

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Нгуен Тхи Суен

**ИЗОМЕРИЯ, КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ СПИРОПИРАНОВ ОКСАИНДАНОВОГО РЯДА**

1.4.4 – Физическая Химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Ростов-на-Дону – 2024

Работа выполнена на кафедре физической и коллоидной химии имени проф. В. А. Когана химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель: **Щербаков Игорь Николаевич**
доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии имени профессора В. А. Когана химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Официальные оппоненты: **Лукова Галина Викторовна**
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук» (ФИЦ ПХФ и МХ РАН), г. Черноголовка

Гарновский Дмитрий Александрович

кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (ЮНЦ РАН),
г. Ростов-на-Дону

Защита состоится «23» мая 2024 года в 15:30 часов на заседании диссертационного совета ЮФУ801.01.03 по химическим наукам при Южном федеральном университете по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2, НИИ физической и органической химии ЮФУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Зорге, д. 21-Ж, 2 этаж и на сайте: <https://hub.sfedu.ru/diss/show/1326235/>

Отзыв (в нем укажите дату, а также полностью свою фамилию, имя, отчество, ученую степень со специальностью, звание, организацию, подразделение, должность, адрес, e-mail) с заверенной подписью рецензента и печатью учреждения просим направлять в 2 экз. ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ801.01.03 при ЮФУ Душенко Галине Анатольевне по адресу: 344006 г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42, НИИ физической и органической химии ЮФУ (а также в формате .pdf – на e-mail: gadushenko@sfedu.ru).

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета ЮФУ801.01.03,
доктор химических наук



Душенко Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Spiropiranes представляют собой класс гетероциклических соединений, которые особенно привлекательны из-за различий в конформации и физико-химических свойствах взаимопревращающихся изомеров. Изомер “закрытой” формы, названный Spiropiran (SP), содержит связь $C_{\text{spiro}}-O$, в результате чего две части молекулы расположены практически перпендикулярно. Молекулярный каркас не содержит заряженных групп, и из-за “скрученной” конформации сопряжение π -электронов между двумя частями невозможно. УФ-фото возбуждение может вызывать разрыв $C_{\text{spiro}}-O$ связи и ряд процессов *cis-trans*-изомеризации вокруг двойных связей. Образующийся изомер, называемый Merocyanine (MC), имеет плоскую конформацию, а также протяженную делокализованную π -электронную систему. Это позволяет молекуле поглощать видимый свет, а также проявлять флуоресценцию в том же диапазоне длин волн.

Кроме того, различные факторы, такие как pH, окислительно-восстановительные реакции, природа растворителя и температура, могут сместить положение равновесия SP-MC. Химическую функционализацию можно проводить в нескольких положениях молекулярного каркаса с минимальным влиянием на энергию активации процесса переключения. Это облегчает создание молекул с улучшенными и настраиваемыми сенсорными возможностями, а также позволяет их включение в полимеры, биомолекулы, поверхности и широкий спектр nanoarchitectures для получения функциональных материалов.

Поиск различных путей функционализации Spiropiranes позволяет в итоге получать полифункциональные молекулы на их основе, способные найти применение в нелинейной оптике, биохимии, молекулярной электронике, и материаловедении.

Именно по этим причинам была выбрана тема: **«Изомерия, комплексообразующая способность и биологическая активность функционализированных производных Spiropiranes оксаинданового ряда».**

Цели работы. Целью исследования был синтез соединений на основе 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана], способных образовывать координационные соединения с ионами 3d-металлов и обладающих потенциальной биологической активностью; теоретическое моделирование и экспериментальное исследование строения и их свойств. Для достижения цели необходимо решить ряд задач:

1. Синтез и препаративное выделение хелатофорно функционализированных производных Spiropiranes оксаинданового ряда на основе первичных аминов и тиосемикарбазидов, способных выступать полидентантными лигандами при взаимодействии с 3d-металлами.
2. Физико-химическое исследование строения полученных соединений. Квантово-химическое моделирование пространственного и электронного строения их изомерных форм.
3. Изучение фотохимических свойств соединений и их комплексообразующей способности с ионами 3d-металлов в растворе.
4. Изучение биологической активности *in vitro* синтезированных соединений.
5. Прогнозирование фармакологических свойств веществ и определение основных токсикологических параметров полученных соединений. Построение моделей молекулярного докинга для оценки и анализа способности связывания тиосемикарбазонов и енаминокетонов с ферментом тирозинкиназой, в частности с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Оценка корреляция между энергией связи, вычисленной с помощью молекулярного докинга, и биологической активностью *in vitro*.

Научная новизна. На основе 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] были синтезированы ряд новых енаминокетонов и тиосемикарбазонов, содержащих функциональные заместители в положении 7 и 8 бензопирановой части молекулы, выступающие в качестве комплексообразующего узла.

