

На правах рукописи



СЕНИНА АННА СЕРГЕЕВНА

**СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ
АЗОТИСТЫХ АЦИКЛИЧЕСКИХ И ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
НА ОСНОВЕ N-АРИЛАРЕНКАРБОГИДРАЗОНОИЛХЛОРИДОВ**

14.04.02-фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

**Санкт-Петербург
2020**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Москвин Андрей Вадимович доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич доктор фармацевтических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий кафедрой фармацевтического анализа

Шутов Роман Вадимович кандидат фармацевтических наук, АО «Вертекс», руководитель группы биохимии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» мая 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.088.01, созданного на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.088.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Всемирной организацией здравоохранения опубликован список устойчивых к действию лекарственных препаратов «приоритетных патогенов» – двенадцать видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. Данный список может служить определенным вектором для научных исследований в области создания новых противомикробных соединений, эффективных в отношении широкого спектра микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний. Важной проблемой для разработки лекарственных средств является резистентность многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к широко используемым антибактериальным и противогрибковым препаратам, что ставит под угрозу эффективную профилактику и лечение растущего числа инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями и патогенными грибами. Поэтому актуальной задачей является разработка новых противомикробных средств, отличающихся меньшей токсичностью и высокой активностью в отношении наиболее резистентных микроорганизмов в России *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

Перспективными группами веществ для поиска новых антибактериальных и противогрибковых средств являются азотистые ациклические (производные амидразонов) и гетероциклические соединения (замещённые дигидропиразолы), которые объединены возможностью синтеза из гидразоноилхлоридов. Известно, что различные представители данных классов веществ проявляют противовоспалительную, гипотензивную, спазмолитическую, а также антимикробную активность.

Степень разработанности темы исследования. Известно несколько подходов к синтезу производных амидразонов и дигидропиразолов, они описаны в обзорах К.Н. Зеленина, А.И. Елисеевой, Р. Frohberg, D.G. Neilson, A.S. Shawali, Д.Д. Кораблиной, F.A. Neugebauer и др. Однако известные методы их получения не многочисленны, и имеют ряд недостатков (низкий выход, трудность выделения целевых веществ и сложность их очистки). Исследование биологической активности соединений рядов амидразонов и дигидропиразолов представляет интерес для разработки новых эффективных и безопасных лекарственных средств несмотря на отрывочный характер таких данных об указанных группах соединений (R.P. Hertzberg, S.M. Paul, Т.П. Сычева, D.C. Billington, Д.Д. Кораблина и др.).

В связи с этим, актуальным является получение новых производных гидрогалогенидов N'-ариларенкарбоксимидогидразидов (далее – гидрогалогениды амидразонов) и 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов, исходя из доступных N-ариларенкарбогидразоноилхлоридов (далее – гидразоноилхлориды), обладающих противомикробной активностью.

Цель исследования. Осуществить синтез новых гидрогалогенидов амидразонов и замещённых 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов, доказать их строение, провести компьютерный прогноз и экспериментально исследовать биологическую активность, разработать для наиболее активного соединения методики анализа.

Задачи исследования:

1. Усовершенствовать условия проведения синтеза гидразоноилхлоридов и использовать их в качестве исходных соединений для получения гидрогалогенидов амидразонов и замещённых 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов.

2. Получить гидрогалогениды амидразонов и изучить их взаимодействие с ацилгалогенидами и кетонами с образованием замещённых 1 λ^4 ,2,3,5-тиатриазолов и 1,2,4-триазолов.

3. Доказать строение и индивидуальность полученных соединений с помощью ИК, УФ, ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа, ТСХ.

4. Провести компьютерный прогноз биологической активности полученных соединений.

5. Экспериментально изучить противомикробную активность и острую токсичность полученных веществ, для наиболее активного соединения изучить его противовоспалительную и анальгезирующую активности.

6. Разработать нормы качества для наиболее активного соединения.

Научная новизна.

Установлено, что понижение температуры кипения хлорсодержащего растворителя для проведения синтеза гидразоноилхлоридов (исходных веществ в данном исследовании) способствует увеличению их выхода. Впервые получены новые производные гидрогалогенидов амидразонов, замещённых 1 λ^4 ,2,3,5-тиатриазолов, 1,2,4-триазолов и 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов. Согласно компьютерному прогнозу наиболее перспективной группой веществ для экспериментального изучения противомикробной активности являются производные гидрогалогенидов амидразонов, которые в результате

исследований *in vitro* показали выраженную противогрибковую активность в отношении дрожжевых и мицелиальных культур, превышающую активность известных противогрибковых лекарственных средств (в 4 раза выше активности флуконазола и в 2 раза выше – вориконазола).

Теоретическая и практическая значимость работы, внедрение результатов исследования.

Оптимизирован известный метод синтеза гидразоноилхлоридов из соответствующих амидов и пентахлорида фосфора путем замены тетрачлорметана на дихлорметан, что позволило повысить их выход на 10-15 %. Для полученных солей амидразона определена острая токсичность и установлено, что соединения по классификации К.К. Сидорова, Ходжа и Стернера относятся к малотоксичным соединениям. Среди них выявлено малотоксичное соединение гидрохлорид 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида, которое обладает выраженным противокандидозным действием, а также противовоспалительной и анальгезирующей активностями. Для гидрохлорида 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида разработаны методики анализа.

Результаты диссертации внедрены в учебный процесс кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт о внедрении от 26.04.2019) и в производстве активных фармацевтических субстанций ПАО «Фармсинтез» (акт внедрения от 09.04.2019).

