

На правах рукописи



ЯРОВАЯ ОЛЬГА ИВАНОВНА

**СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ МОНО-, СЕСКВИ- И ДИТЕРПЕНОИДОВ**

02.00.16 – Медицинская химия

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН).

Научный консультант:

Салахутдинов Нариман Фаридович
доктор химических наук, профессор
заведующий отделом медицинской химии
НИОХ СО РАН

Официальные оппоненты:

Кучин Александр Васильевич, чл.-корр. РАН,
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией органического
синтеза и химии природных соединений
ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН;

Вацадзе Сергей Зурабович, профессор РАН,
доктор химических наук, профессор кафедры
органической химии химического факультета
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова;

Уломский Евгений Нарциссович
доктор химических наук, профессор кафедры
органической химии УГТУ-УПИ

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»

Защита состоится «9» октября 2018 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук по адресу 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, ИФАВ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФАВ РАН и на сайте www.ipac.ac.ru. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.ed.gov.ru/>. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, ИФАВ РАН ученому секретарю диссертационного совета Д 002.102.02; e-mail: svafa@ipac.ac.ru.

Автореферат разослан « » 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат химических наук



Афанасьева
Светлана Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Поиск новых противовирусных агентов является одним из приоритетных направлений исследований в современной медицинской химии, что обусловлено распространением широкого спектра вирусных инфекций и появлением новых опасных вирусных болезней, вызываемыми патогенными штаммами, такими, например, как вирусы гриппа А H1N1, H3N2, H5N1. Так, несмотря на десятилетия напряженной борьбы с применением как фармацевтических, так и нефармацевтических методов, каждый год сезонный грипп продолжает вызывать эпидемии по всему миру. основополагающие процессы эволюционной динамики вирусов сезонного гриппа находятся под пристальным вниманием ученых-вирусологов, однако, когда и как появляются новые штаммы вируса остается в большей мере непредсказуемым. Вирусы сезонного гриппа заражают 5-15% популяции людей каждый год, что в результате приводит к ~500 000 смертей в мире. В последние годы требования к препаратам для профилактики и лечения гриппа и ОРЗ в существенной мере пересмотрены. По мнению специалистов, в первую очередь эти препараты должны быть специфическими ингибиторами вирусной репликации, то есть непосредственно действовать на вирус.

Инновационным подходом в разработке новых противовирусных агентов является использование доступных растительных метаболитов в качестве исходных структурных блоков для синтеза библиотек производных и изучения зависимости структура – противовирусная активность. К числу природных соединений, перспективных в качестве основы для создания новых противовирусных агентов, в первую очередь относятся соединения терпенового ряда. Как в нашей стране, так и за рубежом, значительные усилия в синтезе соединений, обладающих активностью против различных вирусов были сконцентрированы на соединениях тритерпенового ряда, в то время как доступные соединения моно-, сескви- и дитерпенового ряда были обделены вниманием. Молекулярные механизмы противовирусной активности соединений на основе вышеупомянутых терпеноидов ранее практически не были изучены и исследования зависимости структура - противовирусная активность в мире практически не проводились. Для систематических исследований зависимости структура - активность предпочтительно наличие библиотек структурно близких соединений, поскольку только в таком случае можно с большой степенью достоверности проводить анализ и выявлять ключевые фармакофорные группы. Это, в свою очередь, вызывает необходимость разработать синтетические подходы, позволяющие получать библиотеки веществ доступными методами и с приемлемыми выходами. Разработка новых высокоэффективных противовирусных средств, кроме безусловного доказательства специфического действия агента (*in vitro* и *in vivo*), включает в себя изучение механизма действия и выявление молекулярных мишеней; разработку и валидацию аналитических методик определения действующего вещества в биологических средах; изучение фармакокинетики и выявление ключевых метаболитов; всестороннее изучение влияния агента на различные физиологические аспекты с использованием животных

моделей; кроме того, важными моментами является оптимизация метода синтеза и масштабирование.

Таким образом, проблема синтеза новых биологически активных веществ и создания на их основе новых лекарственных средств для лечения и профилактики вирусных инфекций является одной из важнейших задач современной органической, биоорганической и медицинской химии.

Цель и задачи.

Цель настоящего диссертационного исследования состоит в разработке и реализации стратегии синтеза **библиотек** новых соединений на основе доступных соединений терпенового ряда, обладающих **противовирусной активностью**; выявление **соединений лидеров** и изучение **взаимосвязи** между химической структурой и физиологической активностью; изучение **механизма** их противовирусного действия; установление **молекулярных мишеней**; биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование синтезированных соединений на предмет изучения **особенностей их влияния** на живые организмы.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) синтез новых производных моно-, сескви- и дитерпеновых соединений с использованием литературных методик, модифицирование литературных методик для получения новых соединений, разработка новых методов синтеза;
- 2) разработка синтетических методов модификации функциональных групп каркасных бициклических монотерпеноидов - камфоры, борнеола и их аналогов, позволяющих синтезировать библиотеки органических соединений, имеющих в своем остове как природный конформационно ограниченный фрагмент, так и дополнительную фармакофорную группу;
- 3) разработка методов селективной химической модификации отдельных представителей сесквитерпенового ряда моно- и бициклического строения с целью получения соединений, имеющих каркасные остовы природного происхождения;
- 4) поиск и разработка новых методов химической модификации дитерпеновых соединений – изоцемброла и дегидроабиетиламина;
- 5) подробное изучение связи синтезированных агентов с проявляемой противовирусной активностью, выявление закономерностей и ключевых структурных блоков, отвечающих за целевую активность;
- 6) выявление стадии вирусной репликации гриппа, на которой проявляют противовирусную активность соединения-лидеры, что в свою очередь, позволяет делать предположения о механизме действия;
- 7) исследование лиганд-рецепторного взаимодействия наиболее активного агента против вируса гриппа с использованием современных методов компьютерного молекулярного моделирования;
- 8) разработка и валидация аналитических методик определения ключевого соединения лидера (продукта реакции камфоры и аминокэтанола); выявление метаболитов и изучение распределения действующего вещества и его метаболитов в органах животных;
- 9) изучение физиологических особенностей влияния наиболее активного соединения против гриппа на поведение животных в тесте «открытое поле», изучение физико-

химических показателей крови животных и влияние на морфофункциональные характеристики почек животных;

10) оптимизация и масштабирование метода синтеза ключевого соединения лидера.

Научная новизна.

В результате проведенного исследования нами впервые синтезирована и описана широкая библиотека иминопроизводных на основе камфоры. Разработан эффективный метод синтеза оснований Шиффа с использованием принципа «зеленой химии», позволяющий проводить реакции без растворителя и минимизировать стадии очистки целевых соединений. Разработаны синтетические подходы, позволяющие получать соединения, содержащие два фрагмента каркасного природного остова и линкеры разной длины, жесткости и имеющие дополнительные функциональные группы. Проведены всесторонние модификации продукта взаимодействия камфоры и аминоэтанола, включающие стереоселективное окисление и восстановление иминогруппы, получение простых и сложных эфиров, введение насыщенных N-гетероциклов в остов и получение триазольных производных.

Синтезированы библиотеки сложноэфирных производных борнеола, имеющих в своем остове алифатические азотсодержащие гетероциклы, отделенные от бициклического остова линкерами разной длины и описан синтез соединений, содержащих ароматические гетероциклические фрагменты. С целью выявления влияния типа линкера, описаны подходы к синтезу производных борниламина.

Впервые показана возможность образования бензимидазольных, бензоксазольных и бензтиазольных производных взаимодействием каркасных кетонов камфоры и фенхона с орто-замещенными ароматическими аминами. Разработаны эффективные методы синтеза новых полициклических соединений на основе камфорной кислоты. Впервые синтезированы производные труксилловой кислоты, содержащие в своем остове фрагменты бициклических монотерпеноидов. Предложен новый метод синтеза гетероциклических производных гидразона камфоры.

На примере превращений моно и бициклических сесквитерпенов - гумулена, кариофиллена и изокариофиллена, показана возможность использования условий реакции Риттера в синтезе полициклических соединений, остов которых имеет природное происхождение. Усовершенствован метод выделения дитерпенового спирта изоцеμβрола из живицы кедра, разработан способ синтеза трициклических эфиров на основе изоцеμβрола с использованием гетерогенного кислотного катализатора. Впервые описаны гетероциклические производные доступного природного амина – дегидроабиетиламина. Изучено влияние противоиона в солях дегидроабиетиламмония на проявление биологической активности.

Впервые подробно изучено влияние структуры синтезированных соединений на активность агентов против вирусов гриппа, определены ключевые фармакофорные фрагменты, ответственные за проявляемую активность. Выявлено соединение лидер – продукт взаимодействия камфоры и аминоэтанола, названный нами «камфецин».

Впервые показана и подтверждена высокая активность против вируса Марбург сложноэфирных производных (-)-борнеола, содержащих насыщенный N-гетероциклический фрагмент.

Проведено молекулярное моделирование противовирусной активности камфецина и его аналогов к выбранным молекулярным мишеням вируса гриппа, проведено сравнение с известными лигандами; показано изменение энергии белкового комплекса поверхностного белка вируса гриппа - гемагглютинина в камфецин-резистентном штамме вируса гриппа А Н1N1.

Разработаны и валидированы аналитические методики определения камфецина в плазме и крови животных с использованием методов ГХ/МС и ВЭЖХ/МС, изучены фармакокинетические параметры при пероральном и внутривенном введении. Проведен поиск и установление строения метаболитов камфецина, изучено распределение данного соединения и его метаболитов по органам животных при пероральном введении. С использованием животных моделей проведено подробное изучение физиологических особенностей влияния камфецина на поведение животных, изучены физико-химические показатели крови и влияние на морфофункциональные характеристики почек крыс.

Практическая значимость.

Работа была поддержана Государственным контрактом №14411.2049999.19.085 «Доклинические исследования противовирусного лекарственного средства на основе иминопроизводного природного монотерпеноида», проведенным в рамках государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». В рамках работы над указанным государственным контрактом было проведено масштабирование синтеза ключевой субстанции и наработано необходимое для доклинических исследований количество камфецина. Была проведена разработка методов выделения действующего вещества из биологических сред и валидированы соответствующие методики. Исследован фармакокинетический профиль действующего вещества и подготовлены нормативные документы по лабораторному регламенту. Проведено исследование стабильности субстанции.

В результате диссертационного исследования разработаны новые методы синтеза большого набора хиральных соединений на основе бициклических монотерпеноидов каркасного строения, сесквитерпенов моно- и бициклического строения и дегидроабиеиламина, многие из которых представляют интерес для фармакологических исследований. Разработаны аналитические методики определения фармакологически важных соединений на основе терпеноидов в цельной крови с использованием «метода сухих пятен», что значительно облегчает стадии пробоподготовки.

На часть практически важных результатов получены патентные свидетельства (7 патентов и 1 заявка на патент).

Методология и методы диссертационного исследования.

Методология исследования построена в соответствии с классическими принципами медицинской химии. Данная методология включает в себя выбор исходных объектов для химической модификации; синтез библиотек соединений; тестирование синтезированных агентов с использованием *in vitro* и *in vivo* моделей; выявление соединений лидеров и изучение механизма действия высокоэффективных агентов; изучение фармакокинетических параметров и

метаболизма действующего вещества. Для достижения цели и решения поставленных задач был осуществлён комплексный подход к синтезу производных терпеновых соединений с использованием классических и современных методов органической химии; использованы современные физико-химические методы анализа для установления структуры синтезированных соединений. В работе использован широкий набор методик, используемых в вирусологии и современные методы компьютерного моделирования. Цитотоксические свойства химических соединений изучены при помощи метилтетразолиевого теста, активность против вируса гриппа активность оценена *in vitro* в культуре клеток MDCK и *in vivo* - в опытах на животных на модели летальной гриппозной пневмонии.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Обнаружен новый класс соединений, являющихся эффективными ингибиторами вирусов гриппа – иминопобутронов на основе (+)-камфоры. Проведено подробное изучение связи структуры соединений с проявляемой противовирусной активностью.
- Выявлено соединение-лидер – продукт взаимодействия камфоры и аминокислоты, на моделях *in vitro* и *in vivo* показан широкий спектр противовирусной активности.
- Впервые описана библиотека производных на основе (-)-борнеола, содержащих гетероциклические фрагменты; изучено влияние фармакофорных структурных блоков, длины и типа линкера на проявляемую противовирусную активность.
- Разработаны эффективные методы синтеза насыщенных N-содержащих гетероциклов на основе гидразона камфоры.
- Впервые описан синтез производных труксилловой кислоты, содержащей фрагменты бициклических монотерпеноидов.
- Показана возможность синтеза азотсодержащих полициклических соединений на основе камфорной кислоты, выявлен агент, проявляющий широкий спектр активности против вирусов гриппа.
- Показана высокая активность против вирусов гриппа у полициклических ацетамидов, синтезированных нами на основе сесквитерпеноидов - гумулена, кариофиллена и изокариофиллена в условиях реакции Риттера.
- Проведено молекулярное моделирование противовирусной активности камфецина и его аналогов ионному каналу M2 и гемагглютину, показано изменение энергии белкового комплекса поверхностного белка вируса гриппа в камфецин-резистентных штаммах.
- С использованием псевдовирусных частиц, имеющих поверхностные белки GP вирусов Марбург, обнаружен новый класс эффективных ингибиторов филовиралов – сложноэфирных производных борнеола; активность подтверждена с использованием инфекционных вирусов.
- Разработаны и валидированы эффективные методики определения камфецина в плазме и крови животных, показано, что нижний предел определения действующего вещества в цельной крови методом ВЭЖХ/МС достигает 1.5 нг/мл.

- Показано, что основными метаболитами камфецина являются соответствующий глюкоронид, кислота и сульфат камфецина, изучено распределение камфецина и его метаболитов в органах животных.

Апробация работы.

Результаты исследований были представлены и докладывались в виде устных докладов на следующих конференциях: The 5th Korea-Russia Bio Joint Forum on the Natural Products Industrialization and Application. Gangneung, Rep. of Korea, (2013); Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии. Крым, Новый свет (2014); 33rd Annual Meeting of American Society for Virology, Fort Collins, USA (2014); Siberian winter conference "Current Topics in Organic Chemistry", Шерегеш, Россия (2015); 3rd International Conference on Pharmaceutical Sciences, Tbilisi, Georgia (2015); Вторая Российская конференция по медицинской химии MedChem-2015, Novosibirsk, Russia (2015); Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии, Крым, Новый свет (2015); Dombay organic conference cluster DOCC, Домбай, Россия (2016); I Всероссийская молодежная школа-конференция «Успехи синтеза и комплексообразования». Москва, Россия (2016); Кластер конференций по органической химии "ОргХим-2016", Санкт-Петербург, Россия (2016); The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, Новосибирск, Россия (2016); Третий Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма 2017 (2017); Всероссийская научная конференция «Современные проблемы органической химии», Новосибирск, Россия (2017); Объединённая международная конференция по органической химии, Байкальские чтения-2017, Иркутск, Россия (2017); XX молодёжная школа-конференция по органической химии, Казань, Россия, (2017); 3rd Russian Conference on Medical Chemistry, Казань, Россия (2017); Всероссийской молодежной научной школе-конференции "Актуальные проблемы органической химии" (2018) и в виде стендовых докладов на следующих конференциях: Options for the Control of Influenza, Cape Town, South Africa, (2013); International Congress of Heterocyclic Chemistry "KOST-2015", Москва, Россия, (2015); International Conference on Medicinal Chemistry RICT 2016, Кайен, Франция (2016); Международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию Академика Кнорре, Новосибирск, Россия, (2016); 17th International Congress of Virology, IUMS Congress 2017, Singapore, (2017); 7th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, Singapore, (2017).

Настоящая работа является частью программы по изучению синтетических трансформаций низкомолекулярных растительных метаболитов как научной основы создания лекарственных препаратов для медицины, сформированной и развиваемой в отделе медицинской химии НИОХ СО РАН. Работа выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательских работ НИОХ СО РАН программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (ПФНИ ГАН, 2013-2020), приоритетное направление V-48 «Фундаментальные физико-химические исследования механизмов физиологических процессов и создание на их основе фармакологических веществ и лекарственных форм для лечения и профилактики социально значимых заболеваний».

Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 15-03-00193 «Молекулярный дизайн, синтез и изучение противовирусной активности производных каркасных терпеноидов - нового класса агентов против вируса гриппа», гранта РФФИ № 18-03-00271 «Каркасные терпеноиды в синтезе новых ингибиторов вирусов, вызывающих геморрагическую лихорадку с почечным синдромом» и гранта РНФ № 15-13-00017 «Создание новых препаратов для борьбы с резистентными штаммами вируса гриппа путем направленных трансформаций природных терпеноидов». В указанных грантах РФФИ соискатель являлся руководителем, в гранте РНФ одним из основных исполнителей.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 446 страницах машинописного текста, содержит 56 схем, 177 рисунков, 30 таблиц, списка цитируемой литературы (462 литературных источников) и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор посвящен современным данным о противовирусной активности соединений терпенового ряда и агентов на их основе с обсуждением механизма действия. В первой части литературного обзора обосновывается необходимость поиска новых агентов, обладающих специфической противовирусной активностью, обсуждаются исторические аспекты открытия вирусов, вызывающих наиболее опасные вирусные инфекции. Далее приводятся примеры противовирусной активности суммарных экстрактов растений; обсуждаются представленные в современной литературе противовирусные свойства соединений монотерпенового ряда и агентов, синтезированных на их основе; рассматриваются противовирусная активность соединений сескви-, дитерпенового- и тритерпенового ряда. Далее обсуждаются основные мишени противовирусной терапии и механизм действия известных противовирусных агентов на основе соединений терпенового ряда. Обзор представленных литературных данных позволяет сделать вывод о том, что природные биологически активные вещества представляют ценность и как соединения-лидеры, и как ключевые структурные блоки в синтезе библиотек соединений, однако при выборе исходных веществ нужно делать акцент не только на нативную биологическую активность, но и на коммерческую доступность данных объектов.

Обсуждение результатов разделено на синтетическую часть работы, изучение связи структуры соединений с проявляемой активностью, обсуждению биологических испытаний по изучению механизма противовирусного действия, аналитического раздела и обсуждения результатов действия камфецина на физиологические факторы животных.

1. Синтез библиотек соединений

Объектами исследования в данной работе были соединения терпенового ряда - бициклические монотерпеноиды каркасного строения: (+)-камфора, (-)-борнеол, (+)-фенхон, производные камфоры – (+)-камфорная кислота, (+)-гидразон камфоры и

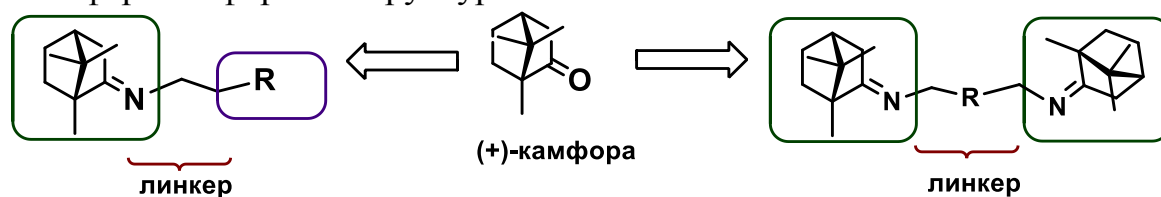
(+)-борниламин; моно и бициклические представители сескитерпенового ряда – гумулен, (-)-кариофиллен и (-)-изокариофиллен; дитерпеновый амин – производное дегидроабиетиновой кислоты – (+)-дегидроабиетиламин и дитерпеновый спирт – (+)-изоцеброл. Выбор данных природных соединений обусловлен анализом современной литературы, позволяющим сделать вывод о высокой перспективности использования указанных природных объектов в качестве исходных блоков для синтеза биологически активных агентов. Следует отметить, что данные объекты исследования являются коммерчески доступными продажными реактивами, либо могут быть синтезированы на основе исходных терпеноидов, либо могут быть выделены из доступного природного сырья.

1.1. Химические модификации монотерпенов

Бициклические монотерпеноиды широко распространены в природе и, как правило, обладают высокой оптической чистотой. Однако биологическая активность, особенно противовирусная, производных данного класса соединений ранее систематически не была изучена. Интерес к химии камфоры и её производным не ослабевает на протяжении всей истории химии природных соединений. Камфора, вероятно, является первым растительным метаболитом, выделенным человеком в химически индивидуальном виде. С середины XX века и до настоящего времени широко распространено использование камфоры и борнеола как источника хиральности в асимметрическом синтезе, что обусловлено доступностью индивидуальных энантиомерных форм.

1.1.1. Химические модификации (+)-камфоры

Одной из основных современных стратегий поиска новых и модификации известных лекарственных средств является концепция биоизостеризма, согласно которой функциональные группы со сходными физико-химическими параметрами могут быть взаимозаменяемыми, и такая замена может вести к соединениям с близкими биологическими свойствами. Очевидно, что биоизостерическая замена не может сохранить весь перечисленный набор параметров неизменным, поэтому часто биоизостеры существенно различаются по числу атомов в группе, стерическим и электронным характеристикам. На основании этой концепции нами был разработан дизайн синтеза библиотек соединений на основе камфоры, схематически изображенный на рисунке. Данный подход позволяет проводить глубокое изучение связи структуры синтезированных агентов с проявляемой биологической активностью как в рамках одной библиотеки агентов, так и с целью выявления ключевых фармакофорных структурных блоков.



Важным, на наш взгляд, являлось выявление влияния длины линкера между природным фрагментом и дополнительной фармакофорной группой. Кроме того, была синтезирована библиотека соединений, содержащих два фрагмента камфоры в

одной молекуле – димерных производных. При этом было изучено влияние длины и типа линкера на проявляемую биологическую активность.

1.1.1.1. Синтез иминопроизводных камфоры

С точки зрения медицинской химии, синтез целевых соединений должен быть максимально простым и воспроизводимым. В связи с этим, была разработана методика проведения реакции в закрытой системе с использованием микроволнового облучения, позволяющая избежать снижения концентрации амина в реакционной смеси и приводящая к увеличению выхода целевого продукта. Взаимодействие (+)-камфоры с пропиламинем, бутиламинем и циклопропиламинем в присутствии $Ti(iOPr)_4$ в качестве дегидратирующего агента в микроволновой печи, приводит к соответствующим иминам **1**, **2** и **10**. Кроме того, нами была отработана одностадийная методика синтеза веществ на основе камфоры, заключающаяся в кипячении реакционной смеси без растворителя в присутствии безводного $ZnCl_2$. С использованием данной методики были успешно синтезированы иминопроизводные камфоры, содержащие алифатические заместители с пятью и более атомами углерода **3-9**; соединение, содержащее циклогексильный фрагмент **11**.

