2±3,9	19.2±3.7	12.9 ±2.2
5.1e	2,8±0,3	1,2±0,2	14.4±1.5	24.1± 1.7	5,7±0,9	9.4 ±0.3	7.4± 2.5

5.1f	0,6±0,1	0,7±0,1	–	–	1,2±0,1	–	–
5.1g	>50	14,4±1,9	–	–	3,5±0,9	–	–
5.1h	4,9±0,3	2,9±0,4	–	–	2,3±0,2	–	–
5.1i	2,3±0,2	1,2±0,2	–	–	2,8±0,4	–	–
5.1j	2,3±0,2	1,8±0,3	–	–	1,4±0,2	–	–
5.2f	>50	2,2±0,1	–	–	0,9±0,1	–	–
5.2g	>50	7,9±3,2	–	–	>50	–	–
5.2h	>50	4,5±0,7	–	–	14,9±4,8	–	–
5.2i	3,4±1,9	1,1±0,2	–	–	6,7±2,2	–	–
5.2j	>50	16,6±2,5	–	–	48,1±7,7	–	–
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	>50	18,4±2,1	–	–	>50	–	–
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	>50	>50	–	–	>50	–	–
Докс.	0,7±0,1	0,8±0,2	2.0±0.8*	2.1±0.8*	0,7±0,1	–	1.1±0.1*
Цисп.	20,6±0,8	2,1±0,4	>30*	64.13±3.9*	4,4±1,7	–	12.4±3.9*

*(Majouga A.G. et al. // J. Med. Chem. 2014. Vol. 57, № 14. P. 6252–6258.)

Исследуемые комплексы меди (**3.1b**, **5.1b-j**) проявили значительно бóльшую цитотоксичность, чем хлорид меди (II) на тех же клеточных линиях, в концентрациях близких к концентрациям препаратов сравнения. В отношении клеточной линии рака толстой кишки HCT116 большинство протестированных координационных соединений меди (за исключением **3.1b**, **5.1d**, **5.1g**) были активнее цисплатина, а наиболее активный комплекс **5.1f** ($IC_{50}=0,6\pm0,1$ μ M) сопоставим по значению IC_{50} с доксорубицином ($IC_{50}=0,7\pm0,1$ μ M). На линию клеток миелоидного лейкоза K562 из десяти протестированных комплексов меди семь (**5.1b**, **с**, **е**, **f**, **h**, **i**, **j**) действовали на уровне концентраций обоих препаратов сравнения, а наиболее активными были соединения **5.1c** и **5.1f** ($IC_{50}=0,7\pm0,1$ μ M). Цитотоксичность всех исследованных медных комплексов на клетках линий A549 (карцинома легкого) и MCF7 (рак молочной железы) была выше, чем цисплатина, но меньше доксорубина. В тестах на неопухолевых фибробластах кожи человека токсичность всех координационных соединений меди оказалась чуть ниже, чем доксорубина, и для трёх соединений (**3.1b**, **5.1d**, **е**) также ниже, чем цисплатина. В целом, наиболее интересные результаты показали комплексы меди **5.1b**, **с**, **е**, **f**, **i**, значения IC_{50}

которых на опухолевых линиях были не только сопоставимы с соответствующими значениями доксорубицина и цисплатина, но и несколько ниже, чем на неопухолевых.

Хлорид никеля и его комплексы (**5.2f-j**) неодинаково действовали на различные клеточные линии. Так, клетки миелоидного лейкоза человека K562 и фибробласты кожи были более чувствительны к никельсодержащим веществам в условиях проводимых экспериментов. В целом, комплексы никеля были активнее, чем $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, однако единственным соединением с достаточно высокой цитотоксичностью в отношении клеток рака толстой кишки человека HCT116 было **5.2i** ($\text{IC}_{50} 3,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$), что, возможно, связано с активностью самого лиганда **5i**, о которой было написано ранее.

Для оценки целесообразности дальнейших исследований органических соединений, показавших лучшие результаты в данной работе, были рассчитаны их некоторые физико-химические и ADME параметры с использованием онлайн-платформы FAF-Drugs3 (см. таблицу 3).

Таблица 3 – Основные физико-химические характеристики соединений **5h**, **5i**, **9e**, **12b**

Соединение	MW, г/моль	logP	logD	tPSA, Å	RB	HBD	HBA	S, г/л *	Липински	Вебер
5h	388.49	3.92	4.70	81.84	6	1	5	3,9	+	+
5i	448.54	3.86	4.39	100.30	8	1	7	3,8	+	+
9e	304.35	2.71	2.18	69.87	4	1	6	9,3	+	+
12b	424.52	4.68	5.49	80.03	4	1	5	1,9	+	+

* В соответствии с расчётными данными соединения **5h**, **5i**, **9e**, **12b** «мало растворимы» в воде в терминах ГФ (для растворения 1 г вещества требуется от 100 до 1000 мл растворителя).