Методология и методы исследования. Теоретическую основу работы составляли труды зарубежных и отечественных ученых по синтезу гидразоноилхлоридов, гидрогалогенидов амидразонов и 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов и их биологической активности. В работе использовали методы синтетической органической химии для получения промежуточных и целевых веществ; методы спектроскопии ЯМР (^1H , ^{13}C) и ИК, спектрофотометрии, масс-спектрометрии для установления строения соединений; компьютерное моделирование *in silico* для прогнозирования биологической активности и возможного механизма действия веществ; методы *in vitro* и *in vivo* для экспериментального определения биологической активности и токсичности полученных соединений; определены нормы качества для наиболее активного соединения с помощью методик описанных в государственной фармакопее Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация полученных результатов. Результаты

диссертационной работы подтверждаются воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием современных методов анализа и валидированных средств измерений.

Основные результаты диссертационной работы представлены на Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014-2018 гг.), Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2014-2019 гг.), Международном симпозиуме «Современные тенденции в разработке лекарственных препаратов» (Финляндия, г. Турку, 2015), Международном симпозиуме «Современные тенденции в разработке лекарственных препаратов» (Санкт-Петербург, 2015), Российско-финском симпозиуме «Опыт сотрудничества ВУЗов и фармацевтических компаний по созданию новых лекарственных препаратов» (Финляндия, г. Турку, 2016), Легендарная «Пчелка» – XX Молодежная школа-конференция по органической химии (Казань, 2017).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Усовершенствование условий проведения синтеза гидразоноилхлоридов – исходных веществ для получения гидрогалогенидов амидразонов и замещённых 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов;

2. Синтез гидрогалогенидов амидразонов и результаты их химического взаимодействия с тионилхлоридом, бензоилхлоридом и ацетоном, а также результаты взаимодействия гидразоноилхлоридов с амидом коричной кислоты и акриламидом;

3. Результаты установления строения и индивидуальности синтезированных соединений с помощью физико-химических методов анализа;

4. Результаты компьютерного прогноза противомикробной активности полученных соединений;

5. Результаты изучения противомикробной активности *in vitro* и острой токсичности синтезированных веществ; для наиболее активного соединения – противовоспалительной и анальгезирующей активности *in vivo*;

6. Проект нормативных требований для рабочего стандартного образца гидрохлорида 4-нитро-*N'*-фенилбензолкарбоксимидогидразида.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО

СПХФУ Минздрава России по направлению «Получение и изучение фармакологического действия биологически активных веществ с целью создания инновационных лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01201252027).

Личный вклад автора в проведённое исследование и получение научных результатов. Основная часть исследования выполнена лично автором (не менее 90 % общего объема), а именно: разработка плана исследования, все этапы работы по прогнозу *in silico*, синтез веществ, экспериментальное определение биологической активности, острой токсичности, определение норм качества для наиболее активного соединения и обработка полученных данных, апробация результатов, написание диссертационной работы.

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 1. «Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ» и пункту 2. «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств».

Публикации материалов исследования. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в зарубежном журнале «Journal of Advanced Chemical Sciences», 9 тезисов.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертационной работы изложены на 124 страницах. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа иллюстрирована 63 рисунками и содержит 25 таблиц. Библиография включает 168 ссылок на литературные источники.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре рассмотрены известные методы получения и некоторые химические свойства производных амидразонов и 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов, а также их биологическая активность. Было установлено, что методы их получения не многочисленны, имеют ряд недостатков (низкий выход, трудность выделения целевых веществ и их очистки), и объединены возможностью синтеза из доступных *N*-замещённых гидразоноилхлоридов. Сведения о противомикробной активности исследуемых соединений носят в значительной степени отрывочный характер. В связи с этим представляется целесообразным осуществить синтез новых рядов соединений, принадлежащих к данным классам веществ, и экспериментально изучить спектр их биологической активности с интеграцией методов *in silico*.

ГЛАВА 2. СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ ГИДРОГАЛОГЕНИДОВ АМИДРАЗОНОВ И ДИГИДРОПИРАЗОЛОВ

Ключевой синтетической задачей данной работы является изучение реакций гидразоноилхлоридов, приводящих к образованию гидрогалогенидов амидразонов и замещённых 4,5-дигидро-1*H*-пиразолам. Исходные для этих групп веществ гидразоноилхлориды были получены по известной методике, которая тем не менее обладает потенциалом для улучшения. Ниже представлена общая схема синтеза исследуемых веществ (рисунок 1).

2.1 Синтез и реакционная способность бензолкарбогидразоноилхлоридов

2.1.1 Некоторые подходы к оптимизации синтеза бензолкарбогидразоноилхлоридов

Согласно литературным данным наиболее эффективным методом синтеза гидразоноилхлоридов **2**, является взаимодействие гидразидов **1** с пентахлоридом фосфора в кипящем четыреххлористом углероде. При этом выход гидразоноилхлоридов

