

На правах рукописи



Егорова Анна Петровна

**Синтез и исследование производных
изоксазол-5-илпропоксифенил-
1,2,4-оксадиазола, обладающих противовирусной
активностью**

Специальность 02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории биомедицинской химии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН
Макаров Вадим Альбертович

Официальные оппоненты: **Яровая Ольга Ивановна**, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН

Ворожцов Николай Игоревич, кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «01» октября 2020 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.144.07 созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1, конференц-зал (ауд. 156).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» и на сайте университета <https://kosygin-rgu.ru>

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.144.07
канд. хим. наук, доцент



Кузнецов Д.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Одним из важнейших направлений органической химии является разработка безопасных и эффективных лекарств, например, противовирусных препаратов, активных в отношении самых часто встречающихся в мире инфекционных агентов – энтеро- и риновирусов рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*, впервые открытых в 30-е годы XX века. Из-за существования большого количества вирусов (всего ~ 260 серотипов) создание вакцины осложнено, поэтому именно разработка *малых молекул* широкого спектра действия, способных влиять на этапы жизненного цикла вируса, представляется наиболее правильным путем решения проблемы.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные разработке противоэнтеровирусных соединений, на сегодняшний день существует только три хорошо изученных кандидата в лекарственное средство, – плеконарил, вапендавир и покапавир – но ни один из них не был одобрен регуляторными органами для лечения вирусных инфекций по различным причинам.

Показано, что по сравнению с другими разработками в данной области плеконарил и производные на его основе, действующие на поверхностный гидрофобный карман энтеровирусов, обладают наиболее высокой и широкой противоэнтеровирусной активностью, и, следовательно, поиск противовирусных средств нового поколения с улучшенными характеристиками перспективен в данном классе соединений. Идея представляемой работы заключается в том, чтобы целенаправленно синтезировать ряд важных производных и аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, которые не были получены предыдущими исследователями в силу отсутствия на момент разработки плеконарила (80-е годы XX века) многих современных реактивов, методов синтеза и исследования, для расширенного изучения взаимосвязи структура-противовирусная активность.

Цель работы заключается в направленном дизайне и синтезе неописанных ранее производных класса изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола в качестве противовирусных агентов широкого спектра действия.

Для достижения цели были сформулированы и решены **задачи исследования**:

1. Дизайн и синтез оригинальных производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола: а) с разными заместителями в третьем положении изоксазольного цикла; б) с разными по структурным и электронным свойствам заместителями в третьем положении фенильного кольца и введение в его структуру атома азота; в) с модификациями алкильного линкера, связывающего изоксазольный и фенильный циклы; г) с разными алкил- и ариламидами на месте оксадиазольного фрагмента;

2. Оценка противовирусной активности полученных целевых соединений в отношении ряда энтеро- и риновирусов;

3. Выявление закономерностей структура-активность синтезированных производных и аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола.

Научная новизна. Предложена единая препаративная схема получения производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с различными заместителями в третьем положении изоксазольного цикла и в третьем положении фенильного кольца. Впервые осуществлен синтез неизвестных ранее аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с модификациями алкильной цепочки и заменённым на алкил- и ариламида оксадиазольным циклом. Впервые зафиксировано разрушение оксадиазольного цикла при обработке 3-карбэтокси-изоксазол-5-илпропилтиофенил-1,2,4-оксадиазола водным раствором диметиламина. Показано, что 3-*N,N*-диметилкарбамоилизоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолы обладают высокой активностью в отношении спектра энтеро- и риновирусов. Обнаружено, что вещества с небольшими функциональными группами в третьем положении центрального, фенильного, кольца проявляют более высокую ингибирующую способность, чем соединения с объемными заместителями. Выявлено, что структура заместителя в третьем положении изоксазольного цикла является критичной для преодоления вирусной резистентности. Впервые изучена роль алкильного связующего мостика и 1,2,4-оксадиазольного цикла в проявлении противоэнтеровирусной активности.

Практическая значимость работы. В рамках работы синтезировано 61 оригинальное, неописанное ранее в литературе соединение. В результате их биологического скрининга обнаружено два активных вещества, действующих в отношении всех изучаемых в данной работе плеконарил-чувствительных и -резистентных вирусов со значениями ингибирующей концентрации IC_{50} от 0.003 до 7.63 мкМ. Результаты, полученные при изучении фармакокинетики наиболее активного соединения, позволили заключить, что вещество обладает хорошей биодоступностью и должно быть изучено более детально.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные в ходе исследования данные о связи структуры производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с их противовирусной активностью будут способствовать дальнейшему развитию целенаправленного дизайна противовирусных агентов нового поколения.

Методология и методы исследования. В представленной работе использованы как классические, так и современные методы и подходы медицинской и органической химии. Теоретическую основу исследования составили данные работ зарубежных ученых в области синтеза и изучения биологической активности антипикорнавирусных капсид-связующих средств. Для решения поставленных задач были использованы современные методы

органического синтеза, выделения и очистки продуктов реакции. Для подтверждения строения, состава и чистоты полученных соединений применялся комплекс таких физико-химических методов, как ^1H ЯМР-спектроскопия, жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (LC-MS), масс-спектрометрия высокого разрешения, элементный анализ, тонкослойная хроматография. Исследования противовирусной активности синтезированных целевых соединений проводились в отделении вирусологии и противовирусной терапии университета г. Йены (г. Йена, Германия) и в лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (г. Санкт-Петербург, Россия).

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в поиске, анализе и обобщении литературных источников; синтезе и установлении строения целевых соединений; изучении закономерностей взаимосвязи структура-активность на основе полученных биологических данных, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях различного уровня.

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликовано 4 статьи в ведущих зарубежных и российских журналах и 3 тезиса докладов на научных конференциях.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на X Конкурсе проектов молодых ученых в рамках 19-й международной выставки «Химия-2016» (работа была удостоена Первой премии) (Москва, 2016), X Международной конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2017» (Санкт-Петербург, 2017), XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018), IX Научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы» в рамках «Ломоносов-2018» (Москва, 2018).

Положения, выносимые на защиту:

1. Дизайн и синтез новых производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола;
2. Результаты *in vitro* исследования противовирусной активности полученных веществ;
3. Результаты изучения взаимосвязи структуры синтезированных соединений с проявляемой ими противовирусной активностью.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора (Глава 1), обсуждения результатов (Глава 2), экспериментальной части (Глава 3), выводов и списка литературы из 129 наименований. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста и включает 24 рисунка, 57 схем и 12 таблиц.

Отдельные этапы диссертационного исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-54-30007).