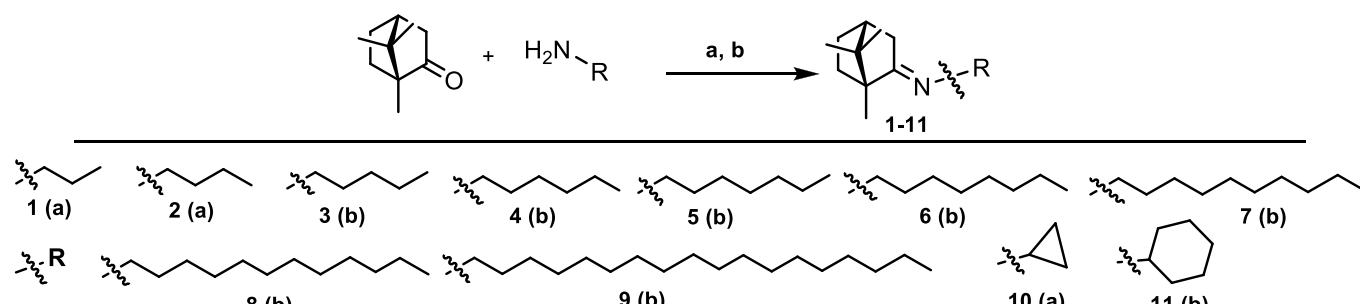


Схема 1.

а) NH_2-R (1.5 экв), $Ti(iOPr)_4$ MW; б) NH_2-R (1.6 экв), $ZnCl_2$ (5 моль%), кипячение без растворителя.

Указанная методика синтеза иминопроизводных камфоры была успешно реализована для синтеза соединений, имеющих в своем остове каркасный бициклический фрагмент, иминогруппу и спиртовые **12-14**, простые эфирные **15**, первичные **15** и вторичные аминные **17-20** и морфолиновый **21** фрагменты (схема 2). Дополнительно была разработана методика селективного восстановления иминогруппы действием боргидрида натрия в комплексе с хлоридом никеля с образованием соответствующих *экзо*-аминопроизводных камфоры. С использованием данной методики были успешно получены аминоспирты **22-24**¹.

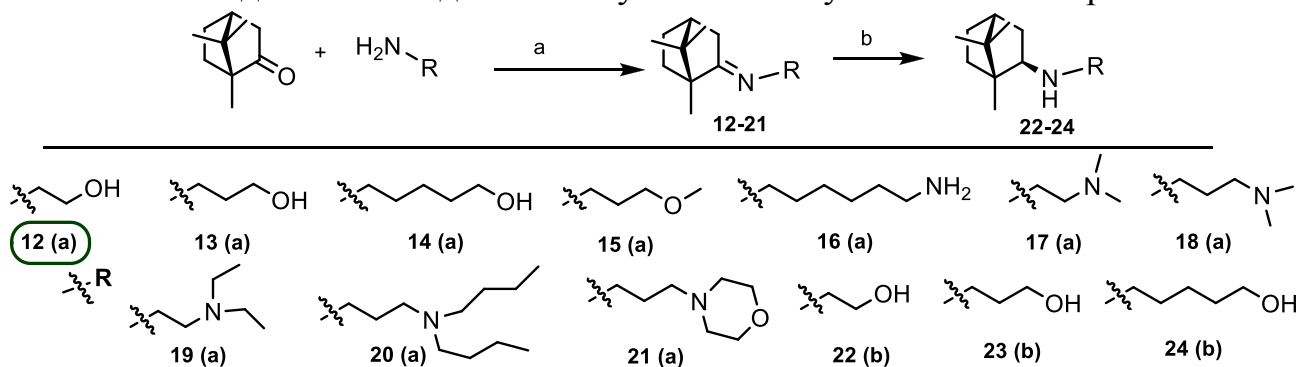


Схема 2.

¹ Номера соединений, охарактеризованных рентгеноструктурным анализом (РСА), обведены в рамочку.

a) $\text{NH}_2\text{-R}$ (1.6 экв), ZnCl_2 (5 моль%), кипячение без растворителя; b) NiCl_2 (2 экв), NaBH_4 (10 экв), MeOH , $-30^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$.

Далее, разработанная нами методика синтеза иминопроизводных камфоры была применена нами к получению соединений, содержащих ароматический фрагмент. Так, в условиях проведения реакции без растворителя, был синтезирован ароматический имин **25**; его дифторзамещенные аналоги **26** и **27**; п-гидроксиароматический имин **28**; соединение, содержащее бензтиазольный фрагмент **30**; агенты, содержащие ароматический фрагмент, отделенный от камфороимина одной CH_2 группой **31-33**; соединение **34** с дифенильным фрагментом и продукты взаимодействия фенилэтиламина и диметокси замещенного фенилэтиламина с камфорой – имины **35** и **36** (схема 3). Ароматический орто-иминоспирт **29** получен нами взаимодействия исходных реагентов в среде $\text{Si}(\text{OEt})_4$.

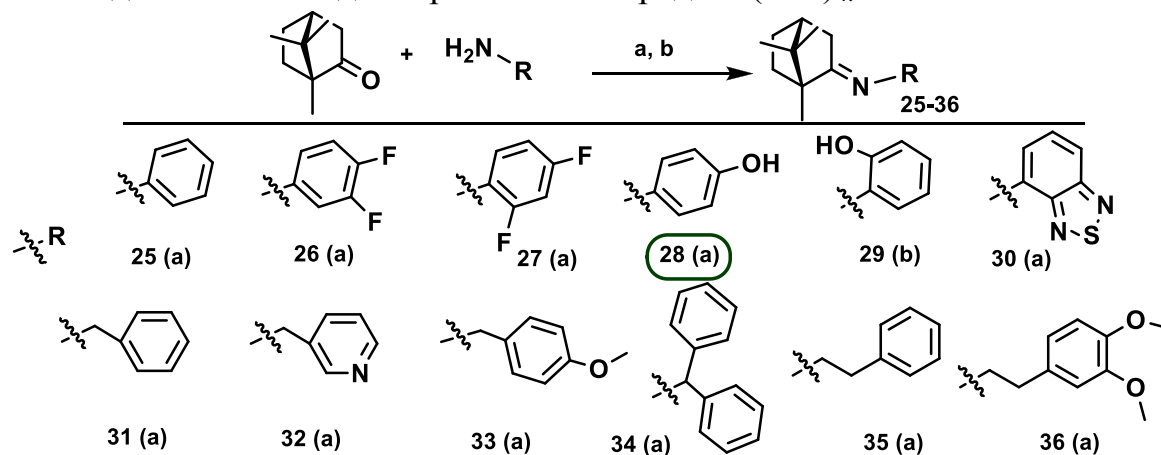


Схема 3.

a) $\text{NH}_2\text{-R}$ (1.6 экв), ZnCl_2 (5 моль%), кипячение без растворителя; b) о-аминофенол (1.2 экв), $\text{Si}(\text{OEt})_4$, H_2SO_4 (5 моль%), кипячение.

Для всех полученных иминопроизводных камфоры (схема 1-3) было предложено строение с *E*-конфигурацией имино-групп. Основаниями для этого послужили данные NOESY и квантово-химический расчет методом DFT для соединения **19**.

Нами были проведены попытки синтеза аналогичных производных на основе (+)- фенхона - природного бициклического монотерпеноида, отличающегося расположением гем-диметильной группы. Однако все попытки получить иминопроизводные фенхона не увенчались успехом. По-видимому, стерические затруднения, вызванные метильными группами в 3 положении борнанового остова, значительно затрудняют образование соответствующих иминопроизводных.

1.1.1.2. Синтез димерных производных камфоры

Важным направлением функционализации природных соединений является получение симметричных молекул, имеющих в своём остове два природных фрагмента, связанные между собой линкерными разной длины и типа. В данной работе были разработаны методы синтеза симметричных азотсодержащих производных на основе (+)-камфоры. Для синтеза указанных соединений нами было использовано два синтетических подхода. Первый основан на прямом взаимодействии природного монотерпеноида с диаминами различного строения, второй включает в себя первоначальный синтез производных камфоры (иминоаминов или иминоспиртов) и дальнейшее взаимодействие последних с

линкерами различного строения и природы. Ключевой стадией в синтезе целевых соединений в первом использованном нами подходе является взаимодействие (+)-камфоры с диаминами различного строения. Так, нами было показано, что взаимодействие камфоры с алифатическими диаминами в условиях азеотропной отгонки воды и в присутствии каталитических количеств $\text{VF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ приводит к образованию соответствующих димерных оснований Шиффа **37-44** в качестве основных продуктов (схема 4). Проведение реакции камфоры с 4,4'-метиленадианилином и 4,4'-оксидадианилином в присутствии эквимольного количества $\text{Si}(\text{OEt})_4$, используемого в качестве дегидратирующего агента, были получены соответствующие симметричные бис-имины **43** и **44**. Ввиду низкой реакционной способности ароматических аминов также были выделены аминоимины **45** и **46**.

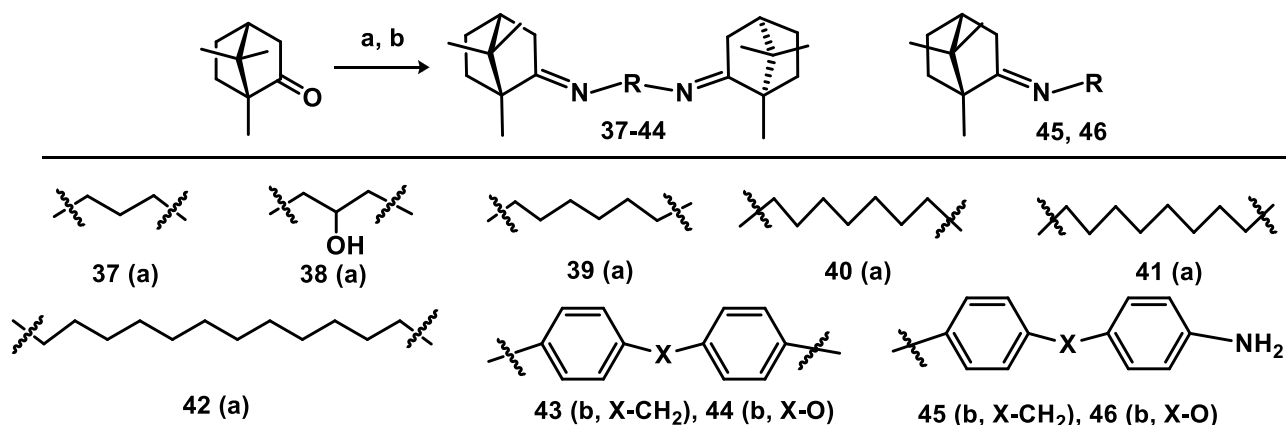


Схема 4.

а) $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$ (0.5 экв), $\text{VF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (5 моль%), толуол, кипячение с насадкой Дина Старка; б) $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$ (0.5 экв), $\text{Si}(\text{OEt})_4$, H_2SO_4 (5 моль%), 150°C , 10 ч.

С целью выявления влияния наличия иминогруппы в описанных нами соединениях на проявление противовирусной активности, нами были получены соответствующие бис-аминные производные. Так, селективным восстановлением в разработанных нами условиях были получены *экзо-экзо*-диамины, имеющие алифатические **47-49** и ароматические **50**, **51** линкеры между каркасными структурными блоками. Алкилированием диметилсульфатом были получены бистретичные амины **52** и **53** (схема 5).

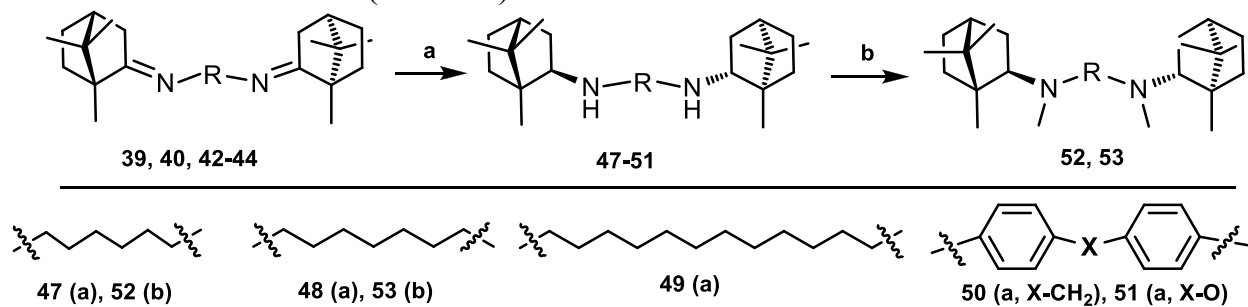


Схема 5.

а) NiCl_2 (4 экв), NaBH_4 (20 экв), MeOH, $-30^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$; б) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ (10 экв), K_2CO_3 , MeOH.

Для синтеза димерных производных, имеющих в своем остоле два заряженных атома азота, разделенные линкерами разной длины **54-62** нами были проведены реакции иминоаминов **19** и **17** с дигалогенидами различного строения (схема 6).

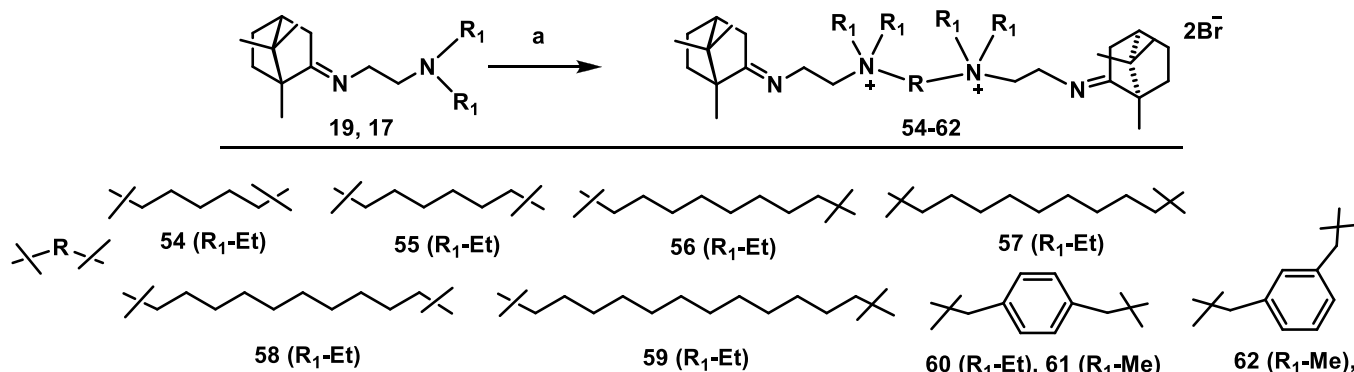


Схема 6.

а) Br-R-Br (0.50 экв), CH₃CN, K₂CO₃, кипячение.

В связи с важностью выявления не только длины, но и типа линкера на проявляемую биологическую активность целевых агентов, нами были изучены реакции иминоспирта **12** с дихлорангидридом янтарной и адипиновой кислот. Целевые димерные сложные эфиры **63** и **64** изображены на схеме 7.

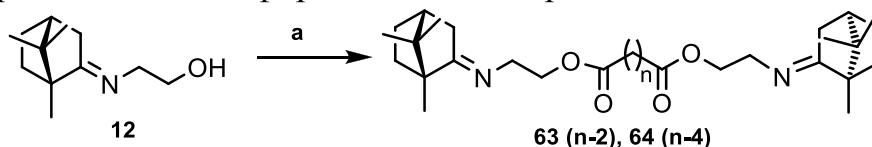


Схема 7.

а) ClCO-(CH₂)_{2,4}-COCl, CH₂Cl₂, пиридин, Ag.

1.1.1.3. Модификации иминоспирта **12**

Проведенные исследования биологической активности синтезированных соединений (обсуждение приведено в разделе 2.1.) выявили, что продукт взаимодействия камфоры и аминоэтанола – иминоспирт **12** проявляет высокую активность против вирусов гриппа А. С целью расширения синтетического потенциала камфоры и ее производных, нами были синтезированы библиотеки соединений на основе данного высокоэффективного иминоспирта. Проведены модификации спиртовой группы и были синтезированы эфиры **65-67**. Сульфат **68** получен реакцией иминоспирта **12** с хлорсульфоновой кислотой.

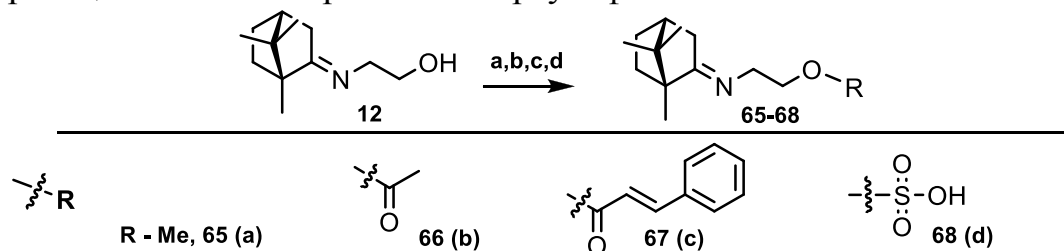


Схема 8.

а) CH₂N₂, Et₂O, BF₃•Et₂O, 0°C; б) Ac₂O, Et₃N, DMAP; в) 1: коричная кислота (COCl)₂, DMFA, CH₂Cl₂; 2: CH₂Cl₂, 0-5 °C→25°C; д) ClSO₃OH, CHCl₃.

Взаимодействием иминоспиртов **12** и **13** с м-Cl-надбензойной кислотой приводит к образованию транс-оксазаридинов **69** и **70** (схема 9).

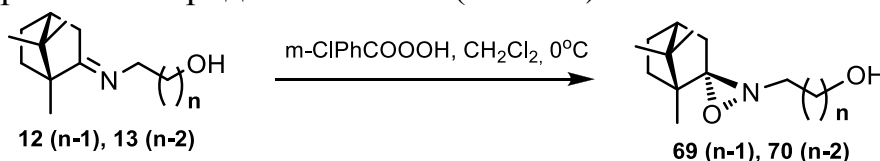


Схема 9.

Для синтеза дополнительных библиотек соединений на основе камфоры, был реализован синтетический подход, включающий стадию получения

бромпроизводного доступного нам иминоспирта **12** и последующее взаимодействие с азот и сера-содержащими гетероциклами. В результате синтетических модификаций иминоспирта **12**, нами получены соединения, содержащие ключевой фармакофорный структурный блок – имин камфоры и насыщенные N-гетероциклы – пирролидиновый **71**, пиперидиновый **72**, 4-метил- **73** и 4-гидроксипиперидиновый **74**, пиперазиновый **75**, N-метил- **76** и N-этилпиперазиновый **77** фрагменты. С целью изучения влияния гетероатомов на проявляемую активность синтезирован аналог иминоспирта **12** тиоиминоспирт **78**, содержащий атом серы в алифатическом линкере. Выделены и описаны тиобензоксазольное **79**, тиобензтиазольное **80** и тиобензимидазольное производное **81**. Синтезированы агенты, содержащие пятичленные гетероциклические фрагменты - 4,5-дигидротиазольный **82**, N-метилимидазольный **83** и 1,2,4-триазольный фрагменты **84**, разделенные от природного остова атомом серы через алифатический линкер. Кроме того, описаны соединения с пиридиновым **85** и пиперидиновым фрагментом **86** (схема 10).

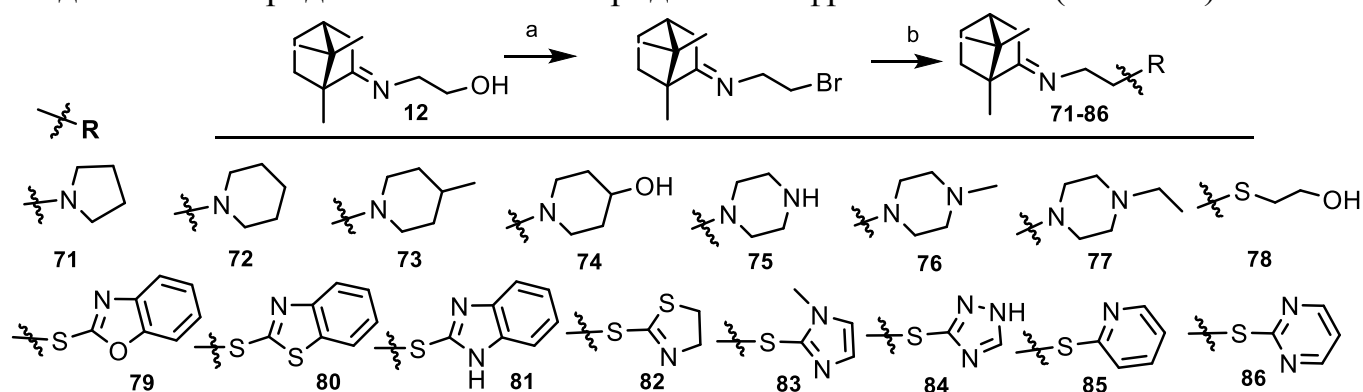


Схема 10.

a) PBr_3 , эфир, 24 ч. b) $RRNH/R-SH$ (1 экв), CH_3CN , K_2CO_3 , ДБУ, 12-48 ч.

Химические модификации иминоспирта **12** с использованием методов «клик химии» были проведены в соавторстве с группой исследователей под руководством проф. **Бреля В.К.** в ИНЭОСе, г. Москва. В работе был выбран наиболее простой и изученный вариант – проведение реакции в смеси третбутилового спирта с водой, катализ – ионами одновалентной меди Cu^+ . Используя данную методологию и полученный азидный блок **88**, в качестве исходного соединения, было проведено циклоприсоединение к различным ацетиленам. В результате были выделены и описаны 4-замещенные-1,2,3-триазолы, содержащие алифатический **88**, триметилсилильный **90**, спиртовые **91-93**, вторичные аминные **94** и **95**, морфоролиновый **96** и фосфиновые заместители **97** и **98** (схема 11).