Показано, что конденсация 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с тиосемикарбазидами приводит к образованию тиосемикарбазонов с “закрытым” спиропирановым циклом, а реакция с первичными аминами приводит к сопряженной бензоидно-хиноидной перегруппировке с раскрытием пиранового цикла и образованием соответствующих енаминокетонов.

Установлено, что взаимодействие тиосемикарбазонов с ионами металлов приводит к раскрытию спиропиранового цикла и стабилизации в комплексе лиганда в мероцианиновой форме.

В случае тиосемикарбазонов **Tn1**, **Tn8** - продуктов взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с N-изопропилгидразинкарботиоамидом и N-бензилгидразинкарботиоамидом наблюдаются фотохромное поведение. Для енаминокетонов **En1**, **En2** - продуктов взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с аминоэтанолом и изопропиламином - зарегистрирован обратный фотохромизм.

Показано, что тиосемикарбазон **Tn8** может быть использован в качестве реагента для спектрофотометрического и кинетического метода определения L-глутатиона в смеси аминокислот.

Проведенные испытания противоопухолевой активности *in vitro* на четырех линиях раковых клеток показали, что тиосемикарбазоны проявляют высокую активность по отношению к клеткам рака легкого A549 и плоскоклеточной карциномы полости рта KB. Это показывает очень многообещающий потенциал для медицинского применения этих соединений.

Впервые методом молекулярного докинга оценена способность тиосемикарбазонов и енаминокетонов ингибировать фермент EGFR. Показано, что между вычисленной энергией связи тиосемикарбазонов с целевым белком (S) и экспериментальным значением биологической активности соединений по отношению к клеточным линиям рака плоскоклеточной карциномы полости рта KB и карциномы молочной железы MCF-7 (отрицательным логарифмом IC₅₀) наблюдается существенная корреляция.

Практическая значимость. Предлагаемые в настоящей диссертационной работе синтетические подходы позволяют разрабатывать методы получения новых производных спиропиранов, способных к хелатированию ионов металлов, что может быть использовано для дальнейших исследований в этой области на химическом факультете ЮФУ и других научных подразделениях.

Полученные данные моделирования методом молекулярного докинга взаимодействия тиосемикарбазонов и енаминокетонов с ферментом EGFR и определения *in vitro* цитотоксической активности позволит проводить направленный выбор перспективных эффективных соединений для лечения различных форм рака.

Разработанные методики аналитического спектрофотометрического и кинетического определения L-глутатиона в присутствии тиосемикарбазона **Tn8** могут быть использованы для анализа смеси аминокислот.

Личный вклад автора. Данная диссертация является настоящей личной исследовательской работой, автором самостоятельно проведен обзор литературы, осуществлен синтез изучаемых веществ, получены монокристаллические образцы, проведено физико-химическое исследование полученных соединений, анализ и интерпретация экспериментальных данных, выполнены квантово-химические расчеты и молекулярное моделирование взаимодействия соединений с целевым белком EGFR методом докинга.

На защиту выносятся:

1. Результаты физико-химического исследования полученных соединений методами ЯМР, ИК, электронной спектроскопии, рентгеноструктурного анализа.

2. Результаты квантово-химического моделирования электронного и пространственного строения лигандных систем и координационных соединений в рамках методов DFT (B3LYP/6-311++G(d,p)) и (B3LYP/6-311G(d)).

3. Результаты исследования фотохимической активности полученных соединений в растворах и способности образовывать комплексы с различными металлами в растворе.

4. Определение противораковой активности полученных соединений методами анализа цитотоксичности *in vitro*.

5. Исследования *in silico* полученных соединений, в том числе: прогнозирование фармакокинетики ADMET, лекарственного подобия, токсичности соединений и результаты молекулярного докинга соединений с ферментом EGFR.

Степень достоверности и апробация работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 11 публикациях, в том числе в пяти статьях в журналах, рекомендованных для опубликования основного содержания диссертационного исследования: «Russian Journal of General Chemistry», «Журнал структурной химии», «Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)», и «Журнал аналитической химии». Апробация результатов диссертационной работы было проведено на 6 конференциях: XVI Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе (2019); XVII Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе (2020), VI Всероссийская конференция «Химия: достижения и перспективы», Ростов-на-Дону (2021); VII Всероссийская конференция «Химия: достижения и перспективы», Ростов-на-Дону (2022); XVI Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии», г. Астрахань (2022), XIX Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе, (2022).

Поддержка. Исследования проводились при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 21-53-54007 Вьет-а).