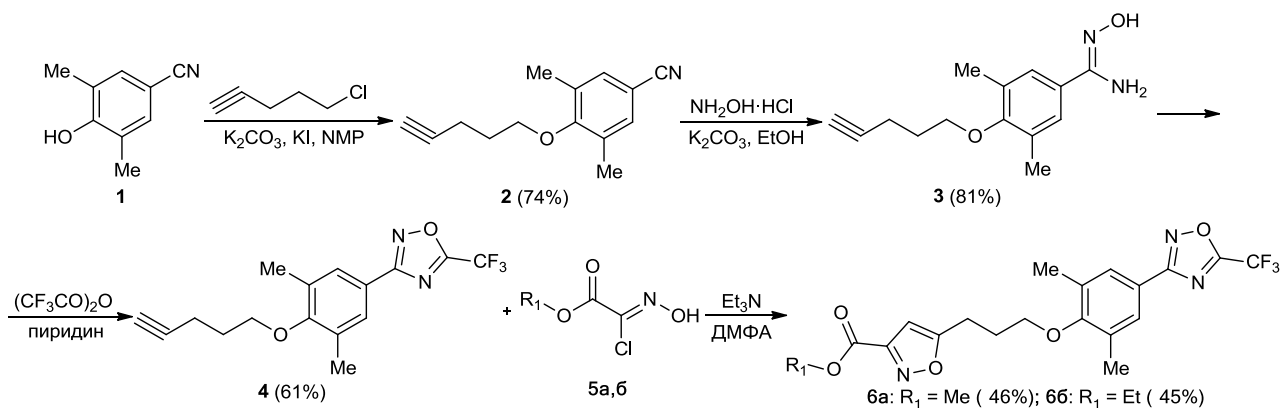
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Дизайн, получение и противовирусная активность производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с различными заместителями в изоксазольном цикле

При изучении противовирусной активности производных и предшественников изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола разработчики оставляли метильную группу в третьем положении изоксазольного цикла в качестве консервативного фрагмента. Недавно были сделаны предположения, что изменение строения и природы этого заместителя может существенно улучшить биологический профиль подобных соединений. Нами было решено получить производные изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, в которых метильная группа заменена на некоторые другие заместители. Описанные в литературе схемы синтеза таких производных малоприспособны для получения их расширенного ряда, поэтому нами был предложен альтернативный план синтеза.

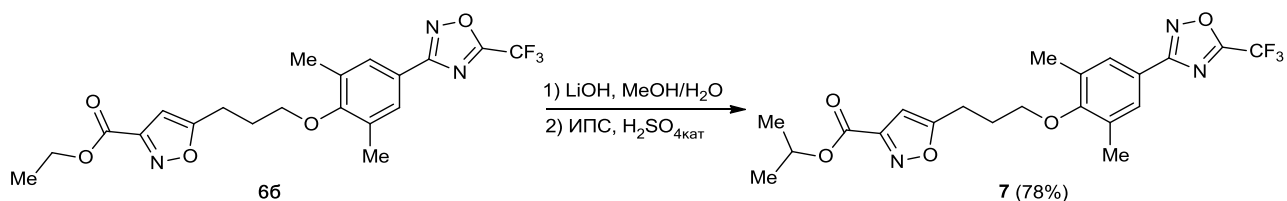
В соответствии со Схемой 1, исходный бензонитрил **1** был введен во взаимодействие с 5-хлор-1-пентином с получением желаемого продукта – пентинилоксибензонитрила **2**. Показано, что в результате его кипячения около 24 часов с избытком гидроксиламина гидрохлорида и карбоната калия в спирте был выделен соответствующий амид гидроксамовой кислоты **3**, замыкание которого в необходимый оксадиазольный цикл было осуществлено обработкой трифторуксусным ангидридом в среде пиридина. 5-Трифторметил-1,2,4-оксадиазол **4** являлся удобным промежуточным веществом для получения соединений необходимого строения. С расчетом выхода к целевым производным **6а,б** было проведено его 1,3-диполярное циклоприсоединение с полученными по известным методикам метиловым или этиловым эфирами 2-хлор-2-(гидроксиимино)уксусной кислоты **5а,б** в присутствии триэтиламина. Структуры продуктов **6а,б** характеризовались наблюдаемым на их ¹H ЯМР-спектрах синглетом, который был присущ единственному протону изоксазольного цикла.

Схема 1



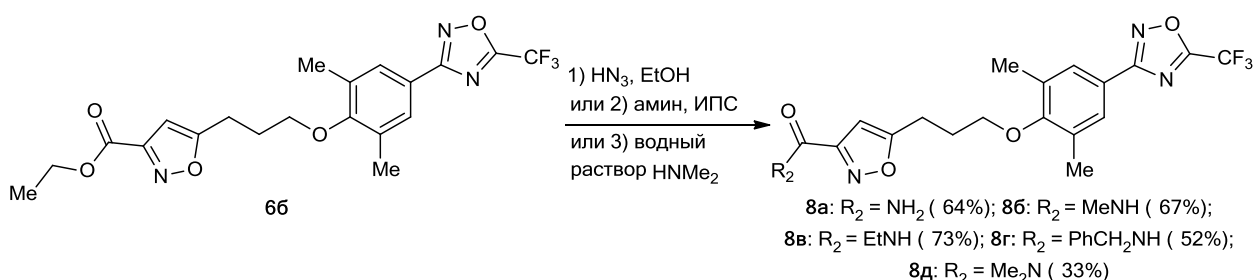
Для получения целевого изопропильного производного **7** соединение **66** было подвергнуто щелочному гидролизу, а промежуточная кислота затем была обработана изопропанолом в условиях кислотнo-катализируемой этерификации по Фишеру (Схема 2). Продукт был выделен с 78%-ным выходом.

Схема 2



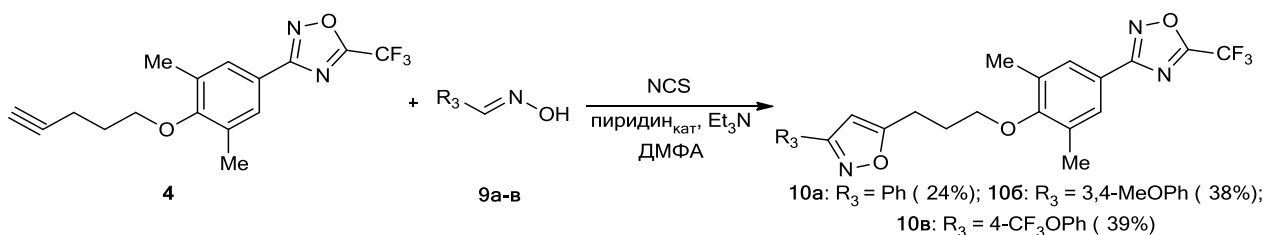
Известно, что амидные группы наиболее стабильны в организме, поэтому были синтезированы различные амиды изоксазола. В процессе синтеза оказалось, что проведенный тремя различными методами аминолиз этилового эфира соединения **66** во всех случаях протекал с высокой скоростью, а конечные целевые соединения **8а-д** легко выпадали при охлаждении реакционной смеси в виде хорошо оформленных осадков (Схема 3). Успешное образование продуктов подтверждалось данными ¹H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Схема 3



Установлено, что 1,3-диполярное циклоприсоединение промежуточного соединения **4** со свежеприготовленными замещенными и незамещенным оксимами бензальдегида **9а-в** происходило с формированием целевых фенил-изоксазолов **10а-в** с низкими выходами (Схема 4). Возможно, это было связано с пространственными затруднениями оксимов **9а-в**, содержащих объемные фенильные фрагменты.