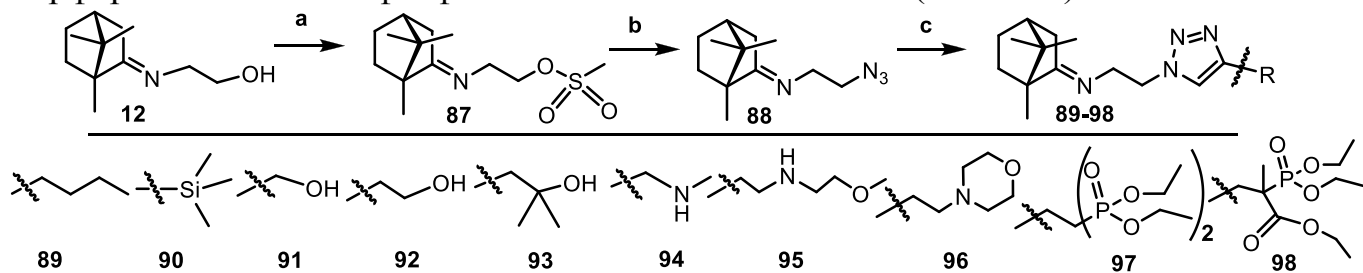


Схема 11.

a) CH_3SO_2Cl , Et_3N , $-10^\circ C$; b) NaN_3 , CH_3CN , $60^\circ C$; c) $R\equiv CH$ (1.0 экв), Cu^+ , $t-BuOH/H_2O$, 24ч.

Развивая данное направление, был описан синтез производного на основе иминоспирта **12**, содержащего терминальную ацетиленовую группу **99**. Взаимодействием последнего с азидами получены соединения, имеющие в своем

остове бициклический фармакофорный фрагмент, иминогруппу и 1-замещенные 1,2,3-триазолы, содержащие спиртовый **100**, ароматический **101**, сложноэфирный **102** и фосфонатный фрагменты **103**. Взаимодействием ацетиленового производного **99** с азидом **88** получено несимметричное соединение **104**, содержащее два фрагмента природного остова (схема 12).

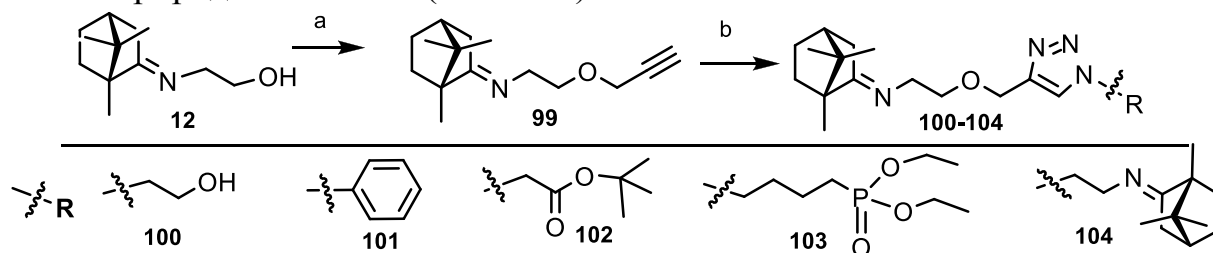


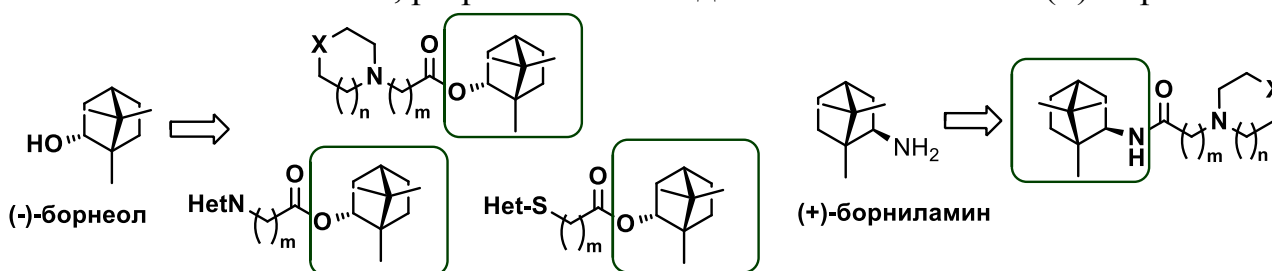
Схема 12.

а) 1. NaH, толуол, 2. BrCH₂C≡CH; б) N₃R (1.0 экв), Cu⁺, t-BuOH/H₂O, 24 ч.

Подводя итог представленному разделу, можно сделать вывод о том, что в результате проделанной работы нами синтезирован большой набор производных на основе камфоры для проведения изучения биологической активности.

1.1.2. Химические модификации борнеола и борниламина

Следующим ключевым объектом химических модификаций в представленной работе является (-)-борнеол. Данный природный спирт является доступным монотерпеноидом, также имеющим бицикло[2.2.1]каркасный остов. В представленной работе использовался (-)-борнеол, полученный в химическом цехе НИОХ СО РАН по разработанной технологии из возобновляемого растительного сырья. Описанный метод позволяет получить продукт с содержанием основного вещества более 99% и оптической чистотой *ee* 98%. Нами были проведены модификации, приводящие к синтезу библиотек сложноэфирных производных борнеола, имеющих в своем остове алифатические азотсодержащие гетероциклы, отделенные от бициклического остова линкерами разной длины и синтез соединений, содержащих ароматические гетероциклические фрагменты. С целью выявления влияния типа линкера (сложноэфирный или амидный) на проявление биологической активности, разработаны методы синтеза на основе (+)-борниламина.



1.1.2.1. Синтез алифатических N-гетероциклических производных (-)-борнеола

Для проведения подробного изучения связи структуры полученных веществ с проявлением целевой биологической активности, нами синтезированы производные борнеола с разной длиной сложноэфирного линкера, разделяющего гетероциклический фрагмент от борнанового остова. Общая стратегия синтеза включала в себя взаимодействие (-)-борнеола с хлорангидами хлоруксусной или хлорпропионовой кислот с последующим взаимодействием интермедиатов **105** и **115** со вторичными аминами. В результате были выделены и описаны соединения,

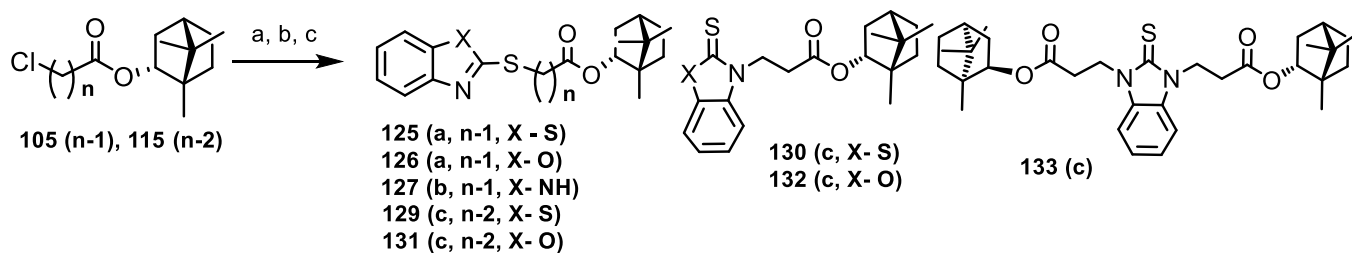


Схема 14.

a) K_2CO_3 , ацетон, 25°C; b) KOH вод, 80°C, i-PrOH; c) CH_3CN , ДБУ, 80°C.

Для более детального исследования зависимости структура-активность нами был проведен синтез ряда производных борнилпропианоата **115**, содержащих N- и S-гетероциклические фрагменты **134-140** (схема 15). Следует отметить, что сложный эфир **115** в реакциях с пиридин-2-тиолом, пимиридин-2-тиолом и 1,2,4-триазол-2-тиолом приводит к образованию S-замещенных продуктов **134**, **135** и **139**. В то время как взаимодействие эфира **115** с тиазолидин-2-тионом, 1-метил-1H-4,5-дигидротиазол-2-тионом, тиазолидин-2,4-дионом и 1,2,4-триазолом дает соответствующие N-замещенные продукты **136**, **137**, **138** и **140**.

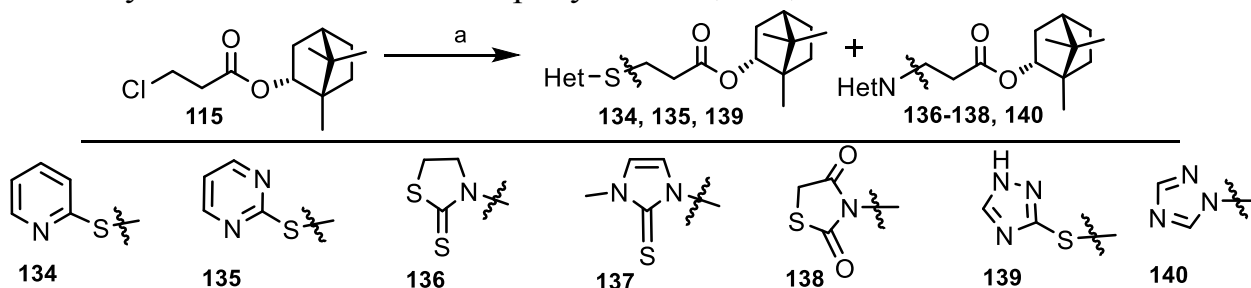


Схема 15.

a) Het-S\Het-NH, ДБУ, CH_3CN , 80 °C.

1.1.2.3. Химические модификации борниламина

С целью изучения влияния типа линкера на проявляемую биологическую активность, нами, по описанной ранее в литературе методике, был получен (+)-борниламмин **148**. Каркасный амин **148** является продажным реактивом, однако стоимость данного соединения достаточно высока и целесообразнее получать указанный бициклический амин в лабораторных условиях. Так, действием солянокислого гидросиламина на камфору с количественным выходом образовывается оксим камфоры **147**, восстановлением последнего уже упомянутой ранее системой $NaBH_4/NiCl_2$ при пониженной температуре приводит к образованию соответствующего амина. Взаимодействие борниламина **148** с хлорангидридами хлоруксусной и хлорпропионовой кислот приводит к соответствующим галогензамещенным амидам **149** и **150** (схема 16). В результате проведенных синтетических трансформаций, нами были выделены и описаны борниламиды, содержащие 4-метил-пиперидиновый **151**, **154**; морфолиновый **152**, **155**; N-метил **153**, **156** и N-этилпиперазиновый **157** фрагменты, отделенные от борнанового остова линкерами разной длины.

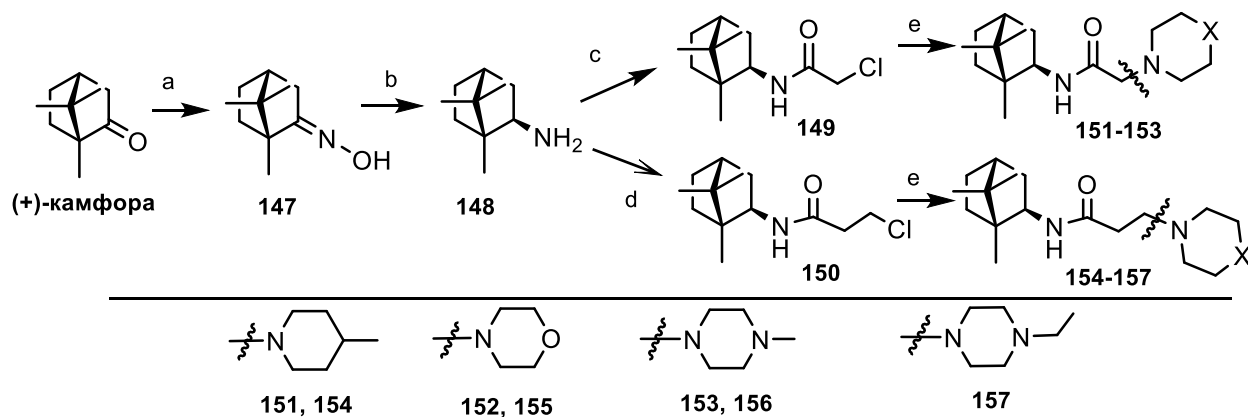


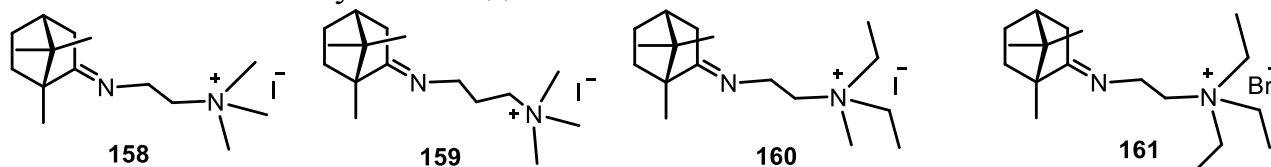
Схема 16.

a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, H_2O -MeOH, CH_3COONa , MW, 150°C , 90 мин; (b) NiCl_2 (2 экв), NaBH_4 (10 экв), MeOH, $-30^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$; c) хлорацетил хлорид, Et_3N , CH_2Cl_2 , 25°C ; d) хлорпропионат хлорид, Et_3N , CH_2Cl_2 , 25°C ; e) NHRR, CH_3CN , K_2CO_3 .

Поводя итог данному синтетическому разделу, можно сделать вывод, что нам удалось разработать эффективные методики синтеза производных борнеола и борниламина и описать значительную серию новых соединений, подходящую для проведения исследований связи структуры ключевых агентов с проявляемой биологической активностью.

1.1.3. Получение четвертичных аммонийных солей на основе камфоры и борнеола

С целью выявления влияния наличия заряженного атом азота на проявляемую противовирусную активность, были синтезированы соли на основе камфоры и борнеола. Так, действием йодистого метила на иминоамины **17**, **18** и **19** получены соответствующие соли **158-160**. Взаимодействием иминодиэтиламина **19** с бромистым этилом получено соединение **161**.



Действием на (-)-борнеол хлорацетатом бромуксусной кислоты был получен бромэфир **162**, взаимодействием последнего с триметиламином и триэтиламином выделены и описаны четвертичные соли **163** и **164**. Для изучения влияния противоиона на проявляемую активность агентов, нами получена соль **166** последовательным действием на бромэфир **162** диметиламина с получением вторичного амина **165** и последующим действием йодистого метила (схема 17).

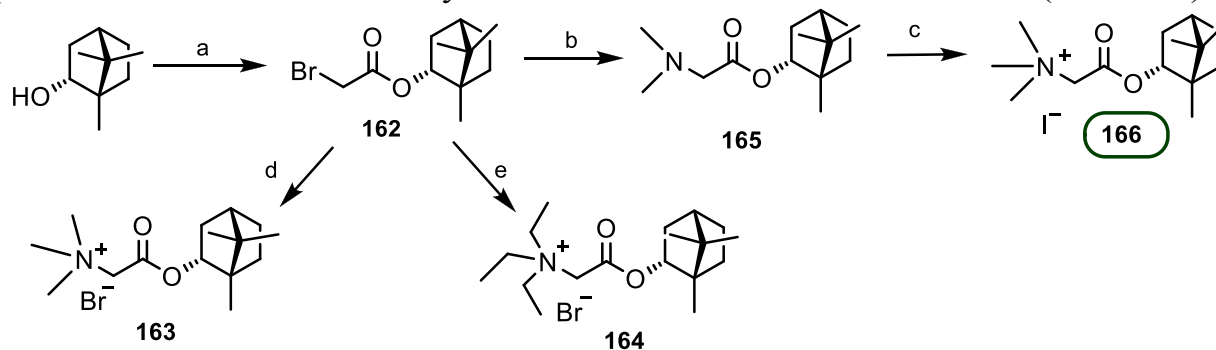


Схема 17.

a) 2-бромацетилхлорид, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b) NHMe_2 , CH_3CN , K_2CO_3 ; c) CH_3I (3 эквив.), CH_3CN , 6 ч, 80°C ; d) Me_3N , CH_3CN , 10 ч, 80°C ; e) Et_3N , CH_3CN , 16 ч, 80°C .

1.1.4. Синтез производных α -труксильной кислоты, содержащих природный фрагмент борнильной структуры

Аналоги α -труксильной кислоты – уникальная группа органических соединений, имеющих в своем остова четырехчленное кольцо и проявляющих различные биологические активности. Одним из направлений химической модификации монотерпеновых соединений в работе было получение симметричных агентов, содержащих в качестве центрального линкера фрагменты α -труксильной кислоты. Эффективным методом получения циклобутанового фрагмента является фотодимеризация (Е)-коричной кислоты. Химические модификации, проведенные нами на основе труксильной кислоты **165**, изображены на схеме 18. Были выделены и описаны бисэфиры α -труксильной кислоты **166** и **167** взаимодействием дихлорангидрида кислоты с соответствующими спиртами – борнеолом и иминосиртом **12**. Димерное производное **168** получено нами реакцией α -труксильной кислоты с (+)-экзо-борниламином **148**, с использованием реагента Мукаямы. С целью выявления влияния наличия каркасного природного фрагмента на проявляемую биологическую активность, нами были синтезированы бисэтиловый эфир **169** и бис-пропиламид дикарбоновой кислоты **170**.

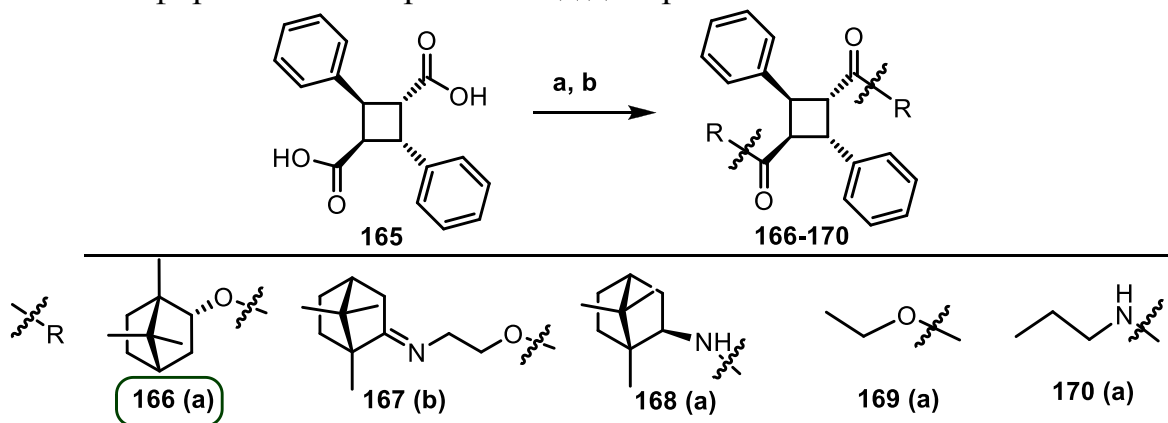


Схема 18.

а) 1. $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , ДМФА. 2. RH , CH_2Cl_2 , пиридин, $0-5^\circ\text{C}$; б) реагент Мукаямы, CH_2Cl_2 , Et_3N .

1.1.5. Взаимодействие (+)-камфоры и (+)-фенхона с о-замещенными анилинами

Разработанные нами методы синтеза иминопроизводных камфоры в условиях проведения реакции без растворителя, были использованы при изучении реакции камфоры с орто-замещенными ароматическими аминами. Вместо получения ожидаемых нами оснований Шиффа, происходит раскрытие одного из циклов каркасного кетона с образованием замещенных циклопентанов, содержащих фрагменты бензоксазолов, бензтиазолов и бензимидазолов. Ранее в литературе образование бензимидазольных, оксазольных и тиазольных фрагментов было описано только при взаимодействии орто-замещенных анилинов с альдегидами и кислотами (хлорангидридами кислот). Примеров реакций идущих с кетонами и проходящих с разрывом каркасного остова, нами в литературе не было найдено. Реакция камфоры с орто-аминофенолом и орто-аминотиолом происходят в расплаве при $195-200^\circ\text{C}$ с образованием соответствующих бензоксазолов **171**, **172** и бензтиазолов **173**, **174** в соотношении 2:1. Взаимодействие камфоры с орто-фенилендиамином с образованием бензимидазолов **175** и **176** также в соотношении

2:1 происходит в среде фенола при 210°C, без добавления фенола происходит только осмоление реакционной смеси (схема 19). С целью поиска кетонов, вступающих в обнаруженное нами превращение, в аналогичных условиях нами были проведены реакции (+)-фенхона с орто-замещенными анилинами. Было показано, что реакции фенхона с орто-аминофенолом и орто-аминотиолом происходят в расплаве при 200-210°C с образованием соответствующих замещенных бензоксазолов (**177**), (**178**) и бензтиазолов (**179**), (**180**) в таком же соотношении 2:1. Взаимодействие фенхона с орто-фенилендиамином с образованием бензимидазолов (**181**) и (**182**) в соотношении 2:1 происходит в среде фенола при 210°C, для полной конверсии время реакции также было увеличено.

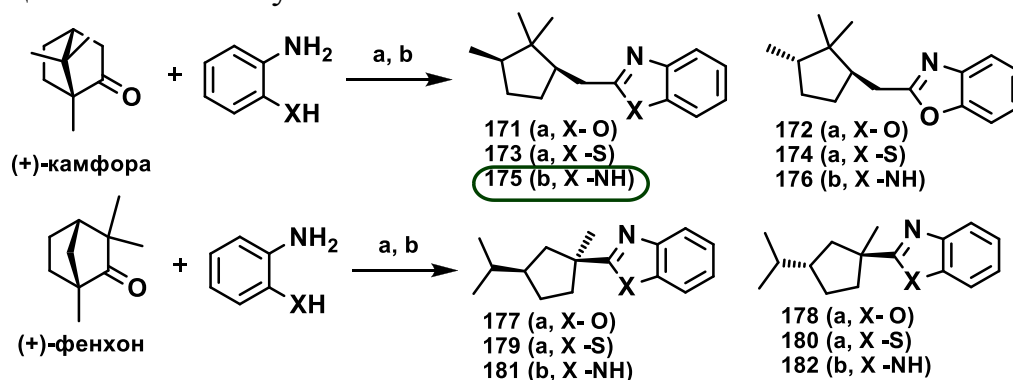
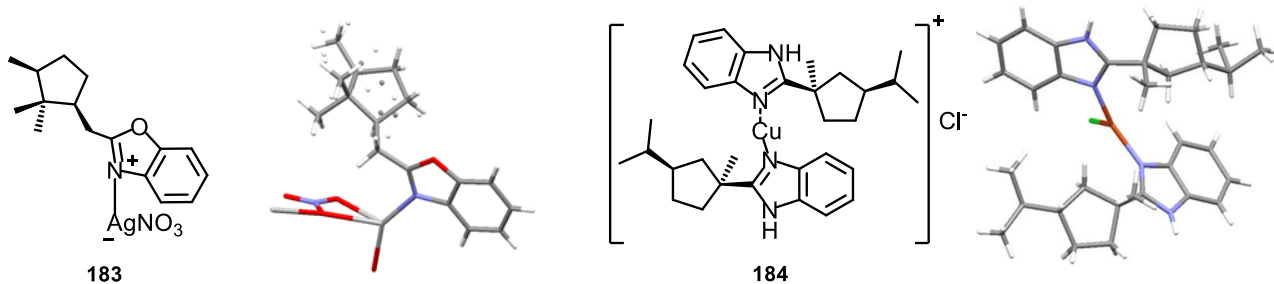


Схема 19.

a) ZnCl_2 , кипячение 6-8 часов; b) PhOH, ZnCl_2 , кипячение 8 часов.