достигает 85 %. В то же время можно было попытаться его увеличить, например,

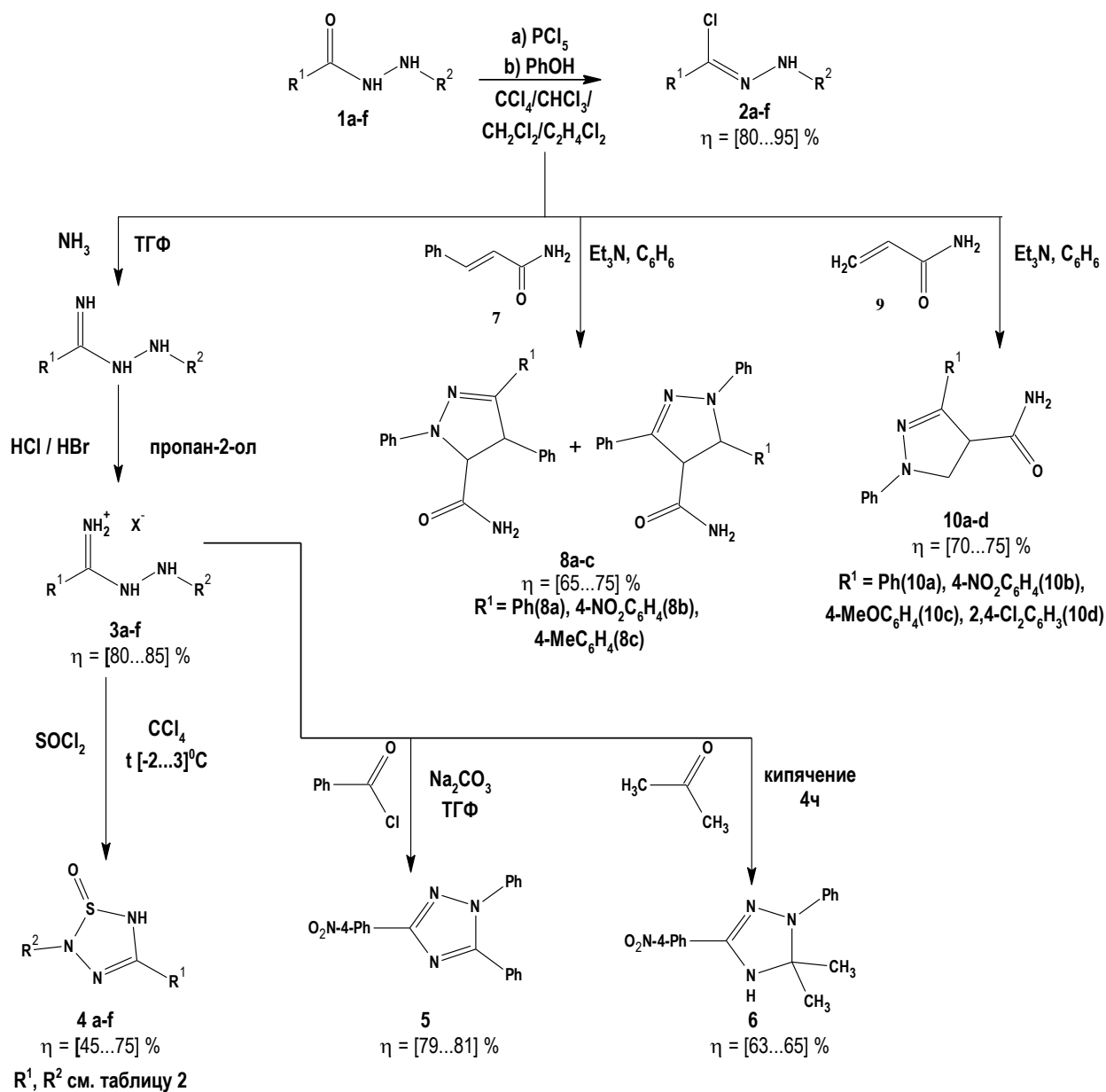


Рисунок 1. Схема синтеза исследуемых веществ

варьируя температуру кипения и полярность хлорсодержащих растворителей (рисунок 1).

В работе было показано (таблица 1), что отчетливой зависимости выхода соединений **2a-f** от диэлектрической проницаемости растворителя не наблюдается, но просматривается обратная зависимость между выходом этих веществ и температурой кипения растворителя (при кипении реакционной смеси). Возможно, некоторое снижение выхода соединений **2a-f** при их синтезе в кипящем растворителе с более высокой температурой кипения обусловлено протеканием побочных реакций.

Таким образом, замена более высококипящего четыреххлористого углерода на дихлорметан с меньшей температурой кипения позволила увеличить выход соединений **2a-f** на 10-15 % (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние хлорсодержащего растворителя на выход соединений **2a-f**

| Растворитель | T _{кип.} растворителя, °C | Диэлектрическая проницаемость | η, % |
|---|------------------------------------|-------------------------------|---------|
| CCl ₄ | 76,75 | 2,23 при 20 °C | 80...85 |
| CHCl ₃ | 61,2 | 5,1 при 20 °C | 88...91 |
| CH ₂ Cl ₂ | 40 | 8,93 при 25 °C | 93...95 |
| C ₂ H ₄ Cl ₂ | 83,48 | 10,46 при 25 °C | 70...75 |

2.2 Синтез и строение гидрогалогенидов амидразонов

Синтез амидразонов-оснований осуществляли по известной методике из гидразоноилхлоридов **2a-f** путем их обработки осушенным аммиаком в абсолютированном ТГФ (рисунок 1). Гидрогалогениды амидразонов **3a-f** были получены обработкой амидразонов-оснований хлороводородом либо бромоводородом в безводном пропан-2-оле (рисунок 1). Гидрогалогениды амидразонов **3b**, **3b'**, **3c'**, **3e** ранее не были описаны (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика полученных соединений **3a-f**

| № | R ¹ | R ² | X | M, г/моль | t _{пл.} , °C | η, % |
|------------|---|---|----|-----------|-----------------------|---------|
| 3a | Ph | Ph | Cl | 247,72 | 133...135 | 80...82 |
| 3b | 4-O ₂ NC ₆ H ₄ | | Cl | 292,72 | 183...185 | 80...95 |
| 3b' | 4-O ₂ NC ₆ H ₄ | | Br | 337,17 | 169...171 | 78...80 |
| 3c | Ph | 4-O ₂ NC ₆ H ₄ | Cl | 292,72 | 170...173 | 80...85 |
| 3c' | Ph | 4-O ₂ NC ₆ H ₄ | Br | 337,17 | 175...177 | 80...83 |
| 3d | 4-MeOC ₆ H ₄ | Ph | Cl | 277,75 | 127...129 | 77...81 |
| 3e | 2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ | | Cl | 316,61 | 174...177 | 81...90 |
| 3f | 4-MeC ₆ H ₄ | | Cl | 261,75 | 191...194 | 80...85 |

Строение и индивидуальность полученных соединений устанавливали с помощью физико-химических методов анализа (спектроскопии ЯМР (¹H, ¹³C) и ИК, УФ спектрофотометрии, масс-спектрометрии, ТСХ и элементного анализа).