Согласно правилу Липински, молекула действующего вещества потенциального лекарственного средства для перорального приёма должна иметь не более одного отклонения от следующих критериев: $\log P \leq 5$, молекулярный вес ≤ 500 , количество акцепторов водородной связи ≤ 10 и число доноров водородной связи ≤ 5 . Согласно правилу Вебера число вращающихся связей (RB) должно быть ≤ 10 и площадь топологической полярной поверхности молекулы $t\text{PSA} \leq 140 \text{Å}$, или сумма доноров и акцепторов водородной связи (HBD + HBA) должна быть ≤ 12 , чтобы соединение обладало хорошей биодоступностью при пероральном приёме.

Значения основных физико-химических параметров органических соединений **5h**, **5i**, **9e**, **12b**, показавших в рамках настоящей работы лучшие результаты *in vitro*, соответствуют первичным критериям, предъявляемым к потенциальным молекулам

лекарственных средств, что свидетельствует о перспективности проведения дальнейших исследований механизма их действия.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны и оптимизированы условия получения новых производных 4,5-дигидро-3-пиридил-1H-пиразола с различными заместителями при N1, 1- α -тетразолобензилпиразолинов-2 и 5-пиразолинилметиленовых производных тиогидантоинов. Синтезирована библиотека 60 неизвестных ранее веществ: бисгетероциклических производных пиразолина-2 и их координационных соединений.
2. Изучено комплексообразование бисгетероциклических производных 4,5-дигидро-1H-пиразола с солями меди(II) и никеля. Установлены состав и структура полученных координационных соединений. Впервые зафиксировано раскрытие пиразолинового цикла в составе координационного соединения меди под действием внешнего нуклеофила (метанола). Показано, что формирование комплекса пиразолил-тиогидантоинового лиганда с перхлоратом меди(II) при проведении реакции в спиртовых растворах сопровождается восстановлением Cu(II) до Cu(I).
3. Выявлены три соединения, обладающие значительным селективным действием в отношении вируса гриппа H1N1.
4. Показано, что координационные соединения меди с 3-пиридилпиразолиновыми производными, а также один из лигандов данного класса обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеточных линий в концентрациях, сопоставимых с концентрациями препаратов сравнения (доксорубин, цисплатин), что говорит о перспективности дальнейших фармакологических исследований этих соединений.

Перспективы дальнейшей разработки темы:

Полученные результаты предварительного скрининга биологической активности *in vitro*, а также расчётные данные некоторых физико-химических параметров наиболее активных органических соединений, синтезированных в рамках данной работы, указывают на целесообразность более детального изучения механизмов их действия и подтверждают важность дальнейших исследований бисгетероциклических производных дигидропиразола и их координационных соединений как потенциальных фармацевтических субстанций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фармакологическая активность производных 4,5-дигидропиразола (обзор) / Д. Д. Кораблина, Н. И. Ворожцов, Л. А. Свиридова, Е. И. Каленикова, О. С. Медведев // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2016. — Т. 50, № 5. — С. 3–18.

Pharmacological activity of 4,5-dihydropyrazole derivatives (review) / D. D. Korablina, N. I. Vorozhtsov, L. A. Sviridova, E. I. Kalenikova, O. S. Medvedev // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. — 2016. — Vol. 50, no. 5. — P. 281–295.

2. The first example of Cu(I) complex with 5-pyrazolyl-2-thioxotetrahydro-4h-imidazol-4-one: synthesis and structural characterization / Е. К. Белоглазкина, N. I. Vorozhtsov, L. A. Sviridova, O. S. Grigorkevich, D. D. Korablina, A. A. Moiseeva, N. V. Zyk, A. G. Majouga // *Inorganic Chemistry Communication*. — 2016. — Vol. 71. — P. 86–89.

3. Синтез 5-(пиразолин-3-илметилен)-2-тиогидантоинов и 2-алкилсульфанил-5-(пиразолин-3-илметилен)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов / Н. И. Ворожцов, Л. А. Свиридова, О. С. Григоркевич, Д. Д. Кораблина, Е. К. Белоглазкина, А. Г. Мажуга, Н. В. Зык. // *Известия Академии наук. Серия химическая*. — 2017. — № 3. — С. 506–510.

Synthesis 5-(pyrazolin-3-ylmethylidene)-2-thiohydantoins and 2-alkylsulfanyl-5-(pyrazolin-3-ylmethylidene)-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-ones / N. I. Vorozhtsov, L. A. Sviridova, O. S. Grigorkevich, D. D. Korablina, E. K. Beloglazkina, A. G. Majouga, N. V. Zyk. // *Russian Chemical Bulletin*. — 2017. — Vol. 66, no. 3. — P. 506–510.