Гетероциклические производные, содержащие бензоксазольный и бензтиазольный фрагмент, представляют собой маслянистые жидкости и могут быть очищены от продуктов осмоления перегонкой при пониженном давлении. Разделение изомерных продуктов реакции происходит только с использованием последовательных колоночных хроматографий, при этом в чистом виде нам удалось выделить только основные изомеры **171**, **173**, **177** и **179**. Изомерные 2-замещенные бензимидазолы могут быть очищены высаживанием гексаном из хлороформного раствора, разделение изомеров возможно с использованием колоночной хроматографии с внешним подогревом. Несмотря на несложные структуры, установление расположения заместителей при циклопентановом кольце представляет определенные трудности. В связи с этим, для основного изомера бензимидазола **175**, полученного нами на основе камфоры, нам удалось получить кристалл, подходящий для проведения рентгеноструктурного исследования. Нанесение смеси бензоксазолов **171** и **172** на силикагель, импрегнированный нитратом серебра, приводит к образованию монодентатного комплекса бензоксазола с нитратом серебра **183**. Рентгеноструктурный анализ полученного комплекса однозначно подтвердил cis расположение заместителей у циклопентанового кольца в основном изомере. В описанном комплексе на одну молекулу нитрата серебра приходится одна молекула бензоксазола (по данным РСА и элементного анализа). В современной литературе описаны только бидентатные комплексы серебра с 2-замещенными бензоксазолами. Взаимодействием смеси бензимидазолов **181** и **182**, полученных на основе (+)-фенхона, с хлоридом меди I нам удалось получить бидентатный комплекс **184**.



Исходя из строения конечных продуктов, предположен механизм исследуемых превращений, включающий образование соответствующих оснований Шиффа на основе каркасных кетонов, их дальнейшую циклизацию в спироциклический интермедиат, гомолитический разрыв последнего протекает с образованием соответствующих соединений. Для доказательства предполагаемого механизма, синтезированное ранее нами основание Шиффа из камфоры и орто-аминофенола **29** выдержано в условиях проведения описанных реакций. Показано, что из указанного имида **29** идет образование бензоксазолов **171** и **172** в том же соотношении.

1.1.6. Химические модификации (+)-камфорной кислоты

Продолжая поиски природных структурных блоков, которые можно использовать в качестве платформы для синтеза противовирусных агентов, нами в качестве следующего объекта исследований была выбрана коммерчески доступная (1R,3S)-(+)-камфорная кислота. Данная дикарбоновая кислота также может быть получена окислением камфоры азотной кислотой при нагревании. Известно, что соединение под шифром ST-246 (Tecovirimat), имеющий каркасный структурный блок, проявляет высокую активность против вируса натуральной оспы. К настоящему времени показана высокая активность этого соединения и аналога, разработанного в НИОХ СО РАН (агента НИОХ-14) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, изучен механизм противовирусного действия. Нами было предположено, что замена каркасного фрагмента в описанных агентах на фрагмент камфорного ангидрида, легко получаемого из камфорной кислоты, может привести к новому классу соединений, обладающих противовирусными свойствами. С данной целью нами был масштабирован описанный ранее в литературе синтез камфорного ангидрида и проведены реакции последнего с замещенными бензогидразидами. Соединения, содержащие фрагмент 1,8,8-триметил-2,4-диокса-3-азабицило[3.2.1]октан **185-186** получены реакцией камфорного ангидрида с пара замещенными гидразидами, гетероароматическое производное **187** реакций ангидрида с иониазидом (схема 20).

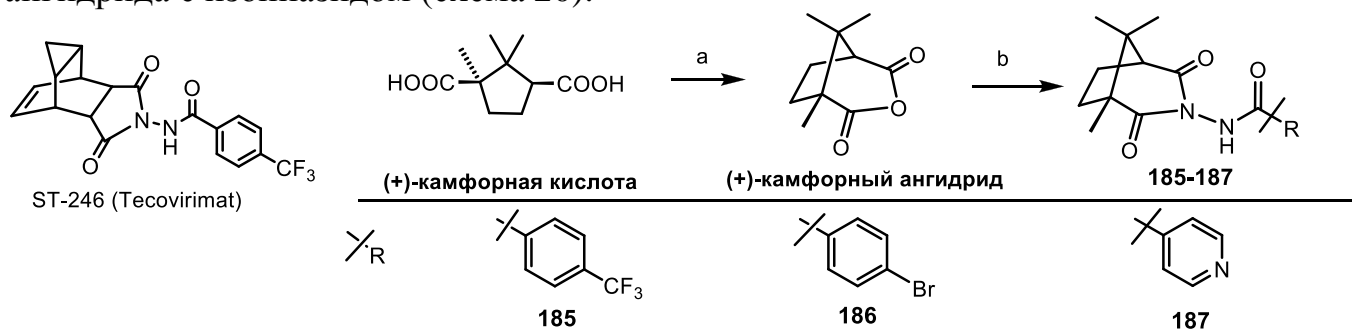


Схема 20.

a) SOCl_2 , Na_2CO_3 , CH_2Cl_2 -диоксан, 4 ч.; b) $\text{NH}_2\text{NH-CO-Ar}$, EtOH, DIPEA, кипячение 8 ч.

С целью расширения синтетического потенциала использования коммерчески доступной (+) камфорной кислоты, нами проведена была серия реакций указанной кислоты с диаминами различного строения. Общая схема превращений и синтезированные нами полициклические агенты изображены на схеме 21. Было показано, что взаимодействие камфорной кислоты с алифатическими диаминами – этилендиамином, 1,3-диаминопропаном и 2-гидрокси-1,3-диаминопропаном в условиях кипячения реакционной смеси в среде фенола приводит к образованию соединений **188-191**. Следует отметить, что в реакциях с этилендиамином и 1,3-диаминопропаном происходит образование трициклических соединений **188, 189**, в то время как в реакции с 2-гидрокси-1,3-диаминопропаном образуются изомерные вещества **190** и **191** в соотношении 1:1. Проведение реакций с диаминами, содержащими ароматический фрагмент – орто-фенилендиамином, 2-аминобензиламином и 1,8-диаминонафталином не требует добавления фенола в реакционную смесь, полициклические продукты образуются при расплаве реакционной смеси, содержащей камфорную кислоту и соответствующий диамин в течение 4-6 часов. В реакциях с ароматическими аминами – о-фенилендиамином и диаминонафталином происходит образование продуктов **192, 193** и **194, 195** в соотношении 10:1, основными продуктами являются соединения, в которых кетогруппа расположена рядом с метильной группой в узловом положении. В реакции с 2-аминобензиламином основным продуктом является полициклическое соединение **196**, в котором внутримолекулярная иминогруппа находится рядом с метильным узловым фрагментом. Реакции идут без добавления катализаторов. Следует уделить внимание описанию синтезированных нами полициклических соединений с точки зрения отнесения их к определённым классам органических соединений. Так, вещество, полученное из камфорной кислоты и этилендиамина **188** можно отнести к производным 3,6,7,8-тетрагидро-2H-имидазола[1,2-а]пиридин-5-она; трициклические соединения **189-191** можно считать аналогами 2,3,4,7,8,9-гексагидро-пиридо[1,2-а]пиримидин-6-онов; тетрациклические соединения **192** и **193** имеют фрагмент 3,4-дигидробензо[4,5]имидазола[1,2-а]пиридиноновый фрагмент и данные соединения можно отнести к аналогам β-карболиновых алкалоидов гарманового ряда, таких как гарман, гармол и гармалин. Соединение, полученное из камфорной кислоты и 2-аминобензиламина **196**, имеет в своем остове 6,7,8,11-тетрагидропиридо[2,1-b]хиназолиновый фрагмент и может рассматриваться как аналог хиназолиновых алкалоидов (вазицин и вазицинон, дезоксипеганин). Данные природные соединения обладают широким спектром нативной биологической активности, в частности: нейропротекторной и антидепрессантной. Пентациклические каркасные вещества, выделенные и описанные нами в синтезе с 1,8-диаминонафталином **194** и **195**, имеют структурный фрагмент 9,10-дигидропиридо[1,2-а]перимидинона. Данные соединения, как предполагается нами, могут представлять интерес не только как потенциально важные биологически активные агенты, но и в качестве лигандов в синтезе комплексов с металлами.

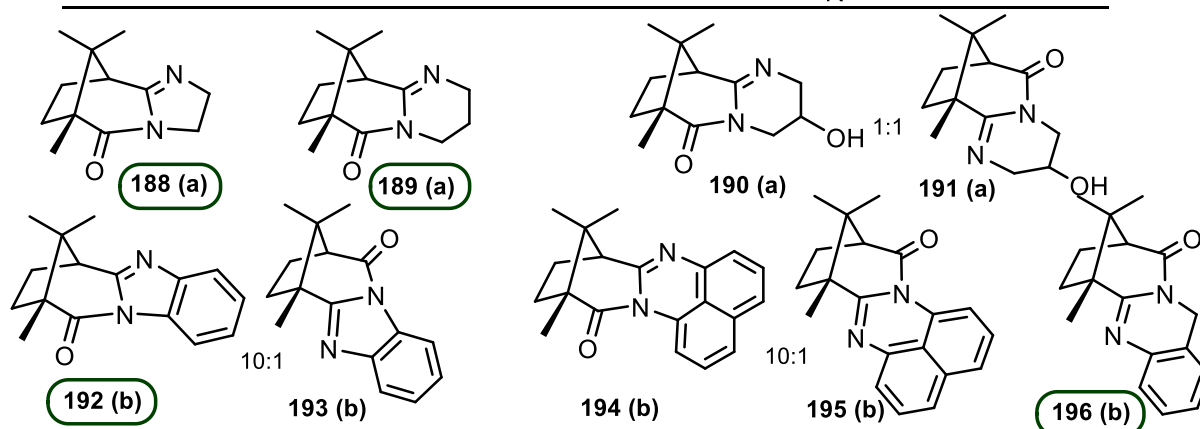
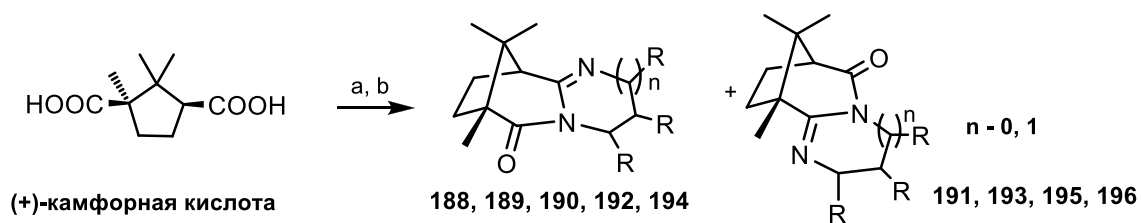


Схема 21.

а) $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$, фенол, кипячение 4 ч.; б) $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$, кипячение 6-8 ч.

1.1.7. Химические модификации гидразона камфоры

С целью расширения синтетических возможностей использования доступного монотерпеноида – (+)- камфоры в синтезе потенциально биологически активных соединений, по описанной в литературе методике был получен гидразон камфоры. Наличие первичной аминогруппы в остове гидразона камфоры **197** дает возможность модификации по этой функциональной группе. Нами были проведены синтезы на основе данного агента в двух направлениях – получение насыщенных азотосодержащих производных и синтез азинов - соединений, содержащих две иминогруппы в своем остове (схема 22). Ранее в литературе были описаны методы синтеза насыщенных N-гетероциклов на основе первичной аминогруппы в аминопроизводных терпеноидов. Описаны реакции 1-амино-пирролидина, 1-амино-пиперидина и 1-амино-азепана с кетонами и альдегидами, приводящие к соединениям, содержащим соответствующие N-гетероциклы. Указанные амины являются коммерческими реактивами, однако стоимость таких соединений достаточно высока. Нами было показано, что аналогичные агенты можно получать взаимодействием гидразонов с алифатическими дигалогенидами, являющимися доступными реактивами. С использованием данного подхода нами были синтезированы соединения, содержащие пирролидиновый **198**, пиперидиновый **199** и азепановый **200** фрагмент рядом с иминогруппой. Указанный метод синтеза насыщенных гетероциклических фрагментов на основе гидразонов ранее в литературе описан не был. Для получения 1,5,3-дитиоазепанового фрагмента в соединении **201** была применена реакция конденсации формальдегида, 1,2-этандитиола и гидразона камфоры. В литературе нами не обнаружены вещества, содержащие дитиоазепановый фрагмент, сопряженный с иминогруппой. Взаимодействием гидразона камфоры с ароматическими альдегидами были синтезированы соответствующие алдазины **202-205**, симметричный кетазин **206** образуется в указанных превращениях в качестве побочного продукта.

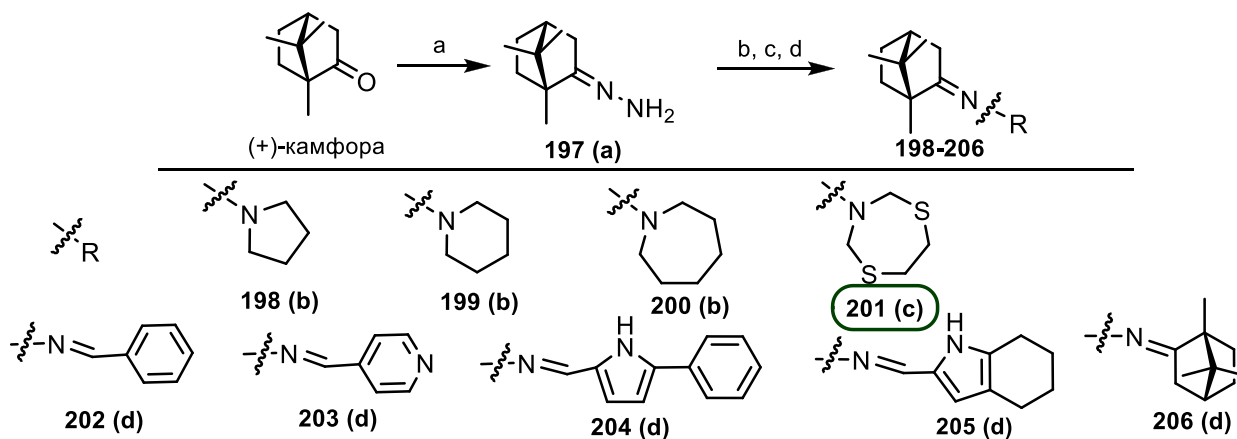


Схема 22.

а) гидразин гидрат, PrOH, CH₃COOH, кипячение 10 ч.; б) Br-R-Br, CH₃CN, K₂CO₃, кипячение 6 ч.;
 в) H₂CO, HS-CH₂CH₂-SH, Sm(NO₃)₃·6H₂O, CHCl₃; д) RCHO, EtOH.

1.2. Химические модификации соединений сесквитерпнового ряда – гумулена, кариофиллена и изокариофиллена

В данной работе в качестве исходных соединений сесквитерпенового ряда были выбраны коммерчески доступные α -гумулен и кариофиллен. α -Гумулен выделяется из эфирного масла *Humulus lupulus* (хмель обыкновенный), от которого и произошло название данного природного соединения. Кариофиллен – наиболее распространённый представитель ряда бициклических сесквитерпенов, присутствует во многих эфирных маслах, особенно большим содержанием кариофиллена отличаются масла *Eugenia caryophyllata*, *Myrica gale* and *Comptonia peregrina*. В промышленности данное соединение выделяется из отходов гвоздичного масла.

Образование амидной связи – одно из важнейших направлений в органической химии, поскольку такой тип связи существует во множестве природных молекулах – пептидах, протеинах, полимерных материалах и алкалоидах. Среди широко известных методов синтеза амидной связи особое положение занимает реакция Риттера – метод синтеза N-замещенных амидов карбоновых кислот алкилированием нитрилов карбокатионами. Нами было показано, что растворение α -гумулена в ацетонитриле, содержащем 5% серной кислоты с последующим гашением водным раствором углекислого натрия приводит к образованию в качестве основного продукта трициклического ацетамида **207**, имеющего остов природного α -кариофилленового спирта (схема 23). Образование симметричного ацетамида происходит путем последовательных внутримолекулярных перегруппировок и улавливания карбокатионом молекулы ацетонитрила.

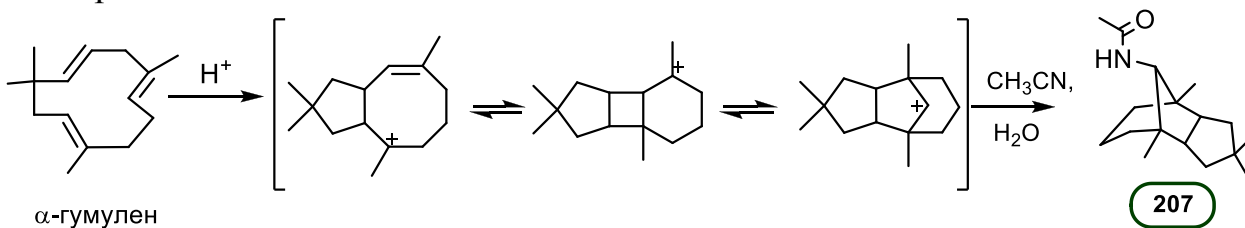


Схема 23.

Растворение (-)-кариофиллена в ацетонитриле с добавлением 5% серной кислоты, с последующей обработкой водным раствором углекислого натрия

приводит к образованию оптически активных трициклических амидов **208** и **209** с кариолановым и кловановым остовами в соотношении 3:1 соответственно (схема 24).

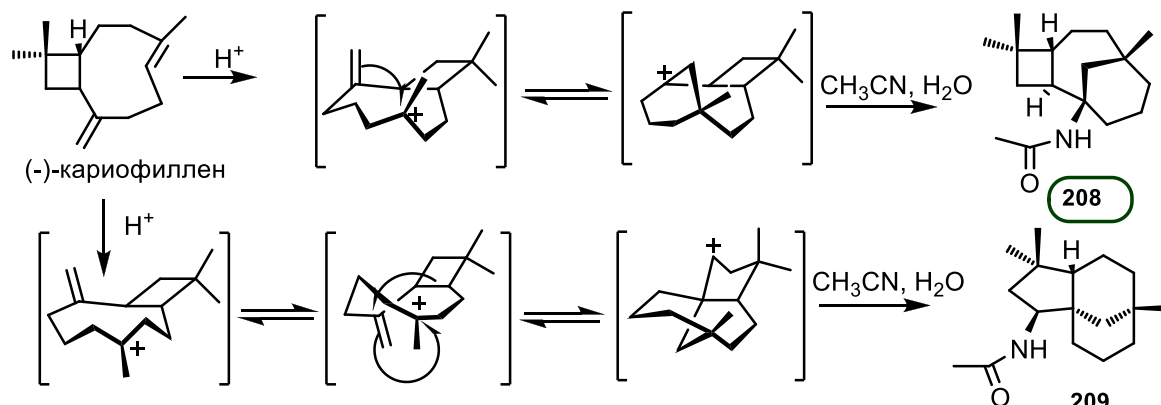


Схема 24.

Другое природное соединение – изокариофиллен, было нами получено термической изомеризацией доступного кариофиллена в присутствии металлического селена. Растворение изокариофиллена в тех же условиях приводит к образованию в качестве основного продукта оптически активного соединения **210** (схема 25). Следует отметить, что наряду с образованием соединения **210** происходит образование сложной смеси изомерных продуктов, однако основной ацетамид (как и соединение **207**) хорошо выделяется кристаллизацией из ацетонитрильного раствора смеси. Остов соединения **210** совпадает с остовом природного трициклического спирта гинсенола. Данный сесквитерпеновый спирт был выделен из эфирного экстракта корня женьшеня *Panax ginseng*; его содержание составляет от 1 до 2% в летучей фракции экстракта женьшеня. Ранее было показано, что данный трициклический спирт, наряду с другим изомером, образуется при гашении водой раствора соли иона (A), генерированного из неокловена при растворении в системе HSO₃F-SO₂FCl при -120 °C².

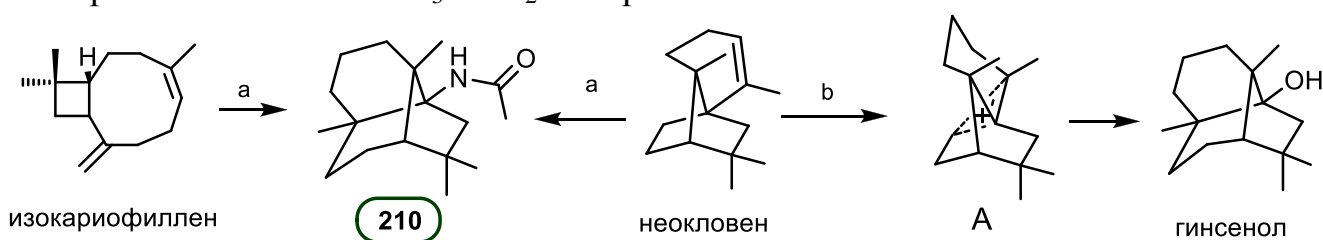


Схема 25.

а) CH₃CN, H₂SO₄, H₂O; б) HSO₃F-SO₂FCl -120 °C.