Запись спектров ЯМР проводили согласно ОФС ГФ РФ. В качестве растворителя использовали ДМСО-*d*₆. В спектрах ¹H ЯМР растворов соединений **3a-f** наблюдаются следующие сигналы протонов: групп NH-NH в области 8,9 и 11,9 м.д., групп NH₂⁺ в области (9,5...10,0) м.д., ароматического кольца – в области (7,2...8,0) м.д. В спектрах

соединений **3d** и **3f** присутствуют сигналы протонов групп OCH_3 и CH_3 при 3,6 и 2,8 м.д. соответственно.

В спектрах ^{13}C ЯМР растворов соединений **3a-f** наблюдаются сигналы ядер углерода: $\text{C}^7=\text{N}$ в области (149...156,7) м.д., C^1 в области (140,3...147,8) м.д., C^{11} в области от (130,7...134,5) м.д., $\text{C}^{3,5}$ в области (128,6...129,9) м.д., $\text{C}^{10,12}$ в области (115,5...114,2) м.д. В спектрах соединений **3d** и **3f** присутствуют также сигналы ядер углерода групп CH_3 при 55,6 и 22,4 м.д. соответственно.

2.2.1 Химические свойства гидрогалогенидов амидразонов **3a-f**

Одной из задач настоящего исследования была оценка возможности осуществить химическое превращение полученных соединений **3a-f** при взаимодействии с тионилхлоридом. Так, при проведении этой реакции в хлороформе образуются соответствующие $1\lambda^4,2,3,5$ -тиатриазолы **4a-f** (рисунок 1, таблица 3). Соединения **4b-f** ранее не были описаны.

Таблица 3 – Характеристики полученных $1\lambda^4,2,3,5$ -тиатриазолов **4a-f**

| № | R^1 | R^2 | М, г/моль | $T_{\text{пл.}}, ^\circ\text{C}$ | η , % |
|-----------|--|--------------------------------------|-----------|----------------------------------|------------|
| 4a | Ph | Ph | 257,31 | 175...177 | 60...63 |
| 4b | 4- $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ | | 302,31 | 170...173 | 60...64 |
| 4c | Ph | 4- $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ | 302,31 | 166...169 | 70...75 |
| 4d | 4- MeOC_6H_4 | Ph | 287,34 | 194...197 | 45...50 |
| 4e | 2,4- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$ | | 326,20 | 159...162 | 63...66 |
| 4f | 4- MeC_6H_4 | | 271,34 | 175...177 | 55...58 |

В спектрах ^1H ЯМР в $\text{DMCO-}d_6$ веществ **4b-f** наблюдаются характерные сигналы протонов арильных групп (6,98...8,41) м.д., уширенный сигнал протона группы NH в области (12,23...12,42) м.д. В спектрах соединений **4d** и **4f** присутствовали сигналы протонов групп OCH_3 и CH_3 при 3,95 и 2,10 м.д. соответственно.

В спектрах ^{13}C ЯМР растворов соединений **4b-f** в $\text{DMCO-}d_6$ присутствуют сигналы ядер углерода тиатриазольных циклов в области (148,02...149,68) м.д., ядер углерода бензольных колец в области (119,39...143,94) м.д., а в спектрах соединений **4d** и **4f** – также сигналы ядер углерода групп CH_3 при 55,19 и 27,08 м.д. соответственно.

В работе было изучено взаимодействие соединения **3b** с бензоилхлоридом в ТГФ в присутствии Na_2CO_3 с образованием известного замещенного 1,2,4-триазола **5** с выходом более 80 %, характеристики которого совпадают с литературными данными. В тоже время, синтез соединения **5** использованным нами методом ранее описан не был.

При нагревании соединения **3b** в кипящем ацетоне впервые был получен замещенный 1,2,4-триазол **6** (схема 1).

В спектре ^1H ЯМР раствора соединения **6** в $\text{DMCO-}d_6$ наблюдаются сигналы протонов групп CH_3 при 1,23 м.д., сигналы групп протонов ароматических колец в области (7,16...8,05) м.д.

В спектрах ^{13}C ЯМР раствора триазола **6** в $\text{DMCO-}d_6$ присутствуют сигналы ядер углерода групп CH_3 в области (23,50...25,70) м.д., триазольного кольца при 150,56 и 87,64 м.д., бензольных колец в области (118,01...139,75) м.д.

2.3 Синтез и строение замещенных 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов

В работе осуществлено взаимодействие гидразоноилхлоридов **2** с амидом коричной кислоты **7**, а также с акриламидом **9** в присутствии триэтиламина в бензоле с образованием соответствующих замещенных 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов.

Установлено, что при взаимодействии амида коричной кислоты **7** с гидразоноилхлоридами **2a-c** образуются замещенные 4,5-дигидро-1*H*-пиразолы в виде смеси двух региоизомеров **8a-c** и **8'a-c** в мольном соотношении ~7:3, соответственно (рисунок 1).