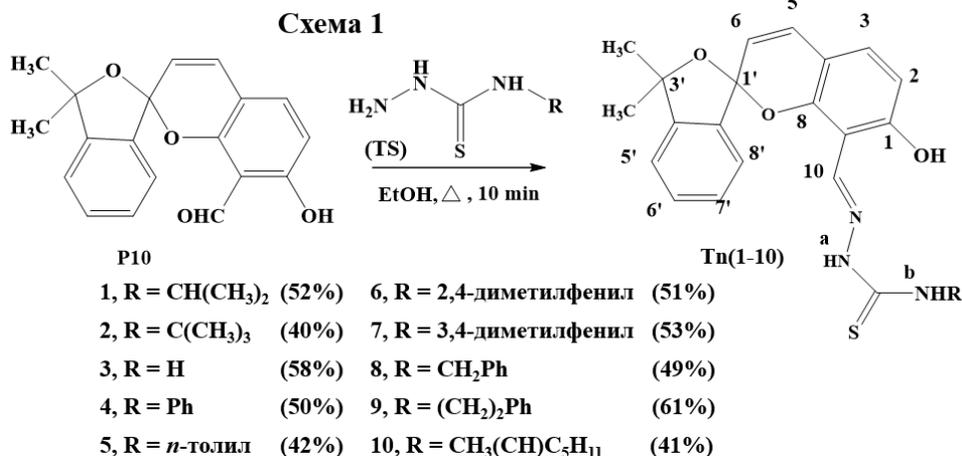
Структура и объем диссертации. Структура диссертации включает 171 страницу: введение, 3 главы, заключение, и приложение. Диссертация содержит 97 рисунков, 8 таблиц, 14 страниц приложений и 184 цитируемых литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез тиосемикарбазонов

7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида **P10** был синтезирован по методике, описанной в работе¹.

4-Замещенные тиосемикарбазиды **TS** были синтезированы по методике, описанной в работе². Тиосемикарбазоны **Tn(1–10)**



¹ А. О. Bulanov. A novel chelatofore functionalized spiroopyran of the 2-oxaindane series // Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications. – 2009. – Vol. 65. – No 12. – P. o618–o620.

² Y. Liu. Synthesis and biological activities of novel artemisinin derivatives as cysteine protease falcipain-2 inhibitors // Archives of pharmacal research. – 2012. – Vol. 35. – P. 1525–1531.

получали конденсацией спиропирана **P10** с 4-замещенными тиосемикарбазидами **TS(1–10)** (Схема 1). К раствору 1.00 ммоль 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида **P10** в 6 мл этанола приливали горячий раствор 1.00 ммоль соответствующего тиосемикарбазида **TS(1–10)** в 6 мл этанола, кипятили 10 мин и отфильтровывали.

Исследование строения

В ИК спектрах соединений **Tn(1–10)** проявляется характеристические полосы поглощения в области 3379–3420 см^{-1} соответствующие валентным колебаниям связей N–H. Также отмечается полоса поглощения валентных колебаний OH группы, которая проявляется в области 3219–3291 см^{-1} . Характерная для связи C=N полоса поглощения проявляется в области 1608–1619 см^{-1} . Валентные колебания C=S группы наблюдаются в области 1206–1275 см^{-1} и C–O группы (пиранового кольца) в районе 926–948 см^{-1} .

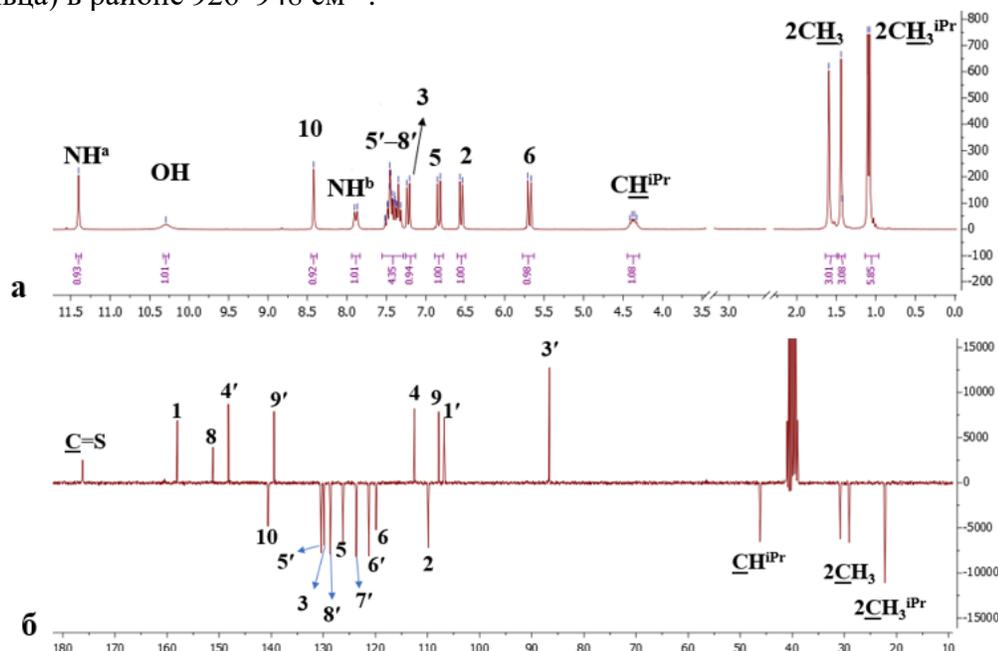


Рисунок 1. Спектры ^1H ЯМР (а) и ^{13}C ЯМР (б) тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) в $\text{DMSO}-d_6$.