Схема 4



При изучении взаимосвязи противовирусной активности и строения полученных производных обнаружено, что производные, содержащие алкоксикарбонильные (**6а,б, 7**) и

карбамоильные группы (**8а-в**, **д**) в третьем положении изоксазольного цикла, обладали активностью, сходной с контрольным соединением – плеконарилом – в отношении Коксаки-вирусов, а в случае отдельных серотипов превосходили его. Выяснилось, что почти все соединения обладали более низкой активностью в отношении риновирусов по сравнению с контролем. Для соединений **8г** и **10а-в**, содержащих объемные заместители, отмечалось значительное падение активности. Для дальнейшего исследования наиболее приемлемыми заместителями при изоксазольном цикле были выбраны метокси- и этоксикарбонильные, а также диметилкарбамоильная группы – соединения **6а**, **6б** и **8д** в Таблице 1 соответственно.

Таблица 1. Цитотоксичность и ингибирующая способность наиболее активных полученных производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола **6а,б** и **8д** и контрольного соединения – плеконарила

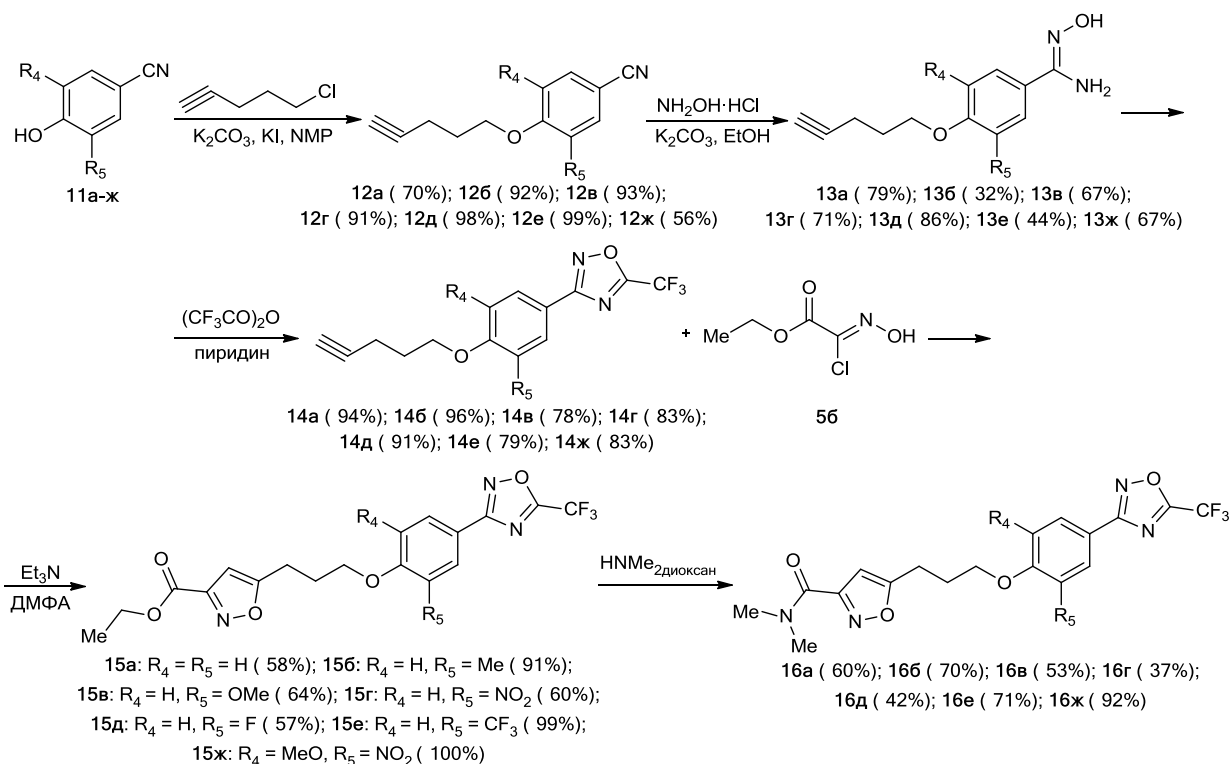
№	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ (Коксаки-вирус В3), мкМ					IC ₅₀ (риновирус), мкМ		
		97927				Нэнси	А2	В5	В14
		д/т	И1207К	И1207М	И1207Т				
Плек.	26.25	0.01	н/а	2.29	4.39	н/а	0.04	н/а	0.07
6а	35.37	0.06	20.44	1.53	12.83	17.92	0.36	н/а	0.37
6б	17.21	0.07	11.12	0.94	20.40	н/а	н/т	н/т	н/т
8д	13.20	0.02	6.33	0.03	1.01	н/т	0.12	н/т	0.12

плек. – плеконарил, д/т – дикий тип, н/а – вещество неактивно, н/т – вещество не тестировалось

2. Дизайн, синтез и ингибирующая способность производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола с различными заместителями фенильного кольца

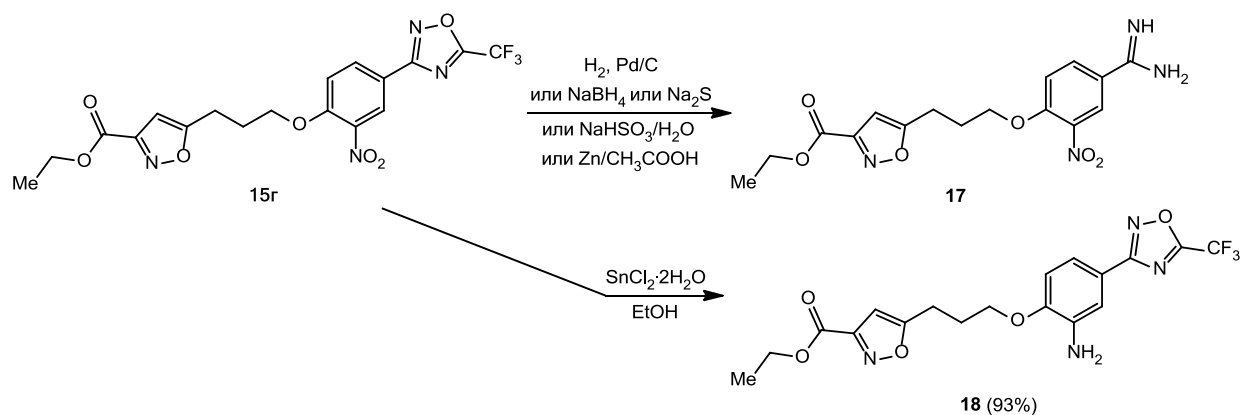
Большинство производных плеконарила имеет в своей структуре две метильные группы, однако современные исследования строения вирусного каньона показали, что большее количество серотипов энтеровирусов имеет меньший объем в средней части каньона и требует, соответственно, наличие только одного заместителя в фенильном кольце. Для проверки этого нами были синтезированы монопроизводные изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, имеющие различные по электронным и стерическим эффектам заместители центрального цикла. Для их получения была успешно применена приведенная выше схема получения производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола (Схемы 1 и 3). Реакции протекали при тех же условиях и показаны на Схеме 5. Строение и чистота целевых производных **15а-ж** и **16а-ж** были подтверждены комплексом физико-химических методов.