В спектрах ^1H ЯМР в $\text{DMCO-}d_6$ смесей веществ **8a-c** и **8'a-c** присутствуют сигналы двух региоизомеров: дублеты протонов групп CH-CH дигидропиразольного кольца в области (4,4...5,4) м.д., протонов ароматических колец в области (6,8...7,7) м.д., а спектре смеси соединений **8c** и **8'c** – также сигналы протонов группы CH_3 при 2,2 м.д. в виде синглета.

В спектрах ^{13}C ЯМР растворов дигидропиразолов **8a-c** и **8'a-c** в $\text{DMCO-}d_6$ наблюдаются сигналы, ядер углерода дигидропиразольного кольца в области (50,1...60,0) м.д. и (155,3–160,3) м.д., бензольных колец в области (124,7...140,6) м.д., группы C=O в области (168,1...170,4) м.д. В спектре смеси соединений **8c** и **8'c** присутствуют также два синглета групп CH_3 двух изомеров в области (20,4...21,4) м.д.

Полученные смеси региоизомеров **8a-c** и **8'a-c** не удалось разделить на индивидуальные соединения, поэтому в дальнейшем исследование их биологической активности не проводилось.

Взаимодействие гидразоноилхлоридов **2a-d** с акриламидом **9** протекает с образованием только одного из возможных изомеров R^1 -фенил-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-5-карбоксамидов **10a-d** (рисунок 1, таблица 4).

Таблица 4 – Характеристики полученных 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов **10a-d**.

| № | R ¹ | R ² | M, г/моль | T _{пл.} , °C | η, % |
|------------|---|----------------|-----------|-----------------------|---------|
| 10a | Ph | Ph | 278,33 | 163...165 | 69...71 |
| 10b | 4-O ₂ NC ₆ H ₄ | | 310,31 | 172...174 | 69...74 |
| 10c | 4-MeOC ₆ H ₄ | | 295,34 | 170...173 | 71...73 |
| 10d | 2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ | | 334,20 | 176...179 | 74...76 |

В спектрах ¹H ЯМР растворов соединений **10a-d** в ДМСО-*d*₆ имеются сигналы протонов групп СН и СН₂ дигидропиразольного кольца в области (4,6...5) и (2,9...3,8) м.д., протонов амидной группы NH₂ в области (9,4...10,2) м.д., протонов ароматических колец в области (6,9...8,3) м.д. В спектре соединения **10c** присутствуют сигналы протонов групп СН₃ при 2,1 м.д.

В спектрах ¹³C ЯМР растворов соединений **10a-d** в ДМСО-*d*₆ наблюдали характерные сигналы ядер углерода дигидропиразольного кольца в области (52,7...44,3) и (150,5...161,1) м.д., бензольных колец в области (121,2...140,7) м.д. и группы С=О в области (170,7...173,3) м.д. В спектре соединения **10c** присутствует сигнал ядра углерода группы СН₃ при 22 м.д.

ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ

Предварительно, в качестве отдельного этапа исследования с помощью программы PASS Refined 2014 был получен компьютерный прогноз спектра потенциальной биологической активности синтезированных веществ (гидрогалогениды амидразонов **3a-f**, 1λ⁴,2,3,5-тиатриазолы **4a-f**, 1,2,4-триазолы **5** и **6**, 4,5-дигидро-1*H*-пиразолы **10a-d**). Согласно полученным данным, для всех этих соединений прогнозируются с вероятностью P_a ≥ 0,51 – 0,96 противовоспалительная, анальгезирующая и антипротозойная активности. Вероятность проявления антибактериальной и противогрибковой активностей среди полученных соединений была наиболее высокой у гидрогалогенидов амидразонов **3a-f** P_a ≥ 0,21 – 0,50.

Для определения возможного механизма противомикробного действия соединений **3a-f** с помощью программы PASS Targets были отобраны белки-мишени, выбор которых основан на значениях показателей P_a (active) и P_i (inactive), условие отбора: P_a > P_i. Программой были предложены следующие белки-мишени микроорганизмов: *E. coli* – цистатионин-β-лиаза (**1CL2**), *B. cereus* –

фосфопантетеинилтрансфераза (**1QR0**), *C. albicans* – экзо-β-(1,3)-глюканаза (**2PB1**), *St. aureus* – дегидроскваленсинтаза (**3ACX**). В скобках указаны PDB-коды белков.

Далее с помощью программы *Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite Release 2018-2* было проведено компьютерное моделирование взаимодействия синтезированных соединений **3a-f** с отобранными бактериальными (**1CL2**, **1QR0**, **3ACX**) и грибковыми (**2PB1**) мишенями. Результаты компьютерного моделирования показали низкие значения скоринг-функций в отношении мишеней **1CL2** и **1QR0**, и высокие их значения для мишеней **2PB1** и **3ACX**, что хорошо согласуется с экспериментальными данными *in vitro*, приведёнными ниже.

Для исследования *in vitro* антибактериальной активности полученных соединений в качестве тест-культур использовали следующие микроорганизмы: *S. aureus*, *B. cereus*, и *E. coli*. В качестве препарата сравнения был выбран антибактериальный препарат, обладающий структурным сходством с полученными соединениями – нифуроксазид.

Для изучения противогрибковой активности использовали тест-культуры дрожжей рода *C. albicans*. В качестве препарата сравнения использовали противокандидозное средство – флуконазол, который обладает структурным сходством с соединениями **3a-f**.