Известно, что неокловен является одним из основных продуктов кислотно-катализируемой циклизации изокариофиллена. Приведенные выше данные указывают на то, что механизм образования трициклического ацетамида **210** включает в себя изомеризацию изокариофиллена в неокловен и дальнейшие перегруппировки, приводящие к катиону (A), улавливание которого молекулой ацетонитрила с последующим взаимодействием с молекулой воды приводит к образованию указанного ацетамида. Действительно, нами было показано, что растворение неокловена в системе ацетонитрил-серная кислота приводит к

² ЖОрХ. -1991, -№ 27, С. 570.

образованию соединения **210** в качестве единственного продукта, что подтверждает наши предположения о возможном механизме реакции.

С целью расширения круга соединений, вступающих в реакцию Риттера, нами было изучено взаимодействие $4\beta,5\alpha$ -эпоксида кариофиллена **210** и $4\beta,5\beta$ -эпоксида изокариофиллена **211** с ацетонитрилом, катализируемое серной кислотой. В данных процессах с хорошими выходами идет образование амидов **212** и **213** (схема 26). Катионы, образовавшиеся после раскрытия эпоксидного цикла, претерпевают описанные ранее перегруппировки, приводящие к образованию ионов с кловановым типом остова, улавливание которых молекулами ацетонитрила с последующим гидролизом приводит к образованию соответствующих N-алкиламидов. Оптически активные соединения **212** и **213** различаются между собой только конфигурацией гидроксильной группы.

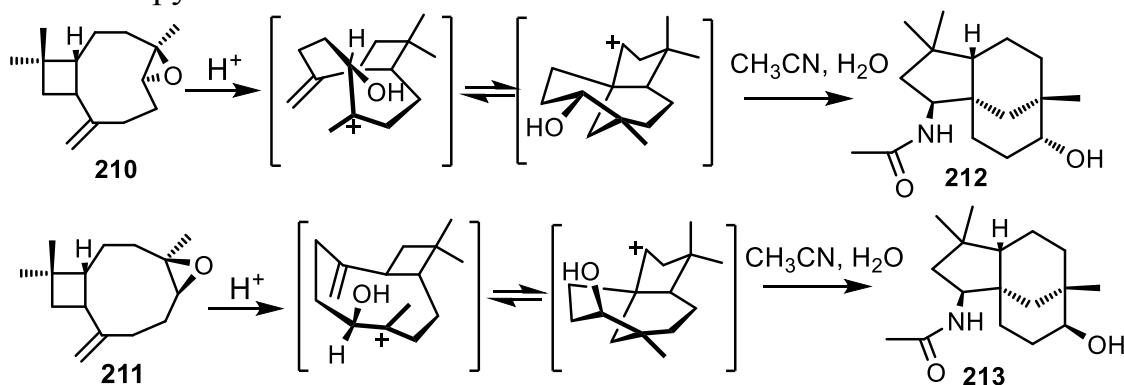


Схема 26.

В результате данной работы, было показано, что нуклеофильное присоединение нитрилов к карбокатионам, известное под названием реакции Риттера, является удобным методом изучения многоступенчатых перегруппировок, поскольку присутствие в реакционной среде слабого нуклеофила (нитрила), с одной стороны, создает возможность химической стабилизации образующихся по ходу реакции карбокатионов; с другой стороны, наиболее лабильные и короткоживущие катионы не успевают прореагировать со слабым нуклеофилом, что позволяет получать либо относительно простые реакционные смеси, либо индивидуальные вещества из таких высоко реакционноспособных и полифункциональных веществ как терпеноиды.

1.3. Синтезы на основе соединений дитерпенового ряда

1.3.1. Кислотно-катализируемые реакции изоцеμβрола

Изоцеμβрол – дитерпеновая компонента живицы кедра сибирского (*Pinus Sibirica*), является представителем широкой группы цеμβраноидов. Основные продуценты цеμβраноидов – хвойные растения, табак и морские беспозвоночные, особенно кораллы. Данный циклический спирт был впервые выделен из нейтральной части живицы *Pinus sibirica* (R) Mayr. Нами было усовершенствовано выделение изоцеμβрола из нейтральной части живицы экстракцией неполярными растворителями с последующей очисткой целевого продукта методом колоночной хроматографии. Данный способ имеет ряд преимуществ по сравнению с известными методиками: - растворители и метод экстракции живицы подобраны таким образом, что образующаяся смесь, содержащая изоцеμβрол, подвижна и легко подвергается либо хроматографии, либо вакуумной перегонке; выход целевого продукта по предлагаемому способу составляет 2.9-3.8% от общей массы живицы и 18-22% от

массы гексанового экстракта, что значительно выше известных методов (ранее изоцеброл выделяли с выходом 1.9% от нейтральной части и 0.5% от общей массы живицы). Нами были изучены реакции указанного дитерпенового соединения с аллиловым и метиловым спиртами на глине К-10. Показано, что добавление изоцебрала в систему аллиловый спирт-глина приводит к образованию в качестве основного соединения межмолекулярного продукта - аллилового эфира изоцебрала **214** (схема 27). Если вносить изоцеброл в систему хлористый метилен - аллиловый спирт – глина, основным продуктом является соединение **215** образующееся в результате внутримолекулярной циклизации и последующего взаимодействия с аллиловым спиртом; кроме того, идет образование смеси цебренов. Взаимодействие изоцебрала с метиловым спиртом, катализируемое глиной, приводит к образованию продуктов **216** и **217** в соотношении 1:1

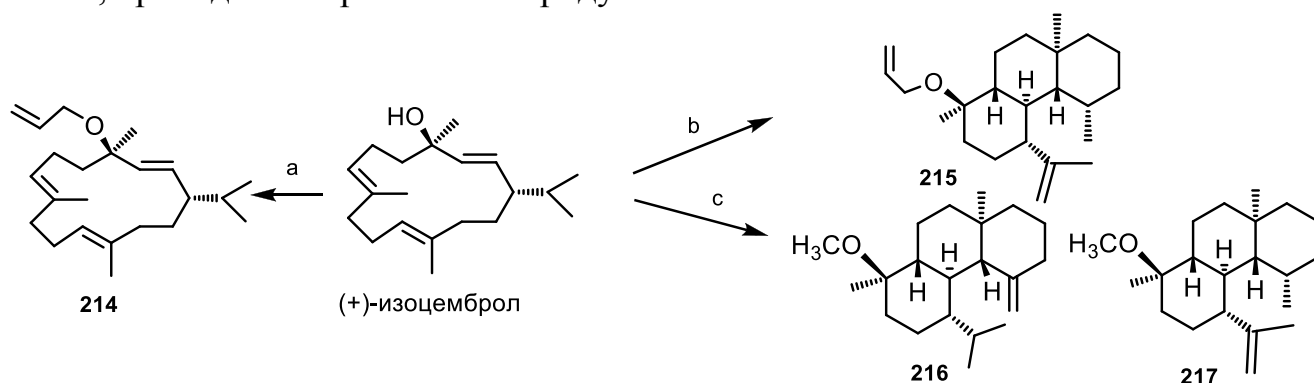


Схема 27.

а) глина К 10, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$; б) глина К 10, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$; в) глина К 10, CH_2Cl_2 , CH_3OH .

1.3.2. Синтезы соединений на основе дегидроабietiамина

Следующим объектом химических модификаций в данной работе являлся дегидроабietiамин (ДГААм) – производное дегидроабietiиновой кислоты (ДАК), содержащейся в живицах хвойных растений относящихся к родам *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix*. Особенно высоким содержанием дегидроабietiиновой кислоты (71 %) отличается живица ели *Picea obovata*. В последние годы было обнаружено, что гидрохлорид дегидроабietiамина проявляет высокую цитотоксичность на ряде раковых клеток. Было показано, что ДГААм показывает высокую ингибирующую эффективность избирательно уничтожать клетки меланомы путем уменьшения уровня клеточной пролиферации и увеличения апоптоза. Анализ литературных данных по химическим превращениям ДГААмина показал, что ранее были описаны разнообразные амиды и иминопроизводные, получены производные, содержащие заместители в ароматическом кольце. Нами были проведены два основных направления химических модификаций указанного дитерпенового амина. С целью изучения влияния противоиона на биологическую активность солей ДГААмина, был синтезирован набор солей данного дитерпеноида, кроме того, были проведены химические модификации первичной аминогруппы с целью получения не описанных ранее гетероциклических производных.

1.3.2.1. Получение аммониевых солей дегидроабietiамина

Перевод изучаемого биологически активного соединения в ионную форму приводит к изменению физико-химических характеристик, в первую очередь растворимости данного производного. Нами получен набор солей ДГААмина **219a-**

n. В качестве противоионов были выбраны карбоновые кислоты различного строения: алифатическая карбоновая кислота - вальпроевая **218a**, коричная кислота **218b** и ее природные аналоги – кофейная **218c** и феруловая **218d**; ароматические **218e**, **218f**, сульфоароматическая **218g** и гетероароматические кислоты **218h**, **218i**. Кроме того, получены соли ДГААмина природных кислот - дегидроабиетиновой кислоты **218j**, дезоксихолиевой кислоты **218k**, бетулоновой **218l**, урсоловой **218m** и глицирретовой кислоты **218n** (схема 28). Для сравнения биологической активности описанных нами солей был получен уже известный гидрохлорид дегидроабиетиламина **220**. Образование аммониевых солей подтверждено методом ИК и ЯМР спектроскопии.

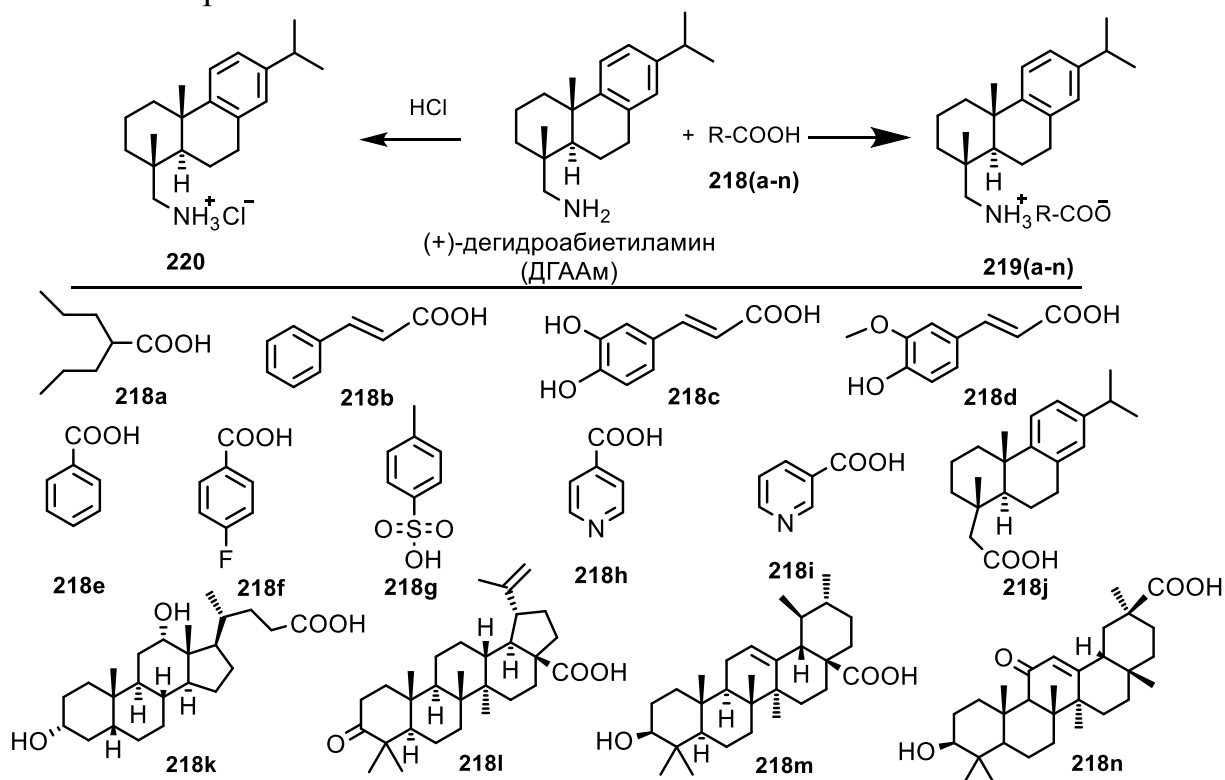


Схема 28.

1.3.2.2. Получение гетероциклических производных дегидроабиетиламина

Следующим направлением химических модификаций изучаемого нами дитерпенового амина был синтез азотсодержащих гетероциклов на основе первичной аминогруппы дегидроабиетиламина. Для получения алифатических пяти, шести, и семичленных азотистых гетероциклов проводилась реакция алкилирования первичных аминов алифатическими дигалогеналканами различного строения. Было показано, что при взаимодействии дегидроабиетиламина с 1,4-диiodбутаном образуется соединение **221**, содержащее пирролидиновый фрагмент; при взаимодействии с 1,5-дибромпентаном – соединение **222**, содержащее пиперидиновый фрагмент; реакция первичного амина с бис-(2-бромэтиловым) эфиром приводит к образованию соединения **223**, содержащего морфолиновый фрагмент; взаимодействие с 1,6-дибромгексаном – к агенту **224**, содержащему азепановый гетероцикл (схема 29). Для получения 1,5,3-дитиоазепанового фрагмента в соединении **225** была применена реакция конденсации формальдегида, 1,2-этандитиола и дегидроабиетиламина. Для синтеза 1,5,3-диоксоазепанового производного **226** была проведена трехкомпонентная конденсация дегидроабиетиламина, тиоэтанола и формальдегида, катализируемая нитратом

самария. Проведение взаимодействия α,α' -дибром-орто-ксилола с дегидроабетиламином в диоксане с добавлением щелочи привело к соединению **227**, содержащему изоиндолиноновый фрагмент.

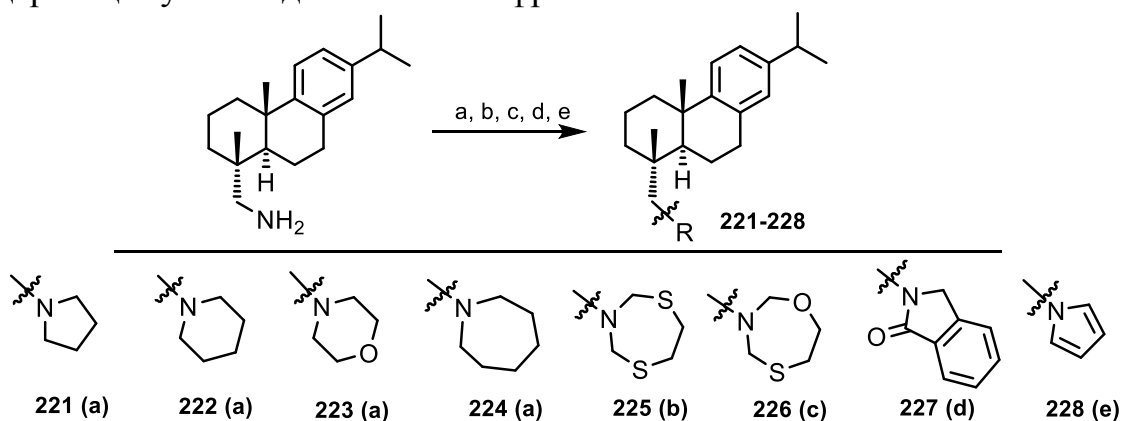


Схема 29.

a) Hal-(CH₂)_n-Hal, (Br-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-Br – для **223**), K₂CO₃, CH₃CN; b) SHCH₂CH₂SH, CH₂=O, Sm(NO₃)₃·6H₂O, CHCl₃; c) SHCH₂CH₂OH, CH₂=O, Sm(NO₃)₃·6H₂O, CHCl₃; d) α,α' -дибром-орто-ксилол, NaOH, диоксан; e) 2,5-диметокситетрагидрофуран, глина K-10.

Примеров получения изоиндолинонов в одну стадию из первичного амина и α,α' -дибром-орто-ксилола в литературе нами найдено не было. Для реакции ДГААм и α,α' -дибром-орто-ксилола нами был предложен механизм, включающий изначально образование изоиндолинового фрагмента и последующее его окисление в реакционной смеси. Для выявления влияния типа гетероциклического фрагмента на проявляемую активность, нами было синтезировано соединение с пиррольным циклом. Проведение данного превращения без растворителя с использованием глины K-10 позволило провести реакцию менее чем за 30 минут с образованием соединения **228**.

1.3.2.3. Получение мочевины и тиомочевины на основе дегидроабетиламина

Введение в молекулу природного происхождения фрагмента мочевины или тиомочевины в современной медицинской химии привлекает внимание многих исследователей. Это обусловлено легкостью проведения реакции первичных аминов с изоцианатами или изотиоцианатами, устойчивостью мочевины\тиомочевины и возможностью дальнейшей химической модификации данного структурного фрагмента.

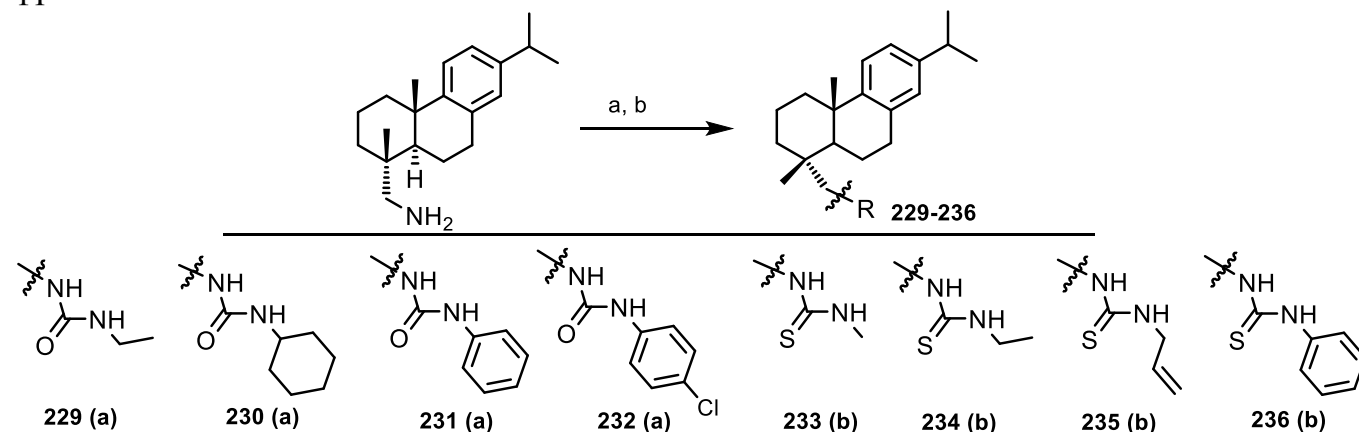


Схема 30.

a) R-N=C=O, CHCl₃; b) R-N=C=S, CHCl₃.

Нами по описанной в литературе методике получен набор соединений, имеющих указанные структурные блоки. Так, реакцией алифатических изоцианатов с ДГААмином получены агенты **229** и **230**, реакцией с ароматическими изоцианатами соединения **231** и **232**. Выделены и описаны тиомочевины **233-236** (схема 30).

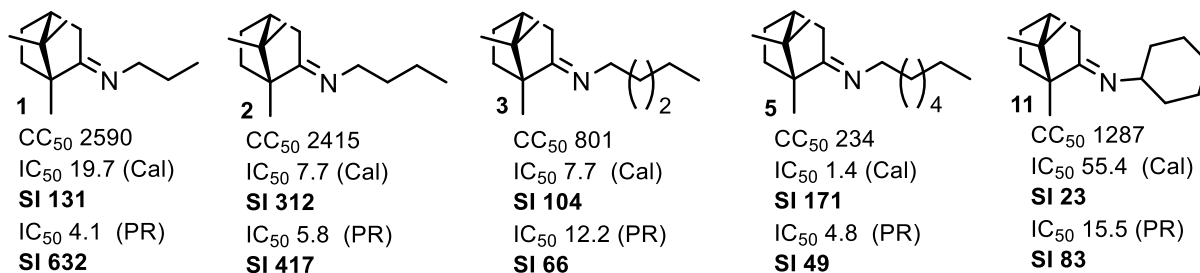
2. Изучение связи структуры синтезированных соединений с их противовирусной активностью

2.1. Активность против вирусов гриппа

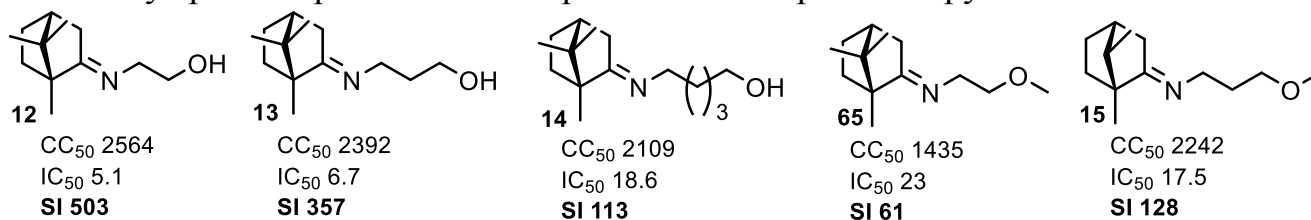
Основной целью представленной работы является выявление новых агентов, проявляющих противовирусную активность. При этом особое внимание было нами уделено поиску соединений, проявляющих вирусингибирующую активность в отношении вируса гриппа. Практически все синтезированные в представленной работе соединения были протестированы в отношении ингибирования вирусов гриппа. Важной характеристикой биологической активности исследуемых соединений является терапевтический индекс или индекс селективности (SI). Терапевтический индекс это соотношение между количеством вещества, которая вызывает повреждение половины здоровых клеток (CC_{50}), и дозировкой, которая необходима для достижения определенного уровня активности действия данного вещества (IC_{50}). Это соотношение отражает эффективность и безопасность исследуемого соединения. Принято считать, что соединения, терапевтический индекс которых превышает 8, проявляют изучаемую активность. Исследования противовирусной активности синтезированных нами агентов были проведены коллективом исследователей под руководством к.б.н. **Зарубаева В.В.** в Санкт-Петербургском НИИ Гриппа и институте Пастера.