Схема 5



Ожидалось, что восстановление нитропроизводного **15г** одним из часто применяющихся методов произойдет с получением соответствующего аминопроизводного (Схема 6). Однако, обнаружено, что проведение всех этих реакций сопровождалось разрушением оксадиазольного цикла до амидина **17**. Лишь мягкое восстановление **15г** дигидратом хлорида олова в этиловом спирте при комнатной температуре приводило к образованию с близким к количественному выходу аминопроизводного **18**.

Схема 6

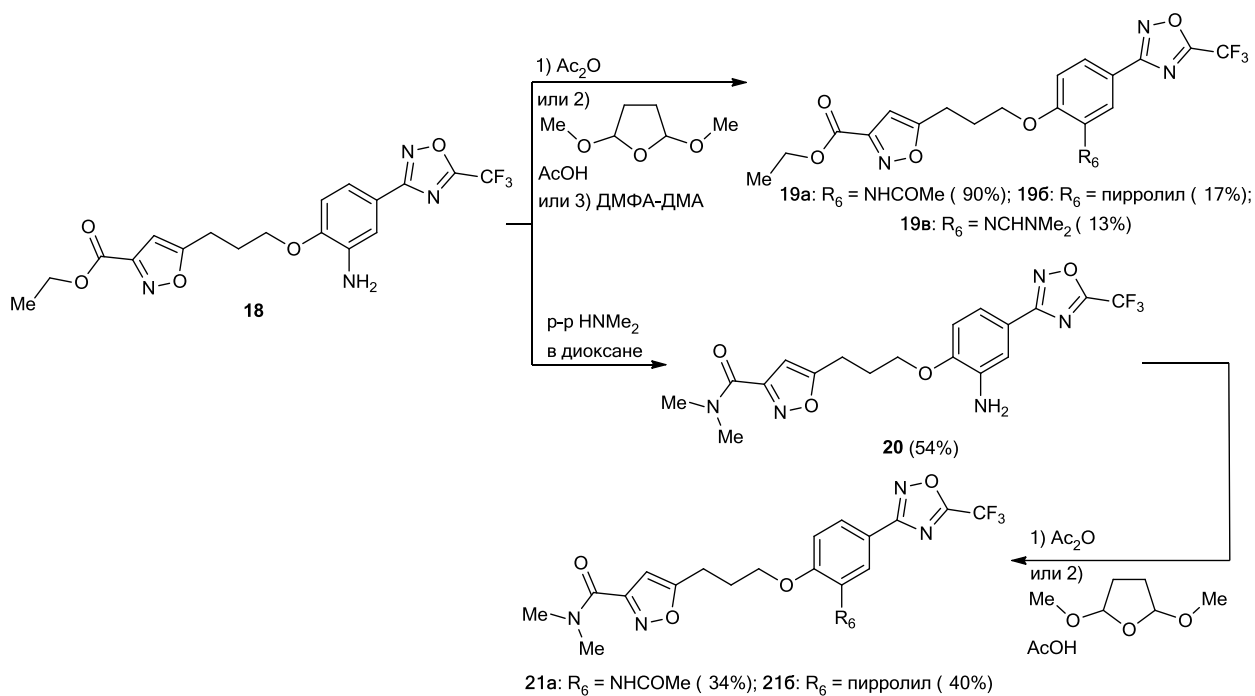


Нами показано, что в одном случае обработка амино-фенил-оксадиазола **18** уксусным ангидридом приводила к синтезу моноацильного производного **19а** с высоким выходом, а взаимодействие **18** с диметокситетрагидрофураном и диэтилацеталем диметилформамида (ДМФА-ДМА) характеризовалось синтезом целевых соединений **19б** и **19в** с невысокими

выходами в 17% и 13% соответственно и сопровождалось образованием неидентифицируемых маслянистых примесей (Схема 7).

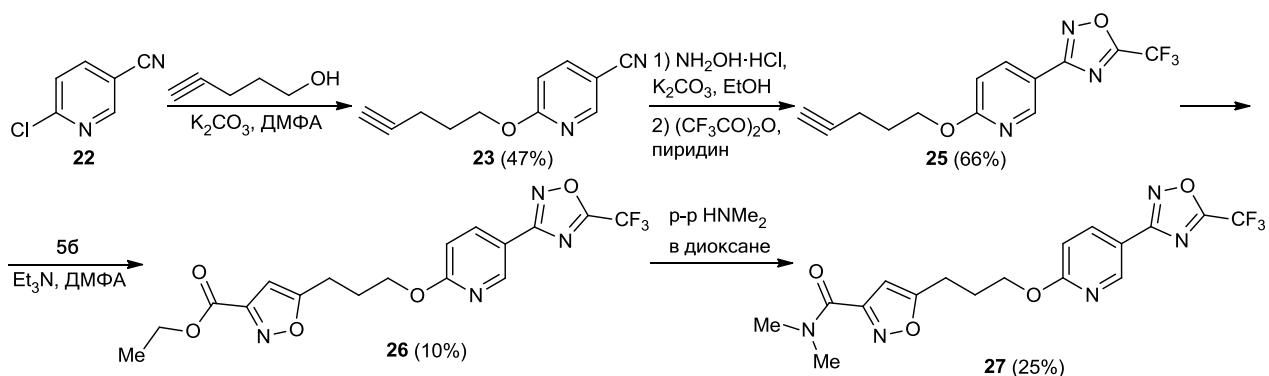
В другом случае, оксадиазол **18** был обработан раствором диметиламина в диоксане с выделением *N,N*-диметилкарбамоильного производного **20**, которое затем было введено в взаимодействия с уксусным ангидридом или диметокситетрагидрофураном с успешным получением целевых производных **21а,б**.

Схема 7



Представлялось интересным изучить, как включение атома азота непосредственно в фенильное кольцо будет отражаться на ингибирующей способности соединений, поскольку выявлена повышенная активность производного **16г**, содержащего нитрогруппу в фенильном кольце (см. Таблица 2 ниже), и известен факт сходства свойств нитробензола и пиридина. 6-(Пент-4-ин-1-илокси)никотинонитрил **23** был успешно получен при конденсации 6-хлороникотинонитрила **22** с 4-пентин-1-олом, а дальнейшие превращения были осуществлены по традиционным методикам (Схемы 1, 3 и 4) и показаны на Схеме 8.

Схема 8



Состав, структура и чистота оригинальных целевых пиридиновых аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола **26** и **27** были однозначно подтверждены данными элементного анализа, масс-спектрометрии и ¹H ЯМР-спектроскопии.

Впервые установлено, что производные с *N,N*-диметилкарбамоильным заместителем в третьем положении изоксазольного цикла **16a-e** обладают более высокой активностью в отношении рассматриваемых вирусов, чем производные **15a-e** с этоксикарбонильной группой в том же положении. Критическое значение структуры заместителя при изоксазольном цикле наблюдалось и в случае пиридиновых аналогов **26** и **27**: так, **27** проявлял умеренную активность в отношении всех исследованных вирусов, в то время как **26** ингибировал лишь два вируса. Обнаружено, что соединения с небольшими функциональными группами в третьем положении фенильного кольца в целом лучше ингибируют ряд энтеро- и риновирусов, чем вещества с объемными заместителями в том же положении. Выявлено, что производные с метильной и нитрогруппами **16б** и **16г** соответственно отлично действуют на плеконарил-чувствительные и -резистентные вирусы (Таблица 2). Для дальнейших исследований была выбрана потенциально *in vivo* нетоксичная метильная группа.