Было установлено, что при исследовании *in vitro* антимикробного действия гидрогалогениды амидразонов **3a-f** оказались фактически неактивными в отношении культур *E. coli* и *B. cereus*, МБК составила (32,5...250) мкг/мл.

В то же время гидрогалогениды амидразонов **3a-f** показали выраженную активность в отношении *S. aureus* и *C. albicans*.

Антибактериальная активность гидрогалогенидов амидразонов в отношении *S. aureus* зависела от характера присутствующего заместителя в бензольном кольце. При замене электроноакцепторного заместителя (NO₂, Cl) электронодонорным (OCH₃, CH₃) значительно понижалась бактерицидное действие амидразонов с 4 до 125 мкг/мл. Более выраженной антистафилококковой активностью обладали гидрохлорид **3c** и гидробромид **3c'**, содержащие группу NO₂ в *n*-положении фенилгидразинового фрагмента. Данные соединения оказывали бактерицидное действие на стафилококк. МБК соединений **3c** и **3c'** были в 2–4 раза ниже, чем у препарата сравнения (16 мкг/мл).

При изучении противогрибковой активности соединений 3a-f, установлено, что выраженным противогрибковым действием в отношении *C. albicans* обладали:

соединение **3a** (МПК 8 мкг/мл, МБК 16 мкг/мл), **3b** (МПК 4 мкг/мл, МБК 8 мкг/мл) и **3b'** (МПК 16 мкг/мл, МБК 32.5 мкг/мл), у которых в *n*-положении одного из арильных фрагментов находится сильный электроноакцепторный заместитель (NO₂). Соединения **3a** и **3b** при действии на *C. albicans* обладали более выраженной фунгистатической и фунгицидной активностью, чем препарат сравнения флуконазол (32 мкг/мл).

Для расширения спектра действия гидрогалогенидов амидразонов на основании результатов, полученных при изучении антимикробной активности соединений **3a-f**, были отобраны три наиболее активных соединения **3a**, **3b** и **3b'** и исследована их активность в отношении мицелиального гриба *A. brasiliensis*. В качестве препарата сравнения использовали противогрибковый препарат широко спектра действия и имеющий структурное сходство с исследуемыми соединениями – вориконазол.

В отношении *A. brasiliensis* гидрохлорид **3b** оказывал фунгицидное действие при 16 мкг/мл. Это значение МФК соединения **3b** оказалось в 2 раза ниже, чем у препарата сравнения вориконазола, который оказывал фунгистатическое действие при МПК 32,5 мкг/мл. Гидробромид **3b'** был менее активен (МФК 62,5 мкг/мл), чем гидрохлорид **3b**. Соединение **3a** было практически неактивно (МФК 125 мкг/мл).

Определение острой токсичности соединений 3a-f проводили на белых нелинейных мышах-самцах, массой 20–25 г. Соединения **3a-f** вводили мышам-самцам двумя методами: внутрибрюшинно и перорально.

Следует отметить, острая токсичность зависела от природы заместителей в *n*-положении арильных фрагментов у соединений **3a-f**. Усиление их электроноакцепторных свойств значительно снижает токсичность соединений **3a-f**: при внутрибрюшинном введении LD₅₀ составляла (200...450) мг/кг, при пероральном введении – (1100...2100) мг/кг, что позволяют отнести соединения **3a-f** к малотоксичным соединениям по классификации К.К. Сидорова, Ходжа и Стернера, соответственно.

Таблица 5 – Результаты оценки острой токсичности (LD₅₀) соединений **3a-f**

| Соединение | LD ₅₀ (мг/кг) | |
|------------|------------------------------|--------------------------|
| | При внутрибрюшинном введении | При пероральном введении |
| 3a | 320±84 | 1552±347 |
| 3b | 421±153 | 2081±547 |
| 3b' | 367±153 | 1947±361 |
| 3c | 378±142 | 1886±769 |
| 3c' | 390±87 | 1850±574 |
| 3d | 208±55 | 1144±298 |
| 3e | 293±109 | 1468±545 |
| 3f | 416±141 | 2008±588 |

Для гидрохлорида 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида **3b** (далее – соединение **3b**), показавшего *in vitro* наиболее высокую противомикробную активность и низкую токсичность, а также с учетом того обстоятельства, что инфекционные заболевания могут сопровождаться воспалительным процессом и болевым синдромом, были изучены противовоспалительная и анальгезирующая активности, определены его показатели качества.

Изучение противовоспалительной и анальгезирующей активности.

Противовоспалительную активность соединения **3b** изучали двумя методами: формалиновый отек у мышей-самцов (массой 20–25 г) и модели асептического воспаления («ватная гранулема») в опытах на крысах-самцах (массой 350–400 г). Исследование противовоспалительной активности методом формалинового отека лапок у мышей показало, что антиэкссудативное действие соединения **3b** было выше (54 %), чем у препарата сравнения ацеклофенак (38 %). В исследовании противовоспалительной активности методом «ватной гранулемы» пролиферативная реакция соединения **3b** оказалась на 12 % выше, чем у препарата сравнения ацеклофенака.

Анальгезирующую активность изучали с помощью метода отдергивания хвоста у мышей (массой 20–25 г) от источника теплового излучения на приборе Tail-Flick Analgesia Apparatus. В результате эксперимента было установлено, что флексорный рефлекс у мышей, которым вводили соединение **3b** был сопоставим с эффектом препарата сравнения метамизола натрия и составил 5 с.

Таким образом, исследуемое соединение **3b** обладало выраженными противовоспалительной и анальгезирующей активностями на уровне препаратов сравнения.