4. Synthesis of 3-(pyridine-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-thiocarboxamides and their copper(II) complexes / Е. К. Белоглазкина, D. D. Korablina, N. I. Vorozhtsov L. A. Sviridova, A. A. Moiseeva, D. A. Skvortsov, V. B. Rybakov, A. G. Majouga, N. V. Zyk. // *Arabian Journal of Chemistry*. — 2017. [DOI 10.1016/j.arabjc.2017.01.005].

5. Координационные соединения производных пиразолина: перспективы применения в биологии и медицине / Д.Д. Кораблина // Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего». Журнал "Фармация", специальный выпуск. — СПбХФА Санкт-Петербург, 2016. — С. 142–145.

6. Синтез 5- α -(4,5-дигидропиразололил-1)-бензилтетразолов / Д.Д. Кораблина // Материалы XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». — М.: МАКС Пресс, 2013.

7. Синтез новых производных пиразолинов-2, содержащих фармакофорный фрагмент тетразола / Д.Д. Кораблина // Сборник материалов III Всероссийской научной

конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». — СПб.: Изд-во СПХФА, 2013. - с.17-18.

8. Синтез 3-замещенных-5-(1,5-дифенилпиразолил-3)метилена-2-тиоксотетрагидро-4Н-имидазол-4-она и изучение комплексообразования полученных соединений / О.С. Григоркевич, Д.Д. Кораблина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2014». [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2014, URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/section_30_2744.htm.

9. Синтез новых комплексных соединений меди с производными 4,5-дигидро-1Н-пиразола / Д.Д. Кораблина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2015». [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2015, URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/section_32_7115.htm.

10. Необычные превращения 1-ацетил-3-(пиридил-2)-5-фенил-4,5-дигидропиразола при комплексообразовании с хлоридом меди (II) / Д.Д. Кораблина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2016». [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2016, URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2016/data/section_11_8608.htm.

11. 1-Acetyl-3-(pyridyl-2)-5-phenyl-4,5-dihydropyrazole copper complexes / D. D. Korablina, N. I. Vorozhtsov, E. K. Beloglazkina, L.A. Sviridova, E.I. Kalenikova // Dombay Organic Conference Cluster DOCC-2016. Book of abstracts. — Dombay, Russia, 2016, P.290.

12. Координационные соединения 3-пиридилпиразолиновых производных: синтез и биологическая активность / Д. Д. Кораблина, Н. И. Ворожцов, Е. К. Белоглазкина, Свиридова Л.А., Скворцов Д.А., Атаева А.Н., Махмудова Б.В., Маркова А.А., Штиль А.А. // WSOC 2018. Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней. Сборник тезисов. — 2018, с.128.

Кораблина Диана Дмитриевна

(Российская Федерация)

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ 4,5-ДИГИДРО-1Н-ПИРАЗОЛА**

Диссертационное исследование посвящено синтезу новых функционально замещенных производных 4,5-дигидропиразола, содержащих гетероциклические фрагменты (пиридина, тетразола, триазола, тиогидантоина) и их координационных соединений, а также изучению биологической активности полученных веществ.

Показано, что среди полученных целевых бисгетероциклических производных дигидропиразола при комплексообразовании с солями меди и никеля лучшими лигандами являются 3-пиридилпиразолины-2, в особенности фенилтиокарбамоильные производные, образующие устойчивые хелатные соединения различного строения в зависимости от центрального атома металла.

Полученные результаты скрининга противовирусной и противоопухолевой активности *in vitro*, а также расчётные данные некоторых физико-химических параметров наиболее активных органических соединений, подтверждают важность дальнейших исследований бисгетероциклических производных дигидропиразола и их координационных соединений как потенциальных фармацевтических субстанций.

Korablina Diana Dmitrievna

(Russian Federation)

**SYNTHESIS, PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL
4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE DERIVATIVES**

The dissertation research focuses on the synthesis of novel functionally substituted 4,5-dihydropyrazole derivatives containing heterocyclic fragments (pyridine, tetrazole, triazole, thiohydantoin) and their coordination compounds and also the study of the biological activity of the obtained substances.

3-Pyridylpyrazolines-2, especially phenylthiocarbamoyl derivatives, which form stable chelate compounds of different structure with copper and nickel salts, are the best ligands among the target bis-heterocyclic dihydropyrazole derivatives.

The obtained results of antiviral and antitumor activity *in vitro* screening, as well as the calculated data of some physicochemical parameters of the most active organic compounds confirm the importance of further investigations of bis-heterocyclic dihydropyrazole derivatives and their coordination compounds as potential pharmaceutical substances.