Таблица 2. Цитотоксичность и ингибирующая способность наиболее активных полученных производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола **16б** и **16г**

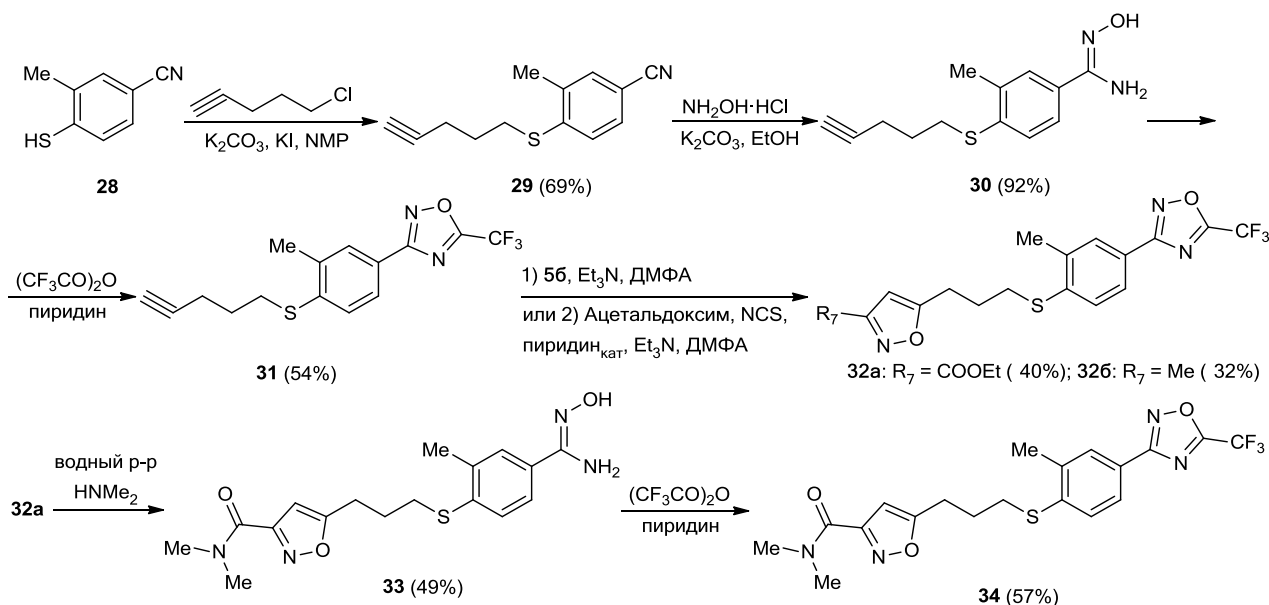
№	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ (Коксаки-вирус В3), мкМ				IC ₅₀ (риновирус), мкМ			
		97927			Нэнси	А2	В5	В14	
		д/т	И1207К	И1207М					И1207Т
16б	13.38	0.02	4.79	0.01	0.01	2.76	0.86	5.25	0.09
16г	22.48	0.003	6.46	0.001	0.03	1.66	0.67	7.63	0.28

3. Влияние модификации алкильного линкера изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола на противозентеровирусную активность

Разработанный нами препаративный метод получения производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола (Схемы 1, 3, 5, 8) был распространен на аналоги с S-линкером и показан на Схеме 9. Обнаружено, что 1,3-циклоприсоединение **31** с этиловым эфиром 2-хлор-2-(гидроксиимино)уксусной кислоты **5б** или ацетальдоксимом успешно приводило к формированию изоксазольного цикла и выделению целевых соединений **32a,б**. Предполагалось, что, как и в случае соединения **15б** (Схема 5), обработка **32a** водным раствором диметиламина приведет к замене этоксигруппы на диметиламинную с получением соответствующего вещества. Однако реакция сопровождалась разрушением оксадиазольного цикла до соответствующего амида гидроксамовой кислоты **33**, что, вероятно, связано с меньшей электроотрицательностью и большим размером атома серы по сравнению с атомом

кислорода. Для получения целевого *N,N*-диметилкарбамоильного производного **34** потребовалось провести дополнительную реакцию циклизации по традиционной методике (Схемы 1, 5, 8).

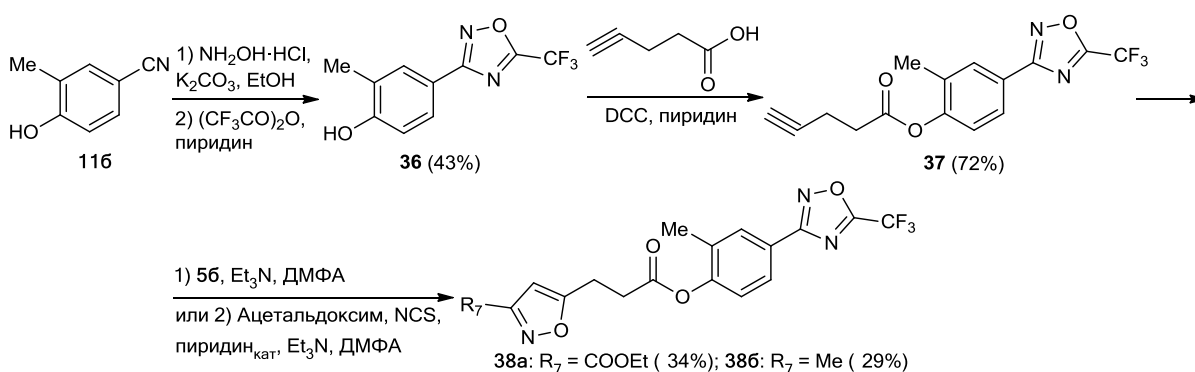
Схема 9



Аналоги изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, в которых атом кислорода заменен на сложноэфирное или амидное включение, были получены по отличному от предыдущей схемы пути для сведения к минимуму нежелательного процесса гидролиза. Разработка подобных соединений начиналась с формирования оксадиазольного цикла с помощью традиционных методик – получения амида гидроксамовой кислоты из цианида и его последующая циклизация с трифторуксусным ангидридом.

Выделенный с 43%-ным выходом таким образом оксадиазолилфенол **36** был этерифицирован по Стерлиху с 4-пентиновой кислотой с получением **37** (Схема 10). С выходом к целевым фениловым эфирам **38a,б** было успешно проведено 1,3-циклоприсоединение **37** при использовании ранее упомянутых условий и реагентов (Схема 9).