ГЛАВА 4. ПОКАЗАТЕЛИ НОРМ КАЧЕСТВА СОЕДИНЕНИЯ 3b

Для наиболее перспективного соединения **3b**, отобранного на основании результатов изучения биологической активности и острой токсичности, был разработан рабочий стандартный образец и определены показатели его норм качества.

Соединение **3b** – кристаллический порошок желтого цвета, без запаха. Растворим в воде, в этаноле 96 %, ацетоне, N,N-диметилформамиде, мало растворим в гексане, пропан-2-оле, уксусной кислоте. Подлинность соединения **3b** определяли методами ЯМР, ИК, масс-спектрографии и УФ спектрофотометрии. Посторонние примеси предложено контролировать с помощью метода ТСХ, на пластинках «Merck Kieselgur F254» в системе *n*-гептан:ацетон:этанол (4:2:1). При исследовании испытуемого образца соединения **3b** на хроматограмме присутствовало одно пятно основного вещества с $R_f=0.80\dots0.83$. Пятна, соответствующие возможным примесям (4-нитробензойная кислота, фенилгидразин), отсутствовали, что свидетельствует об их содержании в сумме менее 0,2 %. Количественное определение проводили методами УФ спектрофотометрии и прямой аргентометрии (таблица 6). УФ спектр 0,0011 % раствора соединения **3b** в этаноле в области от 300 до 600 нм имеет максимум при 445 ± 2 нм и минимум при 380 ± 2 нм. Удельный показатель поглощения соединения при 445 ± 2 нм равен 380. Содержание вещества, определенное методом УФ спектрофотометрии и методом прямой аргентометрии составило 99.3 ± 0.5 %.

Таблица 6 – Нормы качества рабочего стандартного образца соединения **3b**

| Показатели | Методы | Нормы |
|---------------|---|---|
| Описание | Органолептический | Желтый мелкокристаллический порошок без запаха |
| Растворимость | ГФ РФ (ОФС.1.2.1.0005.15) | Растворим в воде, в этаноле 96 %, ацетоне, N,N-диметилформамиде, мало растворим в <i>n</i> -гексане, пропан-2-оле, уксусной кислоте |
| Подлинность | Спектр ^1H ЯМР (δ , м.д., ДМСО- d_6) | 6,99 д, 7,39 м, 8,20 м, 8,45 м, (9H, 2Ph), 8,95 с (1H, NH), 9,77 уш. с (2H, NH), 12,16 с (1H, NH) |
| | Спектр ^{13}C ЯМР (δ , м.д., ДМСО- d_6) | 150,70 (C^7), 146,41 (C^1), 130,88 (C^{11}), 129,58 ($\text{C}^{3,5}$), 127,93 (C^8), 124,28 ($\text{C}^{2,6}$), 121,37 (C^4), 114,23 ($\text{C}^{10,12}$), 111,06 ($\text{C}^{9,13}$) |
| | ИК спектрометрия (диск с KBr) | 3300 – 3070 (N-H), 3000 – 2800 (C-H), 1680 (C=N), 1530 и 1380 (NO_2). |
| | Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$) | 292,07 (100 %), 294,07 (32.2 %), 293,08 (14.7 %), 295,07 (5.1 %), |

| Показатели | Методы | Нормы |
|--------------------------------|--|---|
| | | 293,07 (1,5 %), 294,08 (1,4 %) |
| | Спектрофотометрия | Электронный спектр поглощения 0,001 % испытуемого раствора в этаноле в области от 380 до 500 нм должен иметь $\lambda_{\max} = 445 \pm 2$ нм, $\lambda_{\min} = 380 \pm 2$ нм, $A_{1\text{см}}^{1\%} 380$. |
| | Реакция восстановления NO_2 группы до NH_2 группы, затем диазотирование и азосочетание с щелочным раствором β -нафтола | Осадок темно-красного цвета |
| Потеря в массе при высушивании | ГФ РФ (ОФС.1.2.1.0010.15) | Не более 0,5% |
| Температура плавления | ГФ РФ (ОФС.1.2.1.0011.15) | 183–185°C |
| Родственные примеси | ТСХ | Примесь 4-нитробензойная кислота не более 0,1 % Примесь фенилгидразин не более 0,1 % Любая единичная не идентифицированная примесь не более 0,1 % сумма примесей не более 0,5 % |
| Сульфатная зола | ГФ РФ (ОФС.1.2.2.2.0014.15) | Не более 0,1 % |
| Тяжелые металлы | ГФ РФ (ОФС.1.2.2.2.0012.15) | Не более 0,001 % |
| Количественное определение | Прямая аргентометрия | От 99,0 до 102 % $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2$ в пересчете на сухое вещество |

ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В главе описаны методики синтеза гидрогалогенидов амидразонов, замещенных 4,5-дигидро-1*H*-пиразолов, замещенных 1*λ*⁴,2,3,5-тиатриазолов и 1,2,4-триазолов; использованные компьютерные программы для прогноза биологической активности исследуемых соединений и моделирования их взаимодействия с белками-мишенями; методики экспериментов *in vitro* по изучению противомикробной активности, острой токсичности гидрогалогенидов амидразонов; методики определения противовоспалительной и анальгезирующей активности для наиболее активного и малотоксичного соединения **3b**; методики определения показателей качества соединения **3b**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Оптимизированы условия синтеза гидразоноилхлоридов и установлено, что замена обычно используемого в качестве растворителя четыреххлористого углерода дихлорметаном увеличивает выход этих веществ на 10–15 %;

2. Синтезированы ранее не описанные гидрогалогениды амидразонов (**3b**, **3b'**, **3c'**, **3e**), доказано их строение. Изучено их взаимодействие с тионилхлоридом, приводящее к новым производным 1 λ^4 ,2,3,5-тиатриазола **4b-f**. Продемонстрирована возможность синтеза известного замещенного 1,2,4-триазола **5** путем ранее не описанного взаимодействия 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида с бензоилхлоридом. При взаимодействии 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида с ацетоном получен новый замещенный 1,2,4-триазол **6**. При взаимодействии гидразоноилхлоридов с амидом коричной кислоты и акриламидом получены новые производные 4,5-дигидро-1H-пиразола (**8b-c**, **10a,b,d**).