Противовирусная активность синтезированных веществ изучалась на модели гриппозной инфекции клеток MDCK, вызванной штаммом вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 или штаммом A/California/07/09 (H1N1)pdm09, резистентным к противовирусным препаратам адамантанового типа – амантадину и ремантадину. Следует отметить, что прямое сопоставление величин индексов селективности для соединений разных структурных типов, как правило, не имеет особого смысла, так как они могут обладать принципиально разными фармакокинетическими свойствами при переходе к экспериментам *in vivo*, и при определении перспективных для дальнейших исследований соединений нужно выбирать наиболее активные соединения каждого структурного типа. Активность соединений **1-11** была изучена нами в отношении двух штаммов вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Cal) и A/Puerto Rico/8/34 (PR) (здесь и далее данные приведены в мкмоль). Среди алифатических иминов на основе камфоры подавляющее количество соединений проявляет вирусингибирующую активность в концентрациях от 1.4 до 30 мкмоль, в отличие от исходной камфоры. В тоже время, цитотоксичность изученных нами соединений меняется значительно. Показано, что увеличение длины алифатической цепочки в общем случае, приводит к увеличению токсичности соединения. Шесть из 11 синтезированных веществ проявляют противовирусную активность выше, чем препараты сравнения, при этом два из них, имины камфоры с пропильным **1** и бутильным **2** алифатическим фрагментом, проявляют особенно высокую вирусингибирующую активность при низкой цитотоксичности. Можно считать, что данные соединения заслуживают особого

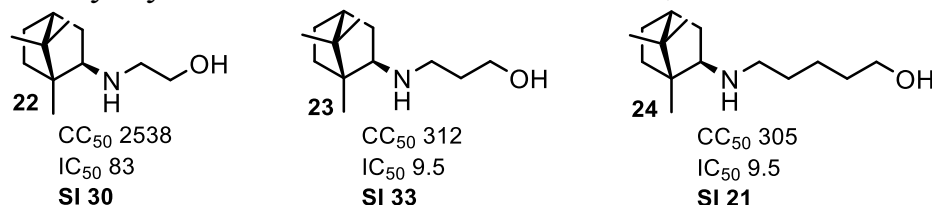
внимания и являются соединениями-лидерами в данном классе веществ. Из пары соединений, содержащих циклический насыщенный фрагмент, вещество с циклопропильным заместителем не проявило активности вовсе, а соединение **11** с циклогексильным фрагментом имеет выраженную активность особенно в отношении штамма A/Puerto Rico/8/34.



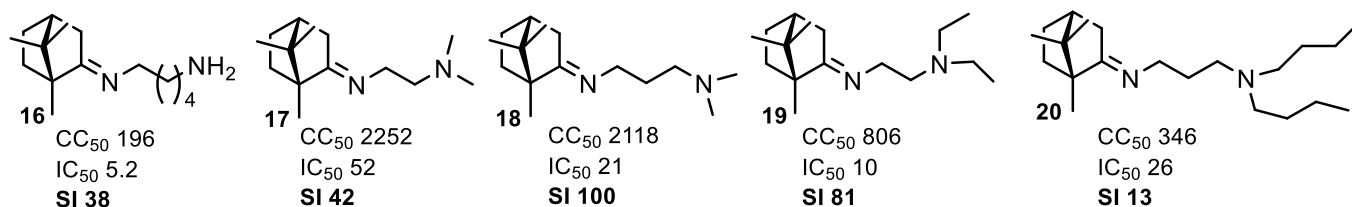
Соединения, синтез которых описан на схемах 2 и 8 протестированы нами в отношении штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Среди данных соединений особое внимание заслуживают иминоспирты **12-14**. Наибольшую активность при минимальной токсичности проявил продукт взаимодействия (+)-камфоры и аминоэтанола – соединение **12**. Индекс селективности данного соединения более 500 и превышает таковой у препаратов сравнения каркасного типа в сто и более раз. Вещества, содержащие эфирные терминальные фрагменты **65** и **15** также могут рассматриваться как перспективные противовирусные агенты.



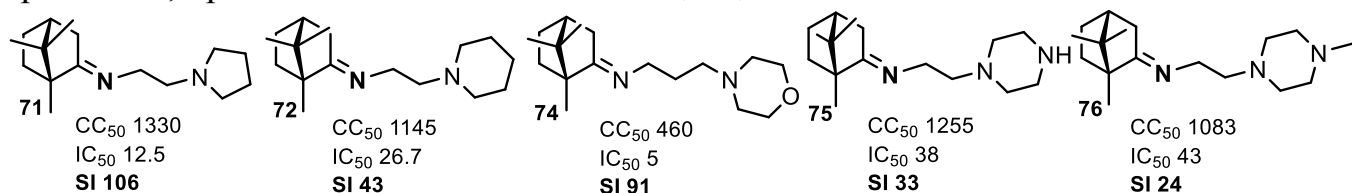
Важным моментом, на наш взгляд, является тот факт, что соединения, в которых нами была проведена химическая модификация иминогруппы, становятся либо менее активными в отношении данных вирусов, либо просто нестабильными при хранении, что значительно затрудняет исследование биологической активности. Так, в связи с высокой лабильностью, протестировать активность спирооксазаридинов **69** и **70** не предоставляется возможным. Активность аминоспирта **22** значительно ниже таковой, чем у соединения **12**, аминоспирты **23**, **24** проявляют достаточно высокую активность, однако токсичность указанных соединений превосходит таковую у невосстановленных иминов **13**, **14**.



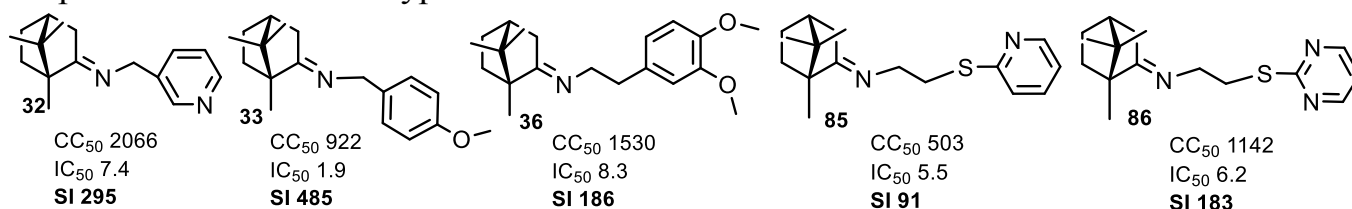
Среди иминов камфоры, содержащих первичную и вторичную аминогруппу (схема 2), наибольшую вирусингибирующую активность и низкую токсичность проявили агенты **18** и **19**. Иминоамин **16** является высокоэффективным ингибитором указанного штамма вируса гриппа, однако его токсичность также достаточно высока, что соответственно значительно снижает терапевтический индекс этого соединения. Увеличение длины алифатических заместителей у третичного атома азота повышает токсичность агента **20**.



Далее нами была изучена связь структуры иминопроводных камфоры, содержащих насыщенный N-гетероцикл, с проявляемой активностью против вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34. Показано, что наибольшую вирусингибирующую активность проявили соединения **71** и **74**, содержащие пирролидиновый и морфолиновый фрагмент. Значительную активность, превышающую препарат сравнения, проявили также соединения **72**, **75**, **76**.

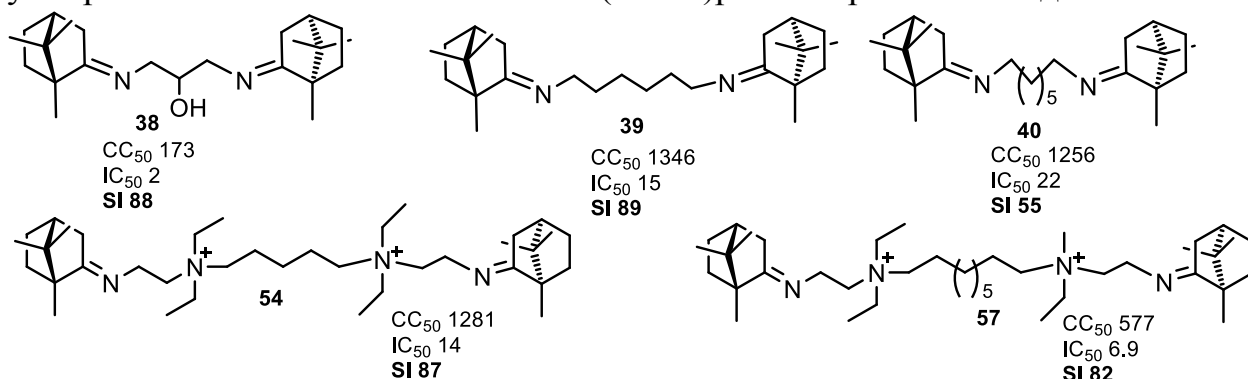


Продукт взаимодействия (+)-камфоры и 2-пиколиламина агент **32**, в отличие от соединения **31**, не содержащего ароматический азот, проявляет высокую активность наряду с низкой токсичностью. Наиболее высокий показатель противовирусной активности обнаружен нами у соединения **33** являющегося продуктом взаимодействия исходного кетона и 4-метоксибензиламина. Также, крайне высокая активность наряду с низкой токсичностью была нами обнаружена у соединения **36**, содержащего две метокси-группы в ароматическом кольце. Важно, что структурно подобные соединения **31** и **35**, не имеющие метоксизаместителей в ароматическом кольце проявляют лишь незначительную противовирусную активность. Среди синтезированных нами соединений, содержащих гетероароматический фрагмент, соединенный через атом серы с природным камфорным остовом (схема 10), высокую активность проявили агенты, содержащие пиридиновый **85** и пиримидиновый ароматический гетероцикл **86**. Следует отметить, что замещение фрагмента пиридин-2-тиола на пиримидин-2-тиольный радикал в соединении **86** значительно уменьшает токсичность, в то время как противовирусная активность сохраняется на высоком уровне.

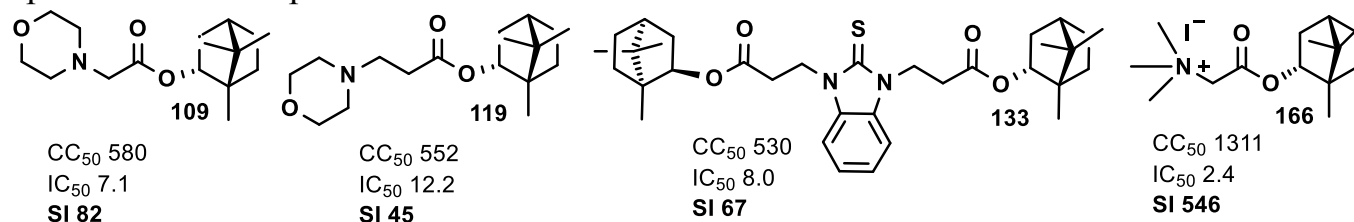


Синтезированные с использованием методов «клик химии» соединения на основе иминоспирта **12** были проверены в отношении вируса гриппа А H1N1 штамм A/Puerto Rico/8/34. В целом, можно сказать, что введение триазольного кольца не увеличивает активность описанных нами соединений. Из всех новых агентов, только вещества, содержащие алифатические спиртовые группы в 4 положении триазольного кольца **92**, **93**, метоксиаминный **95** или морфолиновый фрагменты **96** проявили умеренно выраженную активность против указанного штамма вируса гриппа. Среди так называемых «димерных» соединений, полученных прямым взаимодействием камфоры с диаминами различного строения (схема 4),

выраженную активность в отношении вируса гриппа H1N1 штамм A/California проявили соединения, в которых природные фрагменты разделены алифатическими линкерами. Среди пары веществ, разделенных пропильным линкером **37** и **38**, более высокая вирусингибирующая активность обнаружена нами у соединения **38**, имеющего дополнительную спиртовую группу. Важным, на наш взгляд, является тот факт, что восстановленные симметричные диимины – экзо-экзо-диамины **47-51** хоть и проявляют выраженную активность против вирусов гриппа, становятся значительно токсичнее, что приводит к резкому снижению терапевтического индекса. Среди димерных агентов, содержащих два четвертичных атома азота (схема 6), нами обнаружено пять соединений, терапевтических индекс которых превышает таковые у препаратов сравнения. Наибольшую активность в отношении вируса гриппа штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09 проявили соединения **54** и **57**.

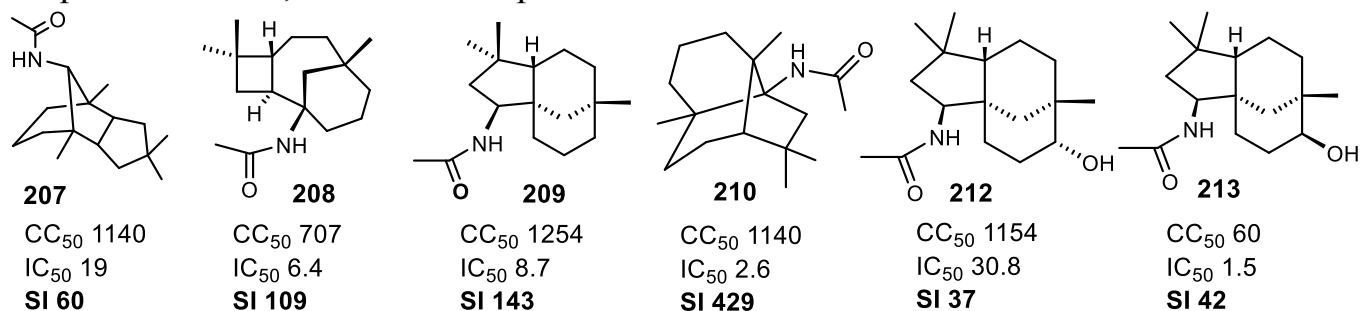


Анализ данных по противовирусной активности эфиров борнеола, содержащих насыщенные N-гетероциклы, показал, что наибольшую противовирусную активность при минимальной цитотоксичности проявили соединения, содержащие в своем остове морфолиновый фрагмент **109** и **119**. Следует также отметить соединения **110**, **111** и **121**, содержащие пиперазиновый фрагмент – данные вещества имеют высокую вирусингибирующую активность, однако проявляют достаточно высокую токсичность. Среди синтезированных нами производных (-)-борнеола, содержащих ароматический фрагмент, веществ, проявляющих особенно выраженную активность против вирусов гриппа, обнаружено не много. Тем не менее, было показано, что продукт взаимодействия 2-меркаптобензимидазола и двух молекул хлорпропионата борнеола - соединение **133** проявляет выраженную противовирусную активность. Амиды, синтезированные нами на основе борниламина (схема 16) заметной вирусингибирующей активности не проявили. Важные результаты были получены при изучении активности солей, синтезированных нами на основе эфиров борнеола. Показано, что соединение **166** проявляет крайне высокую вирусингибирующую активность наряду с низкой токсичностью. В тоже время аналогичное соединение **163**, имеющее другой противоион, хоть и является также не токсичным для клеток, проявляет активность практически в 20 раз ниже.



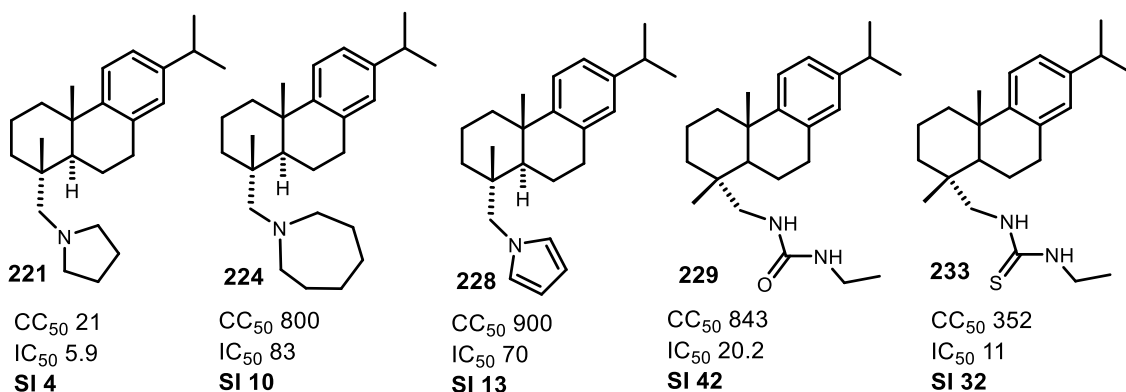
Среди соединений, имеющих в своем остове бензимидазольные, бензоксазольные и бензтиазольные фрагменты (схема 19) наибольшую активность против вирусов гриппа проявили агенты **175** и **181**, содержащие бензимидазольный гетероцикл. Среди полициклических производных, синтезированных нами на основе камфорной кислоты (схема 21) было обнаружено соединение, проявляющее широкий спектр противовирусной активности. Так, продукт взаимодействия камфорной кислоты и о-аминобензиламина, соединение **196** проявляет широкий спектр противовирусной активности в отношении вируса A PR(H1N1) (SI-62), A/Aichi/2/68 (H3N2) (SI-41) и вируса птиц A/mallard/Pennsylvania (H5N2) (SI-53).

Полученные нами на основе сесквитерпеноидов трициклические соединения, содержащие ацетамидный фрагмент (схемы 23-26), были изучены нами в качестве ингибиторов вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Симметричный трициклический ацетамид **207**, имеющий остов, совпадающий с остовом природного α -кариофилленового спирта, является нетоксичным соединением и ингибирует указанный штамм вируса в концентрации 19 мкмоль. Соединения с кариоллановым **208** и кловановым **209** остовами, полученные нами на основе кариофиллена, также являются нетоксичными агентами, при этом эффективность этих соединений еще выше. Наибольшая активность в отношении вируса гриппа H1N1 была нами обнаружена у трициклического соединения **210**, имеющего остов сесквитерпенового спирта гинсенола, выделенного ранее из женьшеня.

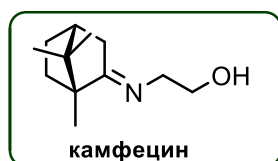


Агент **212** является не токсичным для живых клеток и имеет умеренную активность в отношении вирусов гриппа, в то время как соединение **213** с цис-расположением спиртовой группы по отношению к узловому метилу, проявляет достаточно высокую токсичность и в тоже время является эффективным ингибитором вируса гриппа. При этом терапевтические индексы указанных соединений примерно равны.

Из всех описанных нами гетероциклических производных дегидроабетиламина (схема 29) наибольшую активность проявило соединение, содержащее пирролидиновый фрагмент **221**, IC₅₀ составляет 5.9 мкмоль, однако данный агент оказался достаточно токсичным в условиях проведения эксперимента. Наибольший терапевтический индекс среди гетероциклических производных ДГААмина наблюдался у соединений **224** и **228**, при этом достигается он за счет невысокой токсичности указанных агентов. Среди синтезированных нами мочевины и тиомочевины ДГААмина (схема 30) наибольшую активность проявили соединения **229** и **233**, содержащие N-этильный заместитель.



В целом, можно сделать вывод о том, что нам удалось выявить новый класс высокоэффективных агентов против вирусов гриппа – иминопроводных камфоры. При этом было показано, что для проявления высокой противовирусной активности, необходимо наличие в соединении каркасного бицикло-[2.2.1]гептанового фрагмента, иминогруппы во 2 положении остова и определенных заместителей – алифатических, спиртовых, вторичных аминных или определенных ароматических или гетроароматических. Наиболее перспективными для дальнейших разработок и исследований, по результатам первичного скрининга, являются алифатические иминопроводные (+)-камфоры **1** и **2**, иминоспирт **12**, иминоамин **18**, агент **32**, имеющий в своем остова 2-пиридин-замещенный фрагмент, п-метоксиароматический имин **33** и пиримидин-2-тиольное производное **86** и четвертичная соль на основе борнеола **166**. Также, несомненным соединением лидером нами был выбран трициклический ацетамид **210**, имеющий каркасный остов гинсенола. Для указанных соединений были проведены более глубокие изучения биологической активности, включающие изучение на разных штаммах вирусов гриппа и было показано, что наиболее широкий спектр противовирусной активности показало соединение **12** – продукт взаимодействия камфоры и аминоэтанола. Данный агент активен в отношении нескольких штаммов вируса гриппа А H1N1, включая озельтамивир устойчивый А/Владивосток/2/09, проявляет выраженную активность в отношении вирусов H3N2, H5N2 и вируса В. Указанный агент был назван нами камфецин.



A/Владивосток/2/09(H1N1)	SI 77
A/PR (H1N1)	SI 645
A/Aichi (H3N2)	SI 75
A/mallard (H5N2)	SI 97
B/Lee	SI 116

2.2. Изучение активности против вируса Марбург

Вирусы Марбург и Эбола - это возбудители заболеваний, протекающих по типу геморрагических лихорадок, описаны сравнительно недавно и мало изучены. Они отнесены в отдельное семейство *Filoviridae* с единственным родом *Filovirus*. Заболевания, вызываемые данными вирусами, отличаются крайне высокой летальностью. В настоящее время не существует зарегистрированного патогенетического средства лечения филовирусных лихорадок, однако имеется ряд кандидатных препаратов, показавших антифиловирусную активность *in vitro* и *in vivo* на животных моделях. Несмотря на то, что вспышки эпидемии заболевания филовирусными инфекциями являются довольно редким явлением, разработка

препаратов, обладающих специфической противовирусной активностью против данного вируса является важной задачей медицинской химии и вирусологии.