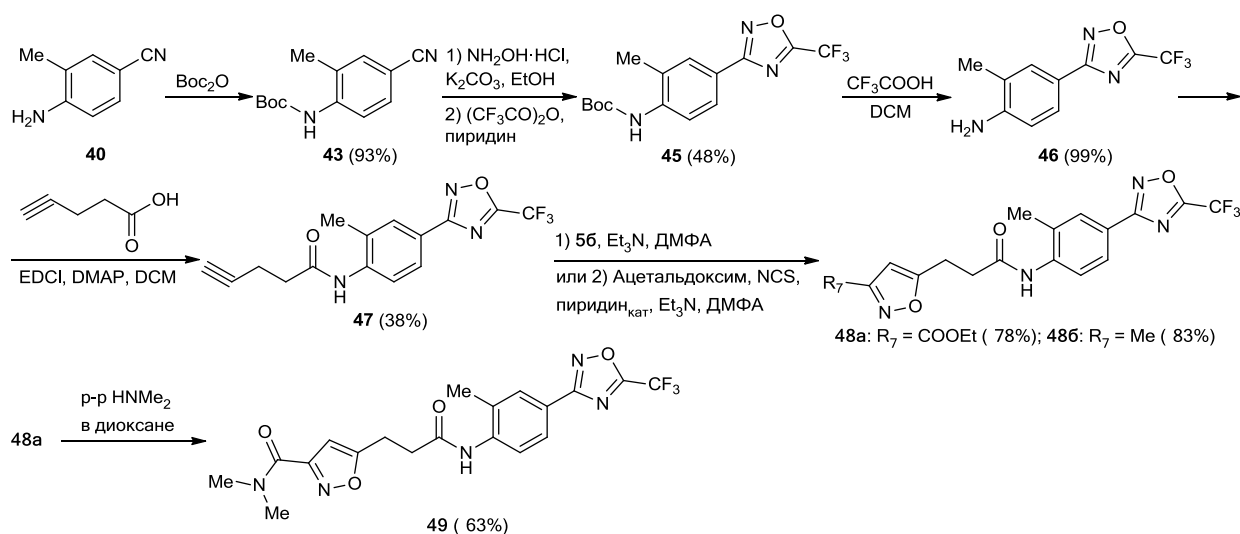
Схема 10



Установлено, что дальнейшая обработка (на Схеме 10 не показана) **38a** диоксановым раствором диметиламина приводила к разрыву сложноэфирной связи, о чем свидетельствовала наблюдаемая масса соединения **36** (244) в снятом масс-спектре выделенного осадка белого цвета.

С целью получения *N*-защищенного бензонитрила **43** в результате подбора условий реакции установлено, что обработка 4-амино-3-метилбензонитрила **40** Вос-ангидридом без применения растворителя приводила к образованию необходимого продукта с высоким выходом (Схема 11). Далее, как и в Схеме 10, происходило формирование оксадиазольного цикла. При снятии Вос-защиты **45** с помощью трифторуксусной кислоты отмечалось быстрое течение реакции с количественным выходом анилина **46**, ¹H ЯМР-спектр которого характеризовался наличием сигнала при δ 5.27 в виде уширенного синглета двух протонов NH₂-группы. Обнаружено, что реакция анилина **46** с 4-пентиновой кислотой в присутствии EDCI и DMAP действительно протекала с образованием **47** в виде осадка белого цвета. Последующие реакции выполнены по упомянутым ранее методикам (Схемы 9 и 10).

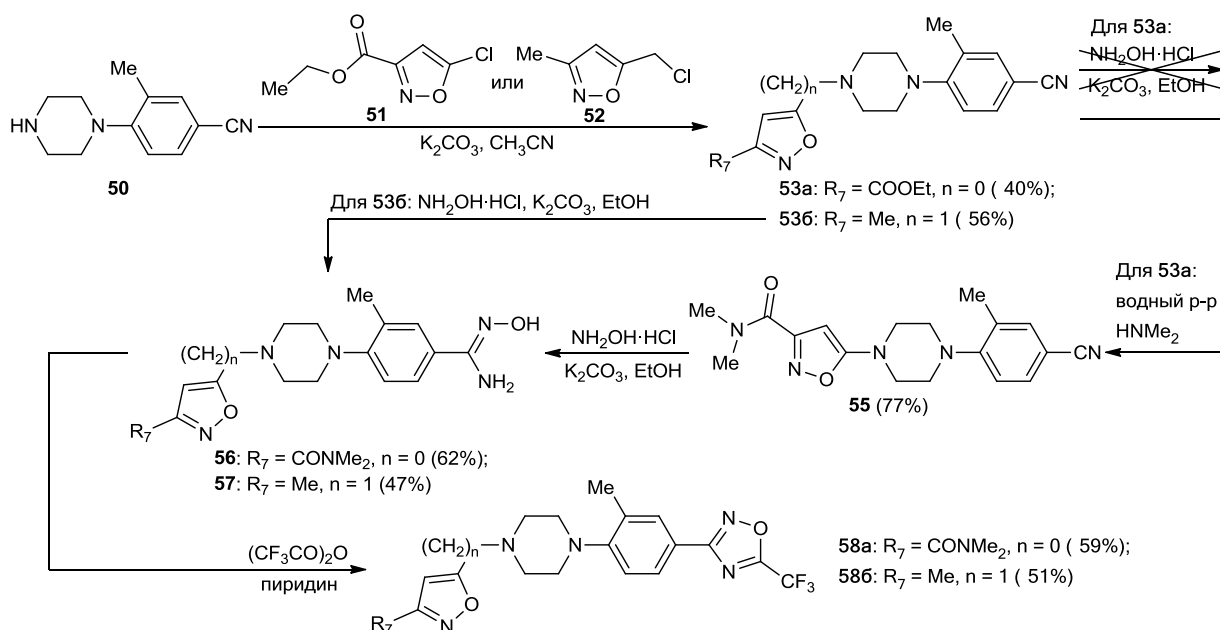
Схема 11



Пиперазиновые аналоги изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола **58a,б, 65** и **67** были получены в соответствие со Схемами 12 и 13. Исходные пиперазинилбензонитрил **50**, изоксазолы **51** и **52** были получены нами по описанным в литературе процедурам. Установлено, что результатом их взаимодействия между собой стало успешное выделение промежуточных соединений **53a,б**. Обнаружено, что если обработка **53b** избытком гидросиламина приводила к соответствующему амиду гидроксамовой кислоты **57**, то в случае **53a** сопровождалась преимущественным гидролизом по двум концевым фрагментам молекулы. Выделить требуемый амид **56** удалось для *N,N*-диметилкарбамоильного интермедиата **55**. С целью получения необходимых аналогов далее была проведена

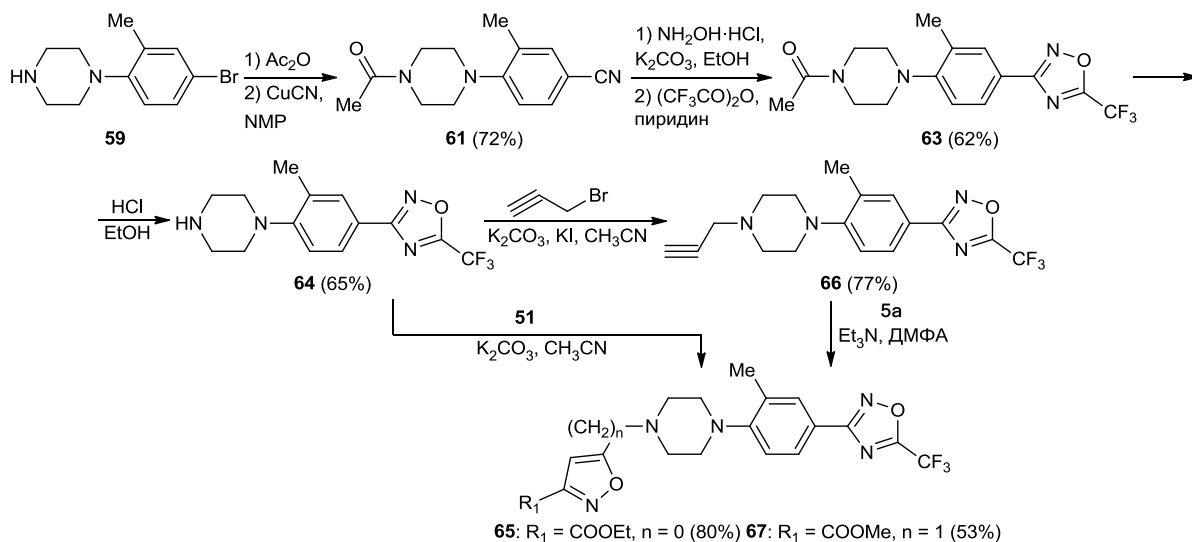
циклизация **56** и **57** в известных условиях (Схемы 1, 5, 8-11) с применением трифторуксусного ангидрида.