3. С использованием методов *in silico* показано, что наиболее перспективной группой веществ для экспериментального изучения противомикробной активности являются производные гидрогалогенидов амидразонов **3a-f**. Установлено, что соединения **3a-f** обладают противомикробным действием в отношении *S. aureus*, *C. albicans*, *Asp. brasiliensis* и низкой токсичностью. Среди полученных солей амидразонов соединение **3b** обладало выраженным противогрибковым действием в отношении дрожжей *C. albicans* и мицелиального гриба *Asp. brasiliensis*. Показано, что противомикробная активность гидрогалогенидов амидразонов зависела от электронной природы заместителей в арильных фрагментах их молекул. Электроноакцепторные заместители повышали, а электронодонорные – снижали антимикробную активность соединений.

4. Для гидрохлорида 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида **3b**, обладающего наибольшей противомикробной активностью среди полученных гидрогалогенидов амидразонов **3a-f** и низкой токсичностью, изучены противовоспалительная и анальгезирующая активности, уровень которых сопоставим с действием препаратов сравнения.

5. Разработан рабочий стандартный образец наиболее активного соединения гидрохлорида 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида и установлены его показатели норм качества в соответствии с ГФ РФ.

Перспективы дальнейшей разработки темы включают следующие основные научно-исследовательские направления, имеющие практическое значение: создание лекарственных средств на основе полученных соединений **3a-f** как полупродуктов в синтезе новых биологически активных бис(1,2,4-триазолил)алканов. В Turku PET Centre, Turku University Hospital проведен предварительный компьютерный анализ полученных соединений **3a-f** по ингибированию протеинкиназ (MST1 – Mammalian sterile 20-like kinase 1), которые проявляли высокую селективность по отношению к MST1. MST1 является ключевым медиатором клеточного апоптоза, в том числе может служить в качестве мишени для разработки новых лекарственных средств для лечения диабета.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сенина, А. С.** Биологическая активность гидрогалогенидов амидразонов / А. В. Москвин, С. В. Гурина, Е. Л. Авенирова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – №1 (22). – С. 114-119.

2. **Сенина, А. С.** Противомикробная активность гидрогалогенидов амидразонов / С. В. Гурина, А. В. Москвин // Научно-практический журнал Фармация. – №8. – 2017. – С. 40-44.

3. Евдокимов, А. А. Синтез, строение и биологическая активность некоторых амидразонов / **А. С. Сенина**, А. В. Москвин, И. А. Фридман, И. П. Яковлев, С. В. Гурина // Англо-русскоязычный научный химический журнал «Бутлеровские сообщения», 2014. – Т.39. - №8. – С.87-90.

4. **Senina A. S.**, Evdokimov A. A., Moskvina A. V., Fedorova E. V. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Amidrazone Derivatives // Journal of Advanced Chemical Sciences. Vol. 2, I. 1. – 2016. – pp.183 – 187.

5. Евдокимов, А. А., **Сенина А. С.** Синтез, строение и биологическая активность продуктов взаимодействия арилгидразинов с некоторыми ароматическими альдегидами и ароилхлоридами // II Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» 17-18 ноября 2014 г., Санкт-Петербург. – 2014. – С. 342 – 346.

6. **Сенина, А. С.** Синтез некоторых амидразонов, строение и биологическая активность / С. В. Гурина, А. В. Москвин // Сборник тезисов V Всероссийской научной

конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 20-21 апреля 2015 г., Санкт-Петербург. – 2015. – С. 128-131.

7. **Сенина, А. С.** Изучение биологической активности производных амидразонов / С. В. Гурина, А. В. Москвин // III Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» 10-11 ноября 2015 г., Санкт-Петербург. – 2015. – С. 403-406.

8. **Сенина, А. С.** Биологическая активность производных амидразонов / А. В. Москвин // Сборник тезисов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 25-26 апреля 2016 г., Санкт-Петербург. – 2016. – С. 167 – 169.

9. **Сенина, А. С.** Антимикробная активность производных амидразонов / А. В. Москвин // Сборник тезисов VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 24–25 апреля 2017 г., Санкт-Петербург. – 2017. – С. 141-144.

10. **Сенина, А. С.** Производные амидразонов и их биологическая активность / С. В. Гурина, А. В. Москвин // Сборник тезисов, докладов XX Молодежной школы-конференции по органической химии 18-21 сентября 2017 г., Казань. – 2017. – С.61.

11. **Сенина, А. С.** Биологическая активность гидрогалогенидов амидразонов / С. В. Гурина, А. В. Москвин // V Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» 8-9 ноября 2017 г., Санкт-Петербург. – 2017. – С. 347 – 353.

12. **Сенина, А. С.** Синтез, строение и биологическая активность гидрогалогенидов амидразонов / А. В. Москвин // Сборник тезисов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 23–24 апреля 2018 г., Санкт-Петербург. – 2018. – С. 119-122.

13. **Сенина, А. С.** Биологическая активность гидрогалогенидов N'-арилбензолкарбоксимидогидразидов / С. В. Гурина, А. В. Москвин // VI Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» 14-15 ноября 2018 г., Санкт-Петербург. – 2018. – С. 317 – 323.