Вход вируса в клетку – привлекательная точка приложения для терапии, так как блокирование инфекции на начальной стадии уменьшает цитопатическое действие на клетку, связанное с репликацией вируса, снижается риск приобретения вирусом лекарственной резистентности. Так как начальные стадии инфекции, включая вход в клетку и слияние вирусной и клеточной мембран, определяются вирусными поверхностными белками, при поиске ингибиторов этого класса возможно использование псевдотипированных вирусов – рекомбинантных, биологически безопасных вирусных частиц, имеющих капсид одного вируса и поверхностный белок другого вируса. Расширяя спектр изучаемой нами активности, подавляющее количество синтезированных нами соединений были проверены в отношении входа вируса Марбург в клетку с применением псевдовирусной системы на основе капсида вируса везикулярного стоматита имеющих поверхностные белки GP вирусов Марбург. Биологическое тестирование было проведено сотрудниками совместной лаборатории новых медицинских препаратов (НИОХ-НГУ) под руководством чл.-кор. РАН проф. **Покровского А.Г.**

Было показано, что из всех описанных нами соединений (включая разнообразные производные на основе камфоры), только производные борнеола, содержащие насыщенный N-гетероциклический фрагмент, проявляют активность в отношении указанных псевдовирусных систем. Показано, что борнеол не активен в отношении обоих псевдовирусов и не является токсичным, в то время как производные этого терпеноида, обладают различной токсичностью и противовирусной активностью. Среди низкотоксичных производных борнеола обнаруживается шесть веществ, являющихся относительно специфическими ингибиторами Marb-GP – опосредованной инфекции (SC>10). При этом наибольшую вирусспецифическую активность проявили соединения **117** и **118**, имеющие в своем остове пиперидиновый фрагмент. Кроме того, была выявлена общая зависимость индекса селективности полученных соединений от длины алифатической цепочки, соединяющей фармакофорные группы. Соединения с большей длиной цепочки оказались более активными в отношении rVSV-ΔG-MarV и имеют больший индекс селективности. Для подтверждения антифиловирусной активности соединения, проявившие активность на псевдовирусных частицах, были проверены в отношении ингибирования репликации вируса Марбург в культуре клеток. Данное биологическое исследование было проведено сотрудниками ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» под руководством заведующим отделом «Коллекция микроорганизмов», к.б.н. **Пьянкова О.В.** Данные исследования проводились в лаборатории уровня безопасности BSL4 в отношении вируса Марбург, штамм Ppp. Для соединений **117** и **118** была подтверждена высокая активность против «живого» вируса Марбург. Так, для соединения **117** действующая концентрация в отношении вируса Марбург составила IC₅₀ 3.7 мкмоль и терапевтический индекс SI 110, для агента **118** составила IC₅₀ 2.2 мкмоль и терапевтический индекс SI 32.

3. Изучение механизма действия соединений лидеров против вирусов гриппа

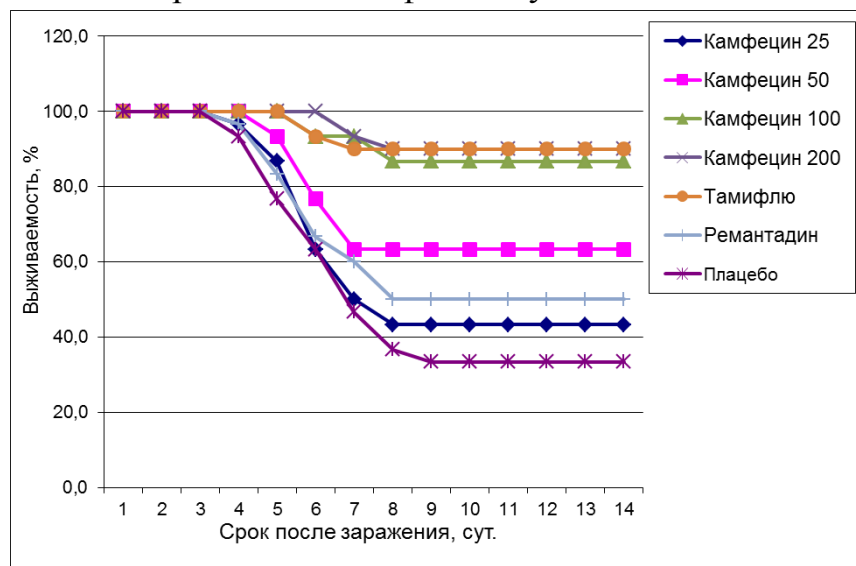
Важным аспектом при изучении противовирусной активности новых соединений является понимание механизма противовирусной активности. С этой

целью на первой стадии проводятся исследование активности ключевых агентов в зависимости от срока добавления в инфицированную клеточную культуру. Такие исследования предполагают определение этапа вирусной репликации, на который воздействует данный агент. На основании полученных данных можно провести предварительную оценку спектра потенциальных мишеней для конкретного соединения. Данные исследования, как и изучение специфической активности на животных моделях, были проведены в соавторстве с группой исследователей под руководством к.б.н. **Зарубаева В.В.** Было показано, что наибольшую активность соединения **1, 12, 19, 86 и 166** имели при добавлении в инфицированную клеточную культуру на ранних этапах вирусной репродукции (0-2 часа после инфицирования). С течением времени эффективность препаратов снижалась, и, начиная со срока 4 часа после заражения, инфекционная активность вируса статистически не отличалась от контрольных значений.

В связи с тем, что соединение **12** (камфецин) проявляет широкий спектр противовирусной активности, для этого иминопирта нами были проведены более детальные исследования механизма. Известно, что мишенями противовирусного действия на первой стадии вирусной репликации могут являться матриксный белок М2, отвечающий за насыщение протонами во время эндоцитоза и поверхностный гемагглютинин вируса гриппа, отвечающий за стадии прикрепления и входа вируса в клетку. Для изучения механизма противогриппозной активности камфецина была проведена оценка ингибирующей активности в отношении вирусного гемагглютинина (НА). Камфецин оказывал дозозависимое ингибирующее действие на активность вирусного гемагглютинина как для вируса гриппа А, так и для вируса гриппа В. Указанный эксперимент является доводом в пользу того, что основной мишенью противовирусного действия камфецина является поверхностный белок гемагглютинин.

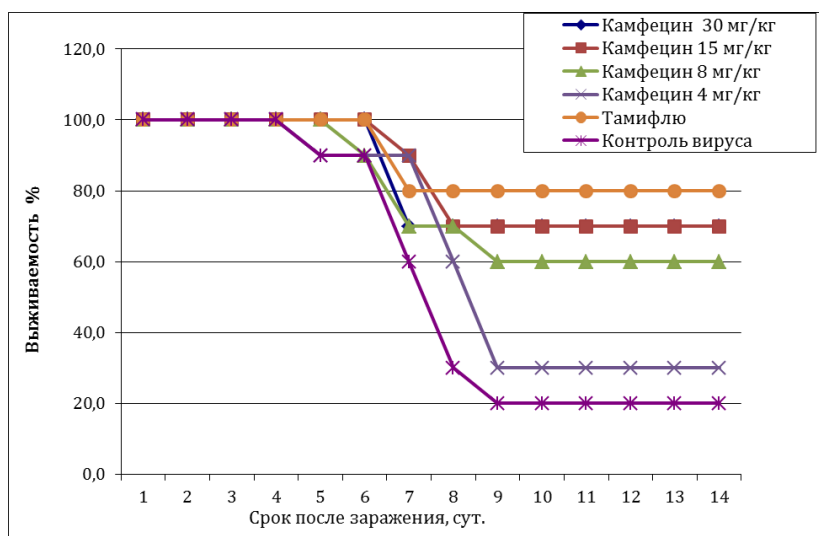
4. Проверка противовирусной активности на животных моделях

Следующим этапом изучения противовирусного действия соединения, оказавшегося эффективным в культуре клеток, является экспериментальная оценка при инфекции у животных. Для подтверждения противовирусной активности камфецина нами были проведены работы по изучению действия этого агента на моделях гриппозной инфекции у животных. Была изучена активность камфецина в



отношении вируса гриппа Н1N1. В опытах использовали камфецин в четырёх нетоксических концентрациях – 25, 50, 100 и 200 мг/кг. Показано, что камфецин проявлял дозозависимую противо-вирусную активность как при высокой (10LD₅₀), так и при низкой (1LD₅₀) инфицирующих дозах. Достоверное снижение специфической смертности

животных было отмечено при дозах соединения 100 и 200 мг/кг. Исследуемый препарат и препараты сравнения давались животным один раз в день. Максимальное значение индекса защиты камфецина в отношении вируса A/California/07/09 (H1N1)pdm09 составило 76,9%, что сопоставимо с показателями для тамифлю (84,6 – 85,7%) и позволяет говорить о высокой активности камфецина. Дальнейшие исследования фармакокинетических параметров камфецина на животных показали, что данный агент практически полностью выводится из организма в течение 8 часов. Данное исследование позволило нам сделать предположение, что для увеличения эффективности действия камфецина препарат надо вводить животным более одного раза в день для достижения стабильного терапевтического эффекта. Для подтверждения данной гипотезы нами были проведены эксперименты по изучению действия камфецина на животной модели при заражении вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при низких дозах указанного препарата, но при введении его несколько раз в сутки. В эксперименте животным давали камфецин в дозах 4, 8, 15 и 30 мг/кг/день перорально 4 раза в сутки с интервалом в 6 часов, тамифлю в дозе 20 мг/кг/день. Как видно из представленных данных, было показано, что противовирусная активность камфецина в дозе 15 и 30 мг/кг сравнима с активностью широко известного против-вирусного препарата тамифлю.



Для подтверждения активности камфецина на других штаммах вирусов гриппа, нами дополнительно были проведены исследования при заражении животных вирусом гриппа В. Достоверное снижение специфической смертности животных было отмечено при дозе камфецина 100 и 200 мг/кг и использовании тамифлю.

5. Селекция и изучение вирусных штаммов, резистентных к камфецину

Вирусы гриппа А и В находятся в состоянии генетического дрейфа. Во время транскрипции вирусной РНК постоянно происходят мелкие мутации, которые приводят к изменению структуры гемагглютинина и/или нейраминидазы. Эти мутации, возникающие чаще спонтанно, вызывают появление новых штаммов вируса, которые быстро распространяются среди людей и вызывают ежегодные эпидемии гриппа. В представленной нами работе были получены камфецин резистентные штаммы вируса гриппа, изучено биологическое тестирование камфецин резистентного штамма на животной модели, проведено секвенирование гемагглютинина и белка М2 и выявлены мутации, ответственные за появление резистентности. Камфецин-резистентные штаммы вируса гриппа были получены при помощи серийного пассирования вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в присутствии нарастающих концентраций камфецина (работа проведена совместно с сотрудниками НИИ Гриппа г. Санкт Петербурга под руководством к.б.н. Зарубаева

В.В.) Последовательное серийное пассирование вируса в присутствии камфецина приводило к нарастанию резистентности, достигающей к 8 пассажиру примерно 60–кратной разницы по сравнению с исходным вирусом. Для комплексной оценки биологических свойств вируса гриппа, выработавшего устойчивость к камфецину, было проведено тестирование его патогенности на модели гриппозной инфекции у белых мышей. Патогенность вируса оценивали по динамике весовых показателей и гибели животных, а также по инфекционной активности вируса в ткани легких и морфологической картине органа-мишени. Как было показано в ходе вирусологических исследований, инфицирование животных исходным, камфецин-чувствительным (Cf-S) и пассированным в присутствии камфецина, камфецин-резистентным (Cf-R) вирусом приводило к принципиально разным типам патологического процесса. Так, при всех изученных дозах вируса отмечалось снижение веса животных, заражённых вирусом Cf-S, в то время как масса тела животных, инфицированных вирусом Cf-R, не менялась в ходе опыта. Приобретение вирусом камфецин-резистентности, следовательно, приводит к снижению его патогенности для мышей. Данная информация является очень важной, поскольку можно предположить, что при широком использовании в клинической практике лекарственного средства на основе камфецина, при возникновении резистентности вирусов к камфецину, данные вирусы, вероятнее всего, станут менее патогенными.

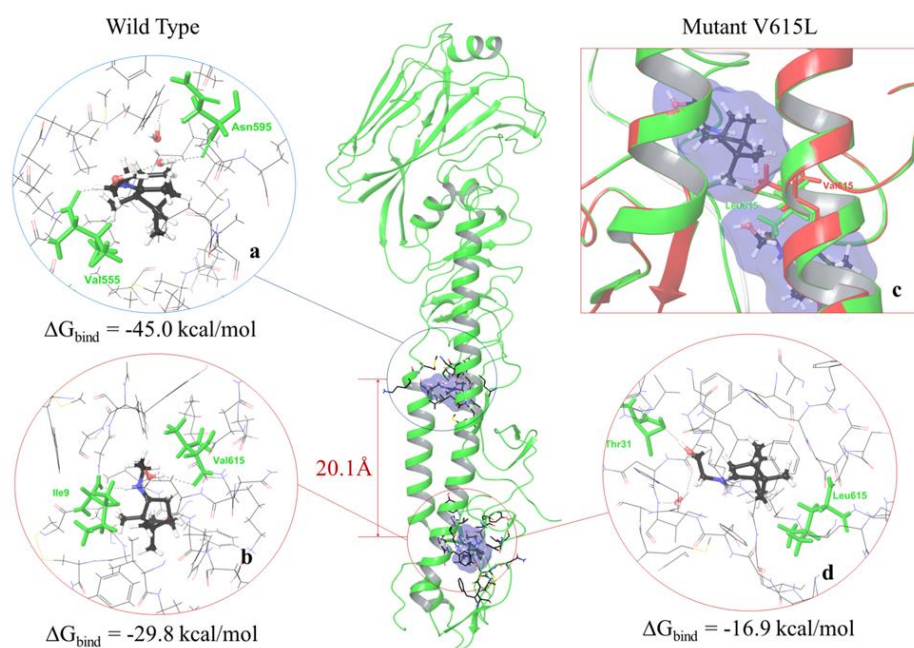
Для детальной характеристики свойств камфецин-резистентных штаммов были сравнены аминокислотные последовательности исходного гемагглютинаина вируса, вируса, пассированного в течение 6 пассажей без камфецина и пассированного в течение 6 пассажей в присутствии нарастающих концентраций камфецина. Было показано, что селекция камфецин-резистентных штаммов сопровождается аминокислотной заменой валина V615L в гемагглютинине на лейцин. Мутации в камфецин-резистентном штамме расположены вблизи пептида слияния субъединицы HA2. В том же районе молекулы находится сайт протеолиза для активизации гемагглютинаина при слиянии. На основании пространственной локализации этой замены можно сделать предположение, что она влияет на межсубъединичные взаимодействия или же конформационно препятствует узнаванию сайта протеолиза ферментами хозяина, что в свою очередь снижает фузогенную активность гемагглютинаина.

6. Молекулярное моделирование противовирусной активности камфецина и его аналогов

Проведенные нами исследования по изучению действия камфецина и его аналогов на ингибирование вируса гриппа в зависимости от времени добавления показывают, что соединения этого ряда проявляют активность на ранних стадиях вирусной репликации. Из этого следует, что наиболее вероятными мишенями действия камфецина являются поверхностные белки: протонный канал M2 и гемагглютинин (HA), обеспечивающие нормальную реализацию ранних стадий вирусного цикла - адсорбцию и слияние мембран. На основе данного предположения, был проведен *in silico* скрининг камфецина и ряда его аналогов в активные сайты канала M2 и HA, с целью оценки энергии связывания лиганда и протеина в лиганд-белковый комплекс. Теоретические расчеты были проведены в соавторстве с сотрудниками Уфимского института химии Уфимского федерального

исследовательского центра РАН к.х.н. **Борисевич С.С.** на программном комплексе Small-Molecule Drug Discovery Suite 2017-4, (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Было проведено моделирование взаимодействия камфецина и его аналогов (соединений **1**, **2** и **13**) с двумя активными сайтами связывания белка M2. Исходя из особенностей строения исследуемых соединений, протонный M2 канал можно рассматривать в качестве одной из потенциальных биологических мишеней. Можно предположить, что с одной стороны, данные вещества способны проникать в гидрофобную полость канала, тем самым препятствуя передаче протона, а с другой стороны, располагаясь с внешней стороны полипептидных цепей в ремандатиновом активной сайте (функциональные аминокислоты аспарагиновая кислота D44 и аргини R45), могут повлиять на работу «триптофановых ворот» W41.

Другим белком, ответственным за ранние стадии репликации вируса гриппа является гемагглютинин. Проведенные исследования по выявлению мутаций в камфецин-резистентном штамме вируса гриппа подтверждают наши предположения, что одной из наиболее вероятных мишеней может быть именно этот поверхностный белок. Моделирование взаимодействия камфецина с вирусным гемагглютинином при помощи метода квантовой механики позволило выявить два сайта связывания. Один из них располагается на границе субъединиц HA1 и HA2 в районе пептида слияния, второй – в нижней части молекулы, в районе сайта протеолиза. Различия в пространственной организации именно этой зоны меняют характер взаимодействия HA с камфецином, разворачивая замещённую аминокислоту у мутанта V615L и препятствуя тем самым образованию водородных связей, необходимых для формирования прочного комплекса. Энергия связывания в этом случае составляет -16,9 ккал/моль, тогда как для HA дикого типа она вдвое выше (-29,8 ккал/моль).



Иными словами, при возникновении резистентности, происходит изменение валина 615 на лейцин, что, в свою очередь снижает возможность связывания камфецина с указанным сайтом гемагглютиниона. Несмотря на то, что геометрические параметры белка HA незначительно изменились после мутации V615L, сайт связывания лиганда с белком

сдвигается. Другой особенностью, которую удалось нам установить с использованием теоретических расчётов, является изменение энергии самого белкового комплекса. Согласно результатам расчета, замена валина в положении 615 на лейцин приводит к понижению внутренней энергии субъединицы тримера гемагглютиниона (суммарные энергии белкового комплекса составляет -23913.9

ккал/моль для «дикого» штамма и -23885.5 ккал/моль для мутантного штамма). Возможно, это приводит к стабилизации всего протеина в целом и затрудняет "разворачивание" полипептидных цепочек НА. Не исключено, что данный факт может быть одной из причин того, что патогенность камфецин резистентного штамма вируса гриппа значительно ниже исходного. Иными словами, конформационные перестройки гемагглютинаина, необходимые для успешного входа вируса в клетку, могут требовать более высоких энергий.

7. Разработка аналитических методик количественного определения камфецина в биологических средах

В современной практике определения лекарственных препаратов в биологических объектах наиболее предпочтительно использование методов ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС и хромато-масс-спектрометрии ГХ/МС. Нами рассматривались несколько методов анализа камфецина: ВЭЖХ с УФ-детектированием, метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС) и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс детектированием (ВЭЖХ/МС). В отношении камфецина основным лимитирующим фактором применения ВЭЖХ для определения данного агента является практически отсутствие поглощения в диапазоне излучения 190-700 нм. Максимум поглощения наблюдается при длине волны 210 нм, что отрицательно сказывается на чувствительности метода. Предел обнаружения камфецина методом ГХ/МС в режиме в режиме SIM (регистрация индивидуальных ионов) составляет 40 нг/мл. Нами разработана и валидирована методика количественного определения камфецина в плазме крови методом ГХ/МС. Методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, стабильность, перенос. Разработанная нами методика количественного анализа камфецина методом ГХ/МС, позволяет проводить определение содержания вещества в крови крыс в диапазоне концентраций от 100 до 2000 нг/мл. Недостатками этой методики является низкая селективность количественного определения по выбранному соединению, а также мешающее влияние биологической матрицы, приводящее к подавлению ионизации молекул. Для изучения фармакокинетики камфецина нами был разработан метод ВЭЖХ-МС/МС с селективной детекцией молекулярного иона и дочерних ионов.

Перспективным способом для анализа биологически активных веществ является метод анализа микроколичеств цельной крови, взятой у животного и нанесенной на специальный бумажный носитель. Этот подход к сбору образцов получил название метода сухого пятна крови (dried blood spot, DBS). Из-за малой кровопотери животное остается живым в течение продолжительного времени, достаточного для проведения фармакологических исследований, что позволяет проводить испытания на меньшем количестве животных и получать более достоверные данные. Разработанная нами методика определения камфецина методом ВЭЖХ/МС с использованием метода сухих пятен была валидирована нами в соответствии с требованиями российских и международных регуляторных документов по параметрам: пригодность, селективность, линейность, предел обнаружения, точность, прецизионность, стабильность образцов и растворов,

перенос. Указанная методика дает линейность от 5 до 300 нг/мл и нижний предел определения субстанции 1.5 нг/мл.

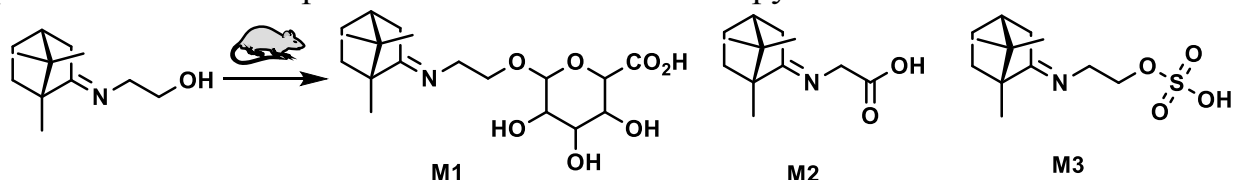
8. Проведение фармакокинетических исследований камфецина

С использованием разработанной нами методики определения действующего вещества методом ВЭЖХ/МС нами были проведены фармакокинетические исследования камфецина при внутрижелудочном введении в дозе 100 мг/кг и при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг. Образцы крови, собранные в обозначенные временные промежутки после введения вещества лабораторным животным, подвергались пробоподготовке по отработанной нами методике с использованием метода сухих пятен крови. Для проведения экспериментов были взяты две группы животных (n 6). В качестве носителя при приготовлении суспензии исследуемого вещества для внутрижелудочного введения животным использовали водный раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в концентрации 0,25%. Для изучения фармакокинетики при внутрижелудочном введении образцы крови брались в следующие промежутки времени от начала введения препарата: 5, 15, 30 мин, 1, 1.5, 2, 3, 5, 8, 24 часа. Для изучения фармакокинетики при внутривенном введении камфецин вводили животным в один прием в 0.2 мл физраствора в дозе 10 мг/кг. Образцы крови по 20 мкл брали в следующие промежутки времени 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150 и 180 мин от начала введения препарата. После перорального введения субстанции максимальная концентрация определяется через 2 ч и составляет около 600 нг/мл. После внутрижелудочного введения период полувыведения равен камфецина 8 ч. При этом среднее время удерживания камфецина в крови равно 10 ч. При внутривенном введении первоначальная средняя концентрация агента в крови была около 1500 нг/мл, слегка уменьшается в течение 30 минут до 1100 нг/мл. Период полувыведения камфецина в указанном эксперименте составляет 37 мин.