Схема 12



Согласно Схеме 13, 1-(4-бромо-2-метилфенил)пиперазин **59**, полученный в результате подбора условий, был последовательно подвергнут *N*-ацетильной защите и замене атома брома на цианогруппу. Формирование оксадиазольного цикла осуществлялось, как и ранее (Схемы 1, 5, 8 9-12), в два этапа и в данном случае приводило к пиперазину **63** с 62%-ным выходом. Показано, что требуемое снятие ацетильной защиты протекало в кислой среде и подтверждалось, в том числе, 1H -спектром соединения **64**, на котором наблюдалось появление синглета протона пиперазина при δ 1.87 (1H, NH). С целью получения пиперазинового аналога без одноуглеродного мостика **65** пиперазин **64** был обработан изоксазолом **51** в известных условиях (Схема 12).

Схема 13



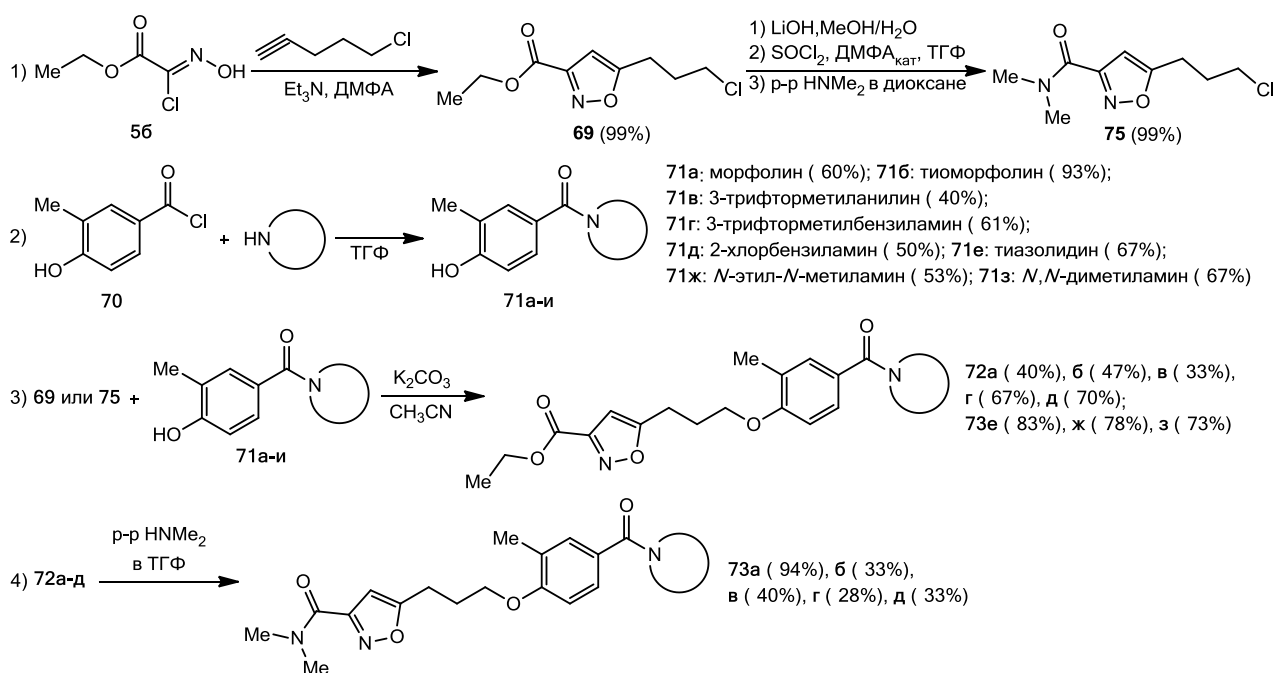
Успешное же получение пиперазинового аналога с одноуглеродным мостиком **67** было проведено при *N*-алкилировании **64** пропаргил бромидом и последующем 1,3-диполярном циклоприсоединении промежуточного **66** с избытком метилового эфира **5a** (Схема 13). Масс-спектр соединения соответствовал молярной массе **67** – m/z ($I_{\text{относ.}}(\%)$): 451.3991 [M]⁺ (72), а на ¹H ЯМР-спектре был обнаружен сигнал протона изоксазольного цикла при δ 6.87.

При изучении взаимосвязи противовирусной активности и строения полученных производных обнаружено, что все исследуемые модификации в целом приводили к уменьшению активности аналогов по сравнению с контрольным соединением, плеконарилом, что, вероятно, связано с созданием пространственных затруднений в предполагаемом сайте действия соединений – гидрофобном кармане энтеровирусов.

4. Зависимость противовирусной активности от замены оксадиазольного фрагмента скелета изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола на алкил и ариламида

Для разработки алкил- и ариламидных аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола был применен конвергентный способ синтеза (Схема 14) в соответствии с которым были отдельно выделены с количественным выходом изоксазолы **69** и **75** и аминилкарбонилфенолы **71a-з** с выходами 50-93%. Показано, что взаимодействие **69** и **71a-д** по механизму нуклеофильного замещения протекало с получением целевых аналогов **72a-д**, структуры которых были подтверждены данными элементного анализа, масс-спектрометрии и ¹H ЯМР-спектроскопии. Обнаружено, что их аминолиз раствором диметиламина в диоксане проходил достаточно медленно – в течение 3-4 дней – при нагревании 100 °С в железном сосуде. Продукты **73a-д** были очищены на хроматографической колонке.

Схема 14



Для синтеза еще нескольких примеров аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола был применен уже изоксазол **75** с *N,N*-диметилкарбамоильной группой, поскольку показано, что соединения с такой группой более активны в отношении вирусов. Реакции между **75** и **71e-з** протекали в тех же условиях, что и в случае **69** и **71a-д** и сопровождалась получением целевых **73e-з** (пункт 3 на Схеме 14).

Выявлено, что аналог изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, содержащий тиоморфолиновый фрагмент на месте оксадиазольного цикла **73б** ($CC_{50} = 718.5$ мкМ, $IC_{50} = 1.7$ мкМ), превосходил по активности в отношении Коксаки-вируса В3 Нэнси не только контрольное соединение – плеконарил ($CC_{50} = 2396.7$ мкМ, $IC_{50} = 18.4$ мкМ), но и **16б**, и проявлял сходную активность с **16г** (Таблица 2), что показывает его перспективность для дальнейшего скрининга на более широком диапазоне энтеро- и риновирусов.

5. Фармакокинетические исследования 3-(3-метил-4-(3-(3-*N,N*-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазола **16б**

Известно, что индукция изофермента цитохрома P450 3A4 является ключевой проблемой в клинических исследованиях плеконарила. Нами было впервые обнаружено, что в проведенном анализе индукция гепатоцитов соединением **16б** в несколько раз ниже, чем плеконарилом. Опытами на мышах установлено, что соединение **16б** обладает хорошей биодоступностью при внутрижелудочном введении в дозе 100 мг/кг.

Таким образом, настоящее диссертационное исследование по синтезу производных и аналогов изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола и изучению взаимосвязи между их структурой и противовирусной активностью можно наглядно представить рисунком 1.

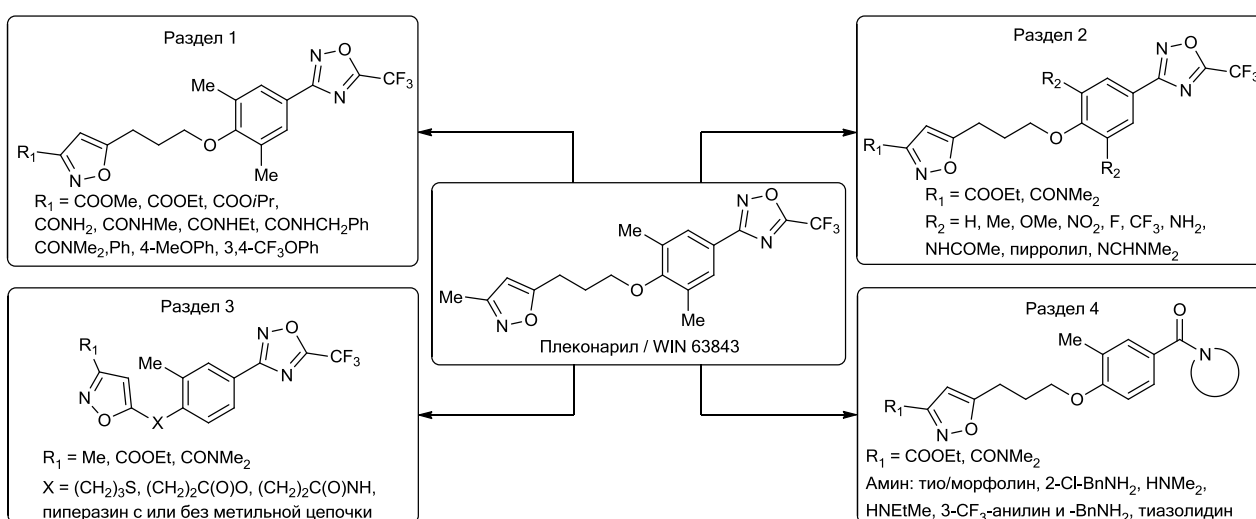


Рис. 1. Этапы проведения диссертационного исследования

ВЫВОДЫ

1. Проведен структурный дизайн и предложены схемы препаративного получения оригинальных соединений на основе скаффолда изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола. Получена библиотека из более чем 60 ранее неизвестных органических соединений, которые содержат различные виды заместителей в четырех структурных фрагментах используемого скелета – изоксазольном цикле, алкильном линкере, фенильном кольце и оксадиазольном цикле, – и потенциально обладают ингибирующей способностью в отношении изучаемых энтеро- и риновирусов.

2. Впервые методом прямого аминлиза этоксикарбонильной группы изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолов получены производные, содержащие в изоксазольном кольце фармакофорные карбамоильный, метилкарбамоильный и диметилкарбамоильный заместители, и показана их перспективность в качестве противовирусных агентов.

3. Разработаны методики направленного синтеза и получены неописанные ранее аналоги изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолов, содержащие линкерный атом серы. Впервые описано раскрытие оксадиазольного цикла под действием нуклеофила (водного раствора диметиламина) при нагревании.

4. Изучена взаимосвязь структуры синтезированных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолов с их противовирусной активностью и показано, что недоступные ранее изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолы с небольшими функциональными группами, такими как метил- и нитро-, в третьем положении фенильного кольца проявляют более высокую ингибирующую способность, чем соединения с объемными заместителями. Обнаружено, что производные, имеющие *N,N*-диметилкарбамоильный заместитель в третьем положении изоксазольного кольца, обладают высокой активностью в отношении широкого спектра энтеро- и риновирусов и преодолевают вирусную резистентность.

5. Обнаружен ряд соединений-лидеров в классе производных изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола, имеющих диметилкарбамоильный заместитель в изоксазольном цикле и метильную группу в фенильном кольце или тиоморфолинкарбонильный фрагмент на месте оксадиазольного цикла, которые обладают высокой ингибирующей способностью с широким спектром действия; они переданы для проведения доклинических исследований.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах и изданиях, включенных в перечень ВАК:

1. Egorova A., Kazakova E., Jahn B., Ekins S., Makarov V., Schmidtke M. Novel pleconaril derivatives: influence of substituents in the isoxazole and phenyl rings on the antiviral activity against enteroviruses // Eur. J. Med. Chem. – 2020. – Vol. 188, 112007. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.112007.
2. Volobueva A., Egorova A., Galochkina A., Ekins S., Zarubaev V., Makarov V. The evolution of pleconaril: modified O-alkyl linker analogs have biological activity towards Coxsackievirus B3 Nancy // Molecules. – 2020. – Vol. 25, 1345. DOI: 10.3390/molecules25061345.
3. Егорова А.П., Макаров В.А. История разработки WIN-соединений: на пути к эффективному антипикорнавирусному препарату // Изв. АН Сер. хим. – 2020. – № 4. – С. 635-646.
4. Egorova A., Ekins S., Schmidtke M., Makarov V. Back to the future: advances in development of broad-spectrum capsid-binding inhibitors of enteroviruses // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – Vol. 178. – P. 606-622. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.008.

Другие статьи и материалы конференций:

5. Егорова А.П., Казакова Е.С. Синтез соединений с противоянтеровирусной активностью на основе скаффолда изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола // Материалы IX научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы – 2018». – Москва, 2018. – С. 578.
6. Егорова А.П., Казакова Е.С., Шмидтке М., Макаров В.А. Синтез изоксазола-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазолов как перспективных противовирусных агентов широкого спектра действия // XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: сборник тезисов. – Москва, 2018. – С. 110.
7. Егорова А.П., Казакова Е.С. Разработка противовирусного препарата на основе изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола // X Международная конференция молодых учёных по химии «Менделеев-2017»: тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 250.
8. Егорова А.П., Казакова Е.С. Разработка нового противовирусного препарата на основе изоксазол-5-илпропоксифенил-1,2,4-оксадиазола // X Конкурс проектов молодых ученых в рамках 19-й выставки «Химия-2016»: тезисы докладов. – Москва, 2016. – С. 104-105.