9. Поиск метаболитов камфецина

Крайне важным аспектом при разработке новых лекарственных средств, является выявление основных метаболитов изучаемого биологически активного соединения. Выявление общих закономерностей и различий в фармакокинетике фармакологически активных веществ у экспериментальных животных различной видовой принадлежности позволяет наиболее точно экстраполировать полученные данные на человека. Нами были проведены работы по поиску и установлению строения основных метаболитов камфецина. Для этого совместно с сотрудниками кафедры физиологии НГУ д.б.н., проф. **Лавриненко В.А.** и к.б.н. **Фатьяновой А.В.**, были проведены эксперименты на группе из 6 животных, которым давался камфецин внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг. Перед введением и после введения вещества у животных были собраны образцы мочи, время отбора составляло 3, 6, 8 и 24 часа после введения камфецина. Анализ образцов мочи крыс после введения камфецина был проведен нами с использованием метода ВЭЖХ/МС в режиме полного скана (+Q1) в диапазоне 100 – 600 Да. Анализ хроматограмм, записанных в режиме Q1, показал, что в образцах крови животных, получавших камфецин, кроме самого камфецина, содержатся два основных соединения, образующих ионы массой 372.6 и 210.4 (M+H+). Указанные соединения, предположительно являющиеся

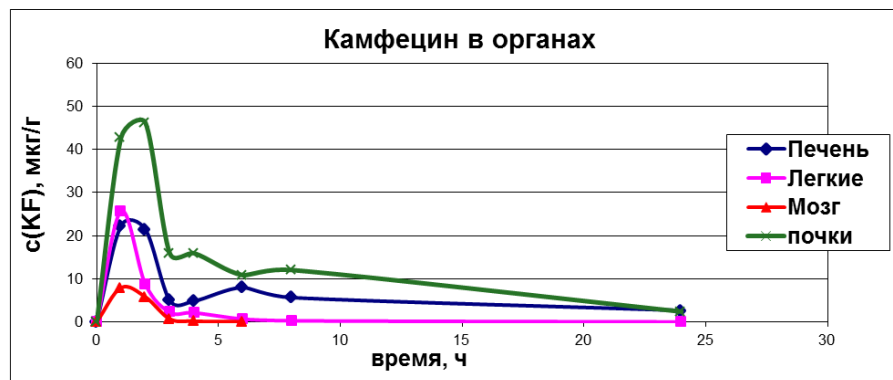
метаболитами (**M1** и **M2**, соответственно), отсутствовали в образцах крови контрольной группы. При фрагментации молекулярного иона **M1** ($M+N+ = 372.6$) образуется осколочный ион массой 196.4, соответствующий протонированному камфецину. Наблюдаемая потеря массы в 176 единиц характерна для глюкуронидов, образование которых является одним из главных направлений метаболизма веществ. В области отрицательных ионов метаболит **M1** образует молекулярный ион $[M-H]^- = 369.6$, что свидетельствует о наличии в молекуле кислотной группы. Молекулярная масса метаболита **M2** (209.4) на 14 единиц больше массы исходного камфецина (195.4), что может соответствовать часто наблюдаемому окислению первичной спиртовой группы до карбоксильной. При фрагментации соединения **M2** наблюдалось образование нескольких групп осколков, характерных для распада фрагмента камфоры. В то же время, в спектре распада присутствовал интенсивный ион с $m/z = 164$, соответствующий потере массы в 46 единиц и нехарактерный для исходного соединения. Такая потеря часто наблюдается при анализе аминокислот методом ESI-MS/MS и соответствует отщеплению молекул CO и H₂O. Дополнительный анализ хроматограммы образца мочи крысы, полученного после введения камфецина, в сравнении с «холостым» образцом с помощью программы MarkerView показал, что в моче крысы после введения вещества есть соединение **M3**, имеющее массу протонированного молекулярного иона $M+N+ = 275.9$, что на 80 массовых единиц больше камфецина ($+N+$). Увеличение массы исходного вещества на 80 единиц при метаболизме соответствует образованию его сульфопроизводного. Сульфатирование, как и глюкуронидация, также является одним из основных путей метаболизма органических соединений, имеющих гидроксильную функцию. В эксперименте с использованием ВЭЖХ-МС высокого разрешения была измерена точная масса всех обнаруженных нами метаболитов.



10. Изучение распределения камфецина и его метаболитов по органам

После выявления основных метаболитов нами были проведены эксперименты по изучению распределения камфецина и его метаболитов по органам животных. С этой целью, были проведены эксперименты на группе из 14 животных (крысы), которым давался камфецин внутривенно в дозе 150 мг/кг. Далее животные подвергались усыплению через 1, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 часа. У животных извлекали печень, мозг, легкие и почки. Известно, что в настоящее время для быстрого извлечения определяемых веществ и очистки экстрактов применяют способ дисперсионной твердофазной экстракции QuEChERS. В предварительных экспериментах по выбору оптимального метода было обнаружено, что обработка гомогенизированных тканей с использованием экстракционных наборов QuEChERS приводит к значительному снижению наблюдаемого содержания метаболитов в тканях, в частности, глюкуронида **M1** и сульфата **M3**. По этой причине мы использовали подход, заключающийся в обработке гомогенизированного образца тканей холодным метанолом с последующим упариванием растворителя и анализе

полученного остатка. Для получения численных значений содержания камфецина нами были приготовлены калибровочные образцы, являющиеся искусственными смесями гомогенизированного органа с известным количеством субстанции. Максимальное содержание камфецина во всех органах наблюдается через 1.5-2 часа после введения вещества животному, что соответствует максимальному содержанию вещества в крови.



При этом наибольшего значения оно достигает в почках. Содержание камфецина в легких в максимуме примерно равно таковому для печени и составляет около 25 мкг/г. Аналогичная динамика выведения камфецина наблюдается и

для мозга, за исключением того, что максимальное содержание вещества в этом органе составляет около 8 мкг/г. Максимальное содержание глюкуронида камфецина **М1** наблюдается в печени и почках крыс, причем в печени его максимальное содержание, по-видимому, в несколько раз выше. Уровень концентрации метаболита **М1** в легких и мозге крыс существенно ниже, но при этом фармакокинетика метаболита во всех исследованных органах имеет схожий между собой профиль. Площади пиков кислоты **М2** на хроматограммах образцов печени и почек в 100 раз больше, чем на хроматограммах, полученных после анализа легких и мозга. По-видимому, такая картина обусловлена существенно более высоким содержанием метаболита по причине его образования в этих органах и последующем выведении из организма. Максимум концентрации кислоты **М2** наблюдается через 1-2 часа после введения камфецина. Анализ содержания сульфопроизводного камфецина **М3** в органах крысы показал, что его максимальное содержание достигается не через 1.5-2 часа, как других метаболитов. При анализе образцов почек было обнаружено, что максимум вещества виден через 3 часа после введения агента, а в печени – через 5 часов. При этом в легких данный метаболит практически не накапливается, а в мозге животных его концентрация сохраняется с незначительными колебаниями в течение суток.

Таким образом, нами было показано, что основными органами, метаболизирующими камфецин, являются печень и почки. Клетками-мишенями при гриппе являются клетки респираторного эпителия – трахеи, бронхов и лёгких. Поэтому наибольшее значение имеет фармакодинамика камфецина именно в лёгких. Высокая концентрация камфецина в лёгких, практически идентичная таковой в печени, свидетельствует об эффективном проникновении препарата в орган-мишень и может объяснять его высокую эффективность *in vivo*. В ряде случаев при гриппе отмечаются поражения нервной системы, приводящие к развитию гриппозных менингитов и энцефалитов. В этой связи быстрое проникновение камфецина в мозг является несомненным преимуществом препарата, поскольку преодоление гематоэнцефалического барьера применения представляет серьёзную проблему для многих лекарственных средств, что ограничивает их разработку, внедрение и

требует дополнительных усилий по созданию подходящих лекарственных форм, а часто и модификации самой молекулы. Наши данные свидетельствуют, что камфецин проникает в мозг достаточно быстро. Более того, его концентрация в мозге лишь втрое ниже, чем в лёгких, а фармакодинамика в обоих этих органах практически идентична. Следовательно, можно ожидать, что камфецин будет эффективен не только в случае гриппозной пневмонии, но и в более тяжёлой клинической ситуации, когда патологический процесс распространяется на мозг.

11. Изучение влияния камфецина на физиологические особенности животных

В настоящее время животные незаменимы при определении активности и безопасности множества веществ, в первую очередь при доклинических исследованиях. Нами, совместно с сотрудниками кафедры физиологии НГУ д.б.н., проф. **Лавриненко В.А.** и к.б.х. **Фатьяновой А.В.** были проведены эксперименты по изучению влияния камфецина на поведение мышей разных генетических линий в тесте «открытое поле»; исследование некоторых гомеостатических параметров крови животных под воздействием на них камфецина при однократном и хроническом введении и изучение влияния камфецина на морфофункциональные параметры системы осмотического концентрирования почки крыс. Полученные данные указывают на отсутствие угнетающего действия камфецина на интегративную деятельность мозга, выражающуюся в регуляции поведенческих реакций, проявляемых в тесте «открытое поле». В ходе исследования не выявлено патологического влияния камфецина на систему крови. Проведенное исследование влияния камфецина на морфофункциональные характеристики почки крыс выявило его сопоставимое действие с известным противовирусным препаратом – ремантадином.

Выводы.

1. Разработана комплексная программа химических модификаций бициклических монотерпеноидов каркасного строения (+)-камфоры и (-)-борнеола, нацеленная на эффективный синтез библиотек оптически активных соединений. Впервые систематически описаны библиотеки производных камфоры и борнеола, содержащих разнообразные фармакофорные группы.
2. Впервые установлено, что иминопроизводные на основе (+)-камфоры являются эффективными ингибиторами вирусов гриппа А. Проведено подробное изучение связи структуры соединений с проявляемой биологической активностью, выявлены ключевые структурные блоки, отвечающие за активность против вирусов гриппа.
3. Впервые показана и подтверждена высокая активность против вируса Марбург сложноэфирных производных (-)-борнеола, содержащих насыщенный N-гетероциклический фрагмент.
4. Показана высокая активность против вирусов гриппа А H1N1 у полициклических ацетамидов, имеющих остов природного происхождения, синтезированных на основе сесквитерпеноидов - гумулена, кариофиллена и изокариофиллена в условиях реакции Риттера.
5. Выявлено соединение-лидер (камфецин), продукт взаимодействия камфоры и аминоэтанола, обладающее широким спектром активности против вирусов гриппа А H1N1, H3N2, H5N2 и вируса гриппа В. Эффективность подтверждена с

использованием животных моделей; показано, что действие камфещина в дозе 15 и 30 мг/кг сравнимо с активностью широко известного противовирусного препарата Тамифлю.

6. Получены данные о высоких противовирусных свойствах четвертичной аммонийной соли на основе борнеола; выявлено, что введение морфолинового фрагмента в сложноэфирные производные борнеола значительно увеличивает целевую активность.

7. Установлено, что синтезированные производные камфоры и борнеола проявляют вирусингибирующую активность на ранних стадиях вирусной репликации; с использованием методов молекулярного моделирования проведен докинг камфещина и его аналогов к возможным биологическим мишеням.

8. Разработаны и валидированы методики количественного определения камфещина в биологических средах методами ГХ/МС и ВЭЖХ/МС. С использованием указанных методик проведено изучение фармакокинетического профиля при пероральном и внутривенном введении. Показана возможность использования «метода сухих пятен» для разработки аналитических методик определения фармакологически важных соединений на основе терпеноидов в цельной крови, что значительно облегчает стадии пробоподготовки.

9. Показано, что основными метаболитами камфещина являются соответствующий глюкоронид, кислота и сульфат камфещина, изучено распределение камфещина и его метаболитов в органах животных. Высокая концентрация камфещина в лёгких, практически идентичная таковой в печени, свидетельствует об эффективном проникновении препарата в орган-мишень и может объяснять его высокую эффективность *in vivo*.

Список публикаций по теме диссертации

1. Salakhutdinov N.F., Volcho K.P., Yarovaya O.I. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds // Pure Appl. Chem. -2017. -V. 89. -N 8, -P. 1105-1118.
2. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Baev, D.S. Shernyukov A.V., Shtro A.A., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Aliphatic and alicyclic camphor imines as effective inhibitors of influenza virus H1N1. // Europ. J. Med. Chem. -2017. -V. 127. –P. 661-670.
3. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shtro A.A., Borisova M.S., Morozova E.A., Tolstikova T.G., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and biological activity of heterocyclic borneol derivatives // Chem. Het. Comp. -2017. -V. 53. -N 3. –P. 371-377.
4. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Semenova M.D., Shtro A.A., Orshanskaya I.R., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and *in vitro* study of novel borneol derivatives as potent inhibitors of the influenza A virus. // Med. Chem. Commun., -2017. –V. 8. –P. 960-963.
5. Соколова, А.С., Яровая, О.И., Нефедов, А.А., Салахутдинов, Н.Ф. Разработка и валидация методики определения нового эффективного ингибитора вируса гриппа H1N1 в плазме крови // Хим-фарм. журнал. – 2017. – том 51, №12, -С. 30-33.

6. Artyushin O.I., Sharova E.V., Vinogradova N.M., Genkina G.K., Moiseeva A.A., Klemenkova Z.S., Orshanskaya I.R., Shtro A.A., Kadyrova R.A., Zarubaev V.V., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F., Brel V.K. Synthesis of Camphene Derivatives using Click Chemistry Methodology and Study of their Antiviral Activity // Bioorg. Med. Chem. Lett. -2017. -V. 27. -N 10. -P. 2181-2184.
7. Kovaleva K.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Zarubaev V.V., Shtro A.A., Orshanskaya Ya.R., Salakhutdinov N.F. Synthesis of new heterocyclic dehydroabietylamine derivatives and their biological activity // Chem. Heterocyclic Comp. -2017. -V. 53. -N 3. -P. 364-370.
8. Kovaleva K.S., Yarovaya O.I., Fadeev D.S., Salakhutdinov N.F. One-pot synthesis of 1,5,3-oxathiazepanes via the three-component condensation of primary amines, formaldehyde and 2-mercaptoethanol // Tetrahedron Lett. -2017. -V. 58. -P. 1868-1870.
9. Kononova A.A., Sokolova A.S., Cheresiz S.V., Yarovaya O.I., Nikitina R.A., Chepurnov A.A., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. N-Heterocyclic borneol derivatives as the inhibitors of Marburg virus glycoprotein-mediated VSIV pseudotype entry // Med. Chem. Commun. -2017. -V. 8. -P. 2233-2237.
10. Sharova E.V., Genkina G.K., Vinogradova N.M., Artyushin O.I., Yarovaya O.I., Brel V.K. Phosphorylation of natural products Cytisine, anabasine, and camphor using click chemistry methodology // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. -2016. -V. 191. -N 11-12. -P. 1556-1557.
11. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Ankov S.V., Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Development and validation of ultrafast LC-MS/MS method for quantification of anti-influenza agent camphene in whole rat blood using dried blood spots and its application to pharmacokinetic studies. // Journal of Chromatography B, -2016. -V. 1036. -P. 136-141.
12. Sokolova A., Pavlova A., Komarova N., Ardashov O., Shernyukov A., Gatilov Yu., Yarovaya O., Tolstikova T., Salakhutdinov N. Synthesis and analgesic activity of new α -truxillic acid derivatives with monoterpene fragments // Med. Chem. Res. -2016. -V. 25. -N 8. -P. 1608-1615.
13. Бабина А.В., Лавриненко В.А., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф. Действие нового противовирусного агента камфецина на поведение мышей // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. -2016. Т. 162. № 9. С. 329-332.
14. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Tretiak T.S., Fedorova V.A., Shtro A.A., Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Broad range of inhibiting action of novel camphor-based compound with anti-hemagglutinin activity against influenza viruses *in vitro* and *in vivo* // Antiviral Research, -2015. -V. 120. -P. 126-133.
15. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Gatilov Yu.V., Razumova Yu.V., Zarubaev V.V., Tretiak T.S., Pokrovsky A.G., Kiselev O.I., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // Europ. J. Med. Chem. -2015. -V. 105. -P. 263-273.
16. Соколова А.С., Морозова Е.А., Васильев В.Г., Яровая О.И., Толстикова Т.Г., Салахутдинов Н.Ф. Курареподобные производные камфоры и их биологическая активность // Биоорганическая химия. -2015. -Т. 41. № 2. -С. 203-211.
17. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Korchagina D.V., Zarubaev V.V., Tretiak T.S., Anfimov P.M., Kiselev O.I., Salakhutdinov N.F. Camphor-based symmetric diimines

as inhibitors of influenza virus reproduction // Bioorg. Med. Chem. -2014. -V. 22. – N. 7. -P 2141-2148.

18. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Pokrovsky M.A., Pokrovsky A.G., Lavrinenko V.A., Zarubaev V.V., Tretiak T.S., Anfimov P.M., Kiselev O.I., Beklemishev A.B., Salakhutdinov N.F. New quaternary ammonium camphor derivatives and their antiviral activity, genotoxic effects and cytotoxicity // Bioorg. Med. Chem. -2013. -V. 21. –N. 21 –P. 6690-6698.
19. Yarovaya O.I., Korchagina D.V., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A. Reaction of isocembrol and alcohols on clay // Chem. Nat. Compd. -2012. -V. 48, -N 1, -P. 56-59.
20. Yarovaya O.I., Korchagina D.V., Rybalova T.V., Gatilov Yu.V., Polovinka M.P., Barkhash V.A. Reactions of caryophyllene, isocaryophyllene, and their epoxy derivatives with acetonitrile under Ritter reaction conditions // Russian Journal of Organic Chemistry -2004. –V. 40. –P. 1593–1598

Патенты и заявки на патенты

1. Пат. 2651754 РФ, Применение алифатических иминопроводных камфоры в качестве эффективных ингибиторов репродукции вируса гриппа H1N1 (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) / Яровая О.И., Соколова А.С., Штро А.А., Зарубаев В.В., Хазанов В.А., Салахутдинов Н.Ф. – опубл.23.04.2018, Бюл. № 12.
2. Пат. 2649406 РФ, N-замещенные борнилпропионаты, используемые в качестве ингибиторов вируса Марбург / Яровая О.И., Соколова А.С., Кононова А.А., Чересиз С.В., Никитина Р.А., Чепурнов А.А., Зайковская А.В., Пьянков О.В., Покровский А.Г., Максюттов Р.А., Салахутдинов Н.Ф. – опубл. 03.04.2018, Бюл. № 10.
3. Пат. 2616255 РФ, Применение (1S,3aR,4R,7aS)-N-(2,2,4,7a-тетраметилоктагидро-1,4-этанонден-3a-ил)-ацетамида в качестве ингибитора репродукции вируса гриппа / Яровая О.И., Штро А.А., Оршанская Я.Р., Зарубаев В.В., Хазанов В.А., Салахутдинов Н.Ф. – опубл. 13.04.2017, Бюл. № 11.
4. Пат. 2607451 РФ, Иминопроводные камфоры, содержащие ароматический или гетероароматический фрагмент - ингибиторы репродукции вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09) / Яровая О.И., Соколова А.С., Шернюков А.В., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Киселев О.И., Хазанов В.А., Салахутдинов Н.Ф. – опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.
5. Заявка на патент №2017137217 от 23.10.2017, Синтез и применение 6,13,13-триметил-6,8,9,12-тетрагидро-6,9-метаноазепино[2,1-b]хинозалин-10(7H)-она в качестве ингибитора вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2 / Яровая О.И., Чернышов В.В., Штро А.А., Зарубаев В.В., Салахутдинов Н.Ф.
6. Пат. 2554934 РФ, Иминопроводные камфоры – эффективные ингибиторы репродукции вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09) / Соколова А.С., Яровая О.И., Шернюков А.В., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Салахутдинов Н.Ф. – опубл. 10.07.2015, Бюл. № 19.
7. Пат. 2520967 РФ, Симметричные диимины на основе камфоры - ингибиторы репродукции вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09) / Соколова А.С., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф., Киселев О.И., Зарубаев В.В., Третьяк Т.С.; - опубл. 27.06.2014. Бюл. № 18.

8. Пат. 2530554 РФ, Применение 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в качестве ингибитора репродукции вируса гриппа / Яровая О.И., Соколова А.С., Третьяк Т.С., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Салахутдинов Н.Ф. – опубл. 10.10.2014, Бюл. № 28.

Автор выражает благодарность всем, с кем было связано появление настоящей диссертации. Прежде всего, автор глубоко благодарен научному консультанту профессору **Нариману Фаридовичу Салахутдинову** – мудрому Учителю, под руководством и при поддержке которого не только было выполнено данное исследование, но и сформировано научное мировоззрение автора. Искреннюю благодарность автор выражает к.х.н. **Соколовой А.С.**, аспирантам **Ковалевой К.С.** и **Чернышову В.В.** за активное участие в экспериментальной работе и плодотворные научные дискуссии, к.х.н. **Рогачеву А.Д.** за совместное проведение аналитических работ. Автор благодарна к.х.н. **Шернюкову А.В.** и к.х.н. **Корчагиной Д.В.** за помощь в установлении строения ряда полученных соединений с помощью ЯМР-спектроскопии, д.х.н. **Гатилову Ю.В.** и **Рыбаловой Т.В.** за проведение рентгеноструктурного анализа, **Комаровой Н.И.** за помощь в проведении анализов методом ВЭЖХ. Автор благодарна коллегам за проведение противовирусных исследований синтезированных соединений: коллективу исследователей под руководством к.б.н. **Зарубаева В.В.** из Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и к.б.н. **Штро А.А.** из Института гриппа г. Санкт-Петербурга; проф. **Покровскому А.Г.**, к.б.н. **Черезису С.А.** и асп. **Кононовой А.А.** из Новосибирского государственного университета; коллективу вирусологов из ГНЦ «Вектор» - к.б.н. **Пьянкову О.В.** и к.б.н. **Зайковской А.А.**. Автор благодарит сотрудников Уфимского института химии Уфимского федерального исследовательского центра РАН к.х.н. **Борисевич С.С.** и д.х.н. **Хурсан С.Л.** за совместно проведенные компьютерные расчёты; сотрудников кафедры физиологии НГУ д.б.н., проф. **Лавриненко В.А.** и к.б.н. **Фатьянову А.В.** за совместно проведённые исследования действия противовирусных агентов с использованием животных моделей. Автор выражает благодарность за сотрудничество коллективу исследователей из ИНЭОС, г. Москва под руководством д.х.н., проф. **Бреля В.К.** за совместную работу по химической модификации камфецина. Искреннюю благодарность автор выражает сотрудникам ООО «Инновационные Фармацевтические Разработки» (Ифар) г. Томска и лично руководителю **Хазанову В.А.** Автор выражает благодарность сотрудникам НИОХ СО РАН к.х.н. **Нефедову А.А.**, **Бизяеву В.Л.**, сотрудникам лаборатории фармакологических исследований д.б.н., проф. **Толстиковой Т.Г.** и к.х.н. **Хвостову М.В.**, к.х.н. **Баеву Д.С.** и к.х.н. **Анькову С.В.**