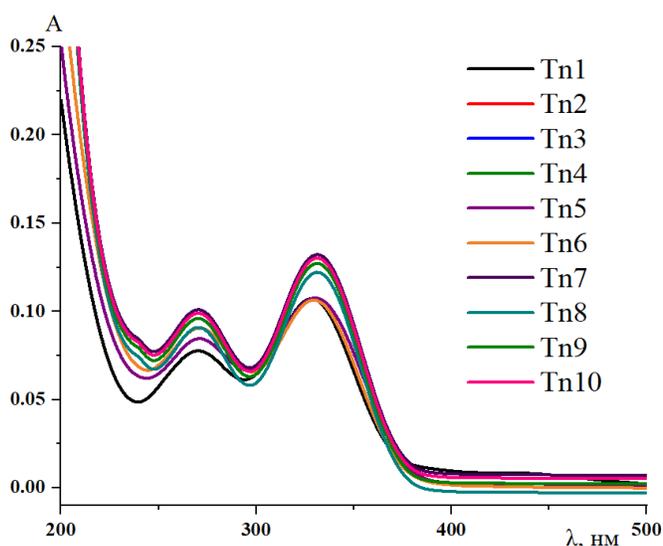


Рисунок 2. Электронные спектры поглощения растворов соединений **Tn(1–10)** в ацетонитриле, $\text{C} = 1.0 \times 10^{-5}$ М, $\text{T} = 293$ К.

В ^1H ЯМР спектрах соединений **Tn(1–10)** присутствуют сигналы, характерные для всех протонсодержащих группировок, соответствующих общей структуре тиосемикарбазонов. Было установлено, что в процессе реакции образуются тиосемикарбазоны **Tn(1–10)**, в которых спиропирановый фрагмент находится в циклической или “закрытой” форме, о чем свидетельствуют сигналы двух диастереотопных метильных групп гетаренового фрагмента молекулы, проявляющихся в виде двух трёхпротонных синглетов в области 1.44–1.47 и 1.59–1.66 м.д. Сигналы протона OH группы наблюдаются в виде уширенного синглетного сигнала в области 9.94–10.57 м.д. Протоны NH^a группы гидразонного фрагмента проявляются в виде

синглетных сигналов в области 11.33–11.87 м.д. Сигналы протонов H^5 и H^6 пиранового кольца обнаруживаются в виде дублетов (в области H^5 : 6.84–6.87 м.д. и H^6 : 5.69–5.73 м.д. соответственно) с характерной константой спин-спинового взаимодействия $J_{H^5-H^6} = 9.60\text{--}9.69$ Гц. Высокое значение константы свидетельствует о локализации двойной связи $C^5=C^6$. Сигналы протонов H^2 и H^3 обнаруживаются в виде дублета в области 6.54–6.59 и 7.22–7.26 м.д., с более низкими характеристическими константами спин-спинового взаимодействия H^2-H^3 ($J_{H^2-H^3} = 8.37\text{--}8.42$ Гц), что свидетельствует о меньшей двоесвязанности атомов $C^2=C^3$ за счет делокализации электронной плотности в циклическом фрагменте. Сигналы протонов бензольного кольца гетареновой части молекулы ($H^{5'}\text{--}H^{8'}$) наблюдаются в виде сложного перекрывающегося мультиплета в области 7.34–7.49 м.д. Спектр ^{13}C ЯМР соединений **Tn(1–10)** дает полное количество атомов углерода и имеет характерные сигналы, показывающие, что число атомов углерода и химический сдвиг пиков соответствуют тиосемикарбазонной структуре (рис. 1).

В электронных спектрах тиосемикарбазонов в растворе ацетонитрила (рис. 2) присутствуют две несимметричные полосы поглощения в области 250–300 и 310–375 нм. Отсутствие полос поглощения в видимой области свидетельствует о том, что в процессе реакции образуются тиосемикарбазоны, в которых спиропирановый фрагмент находится в циклической или “закрытой” форме. Влияние заместителя R на положение максимумов полос поглощения незначительно. Для тиосемикарбазона **Tn1** наблюдается небольшое поглощение в области 400–500 нм, что, вероятно,

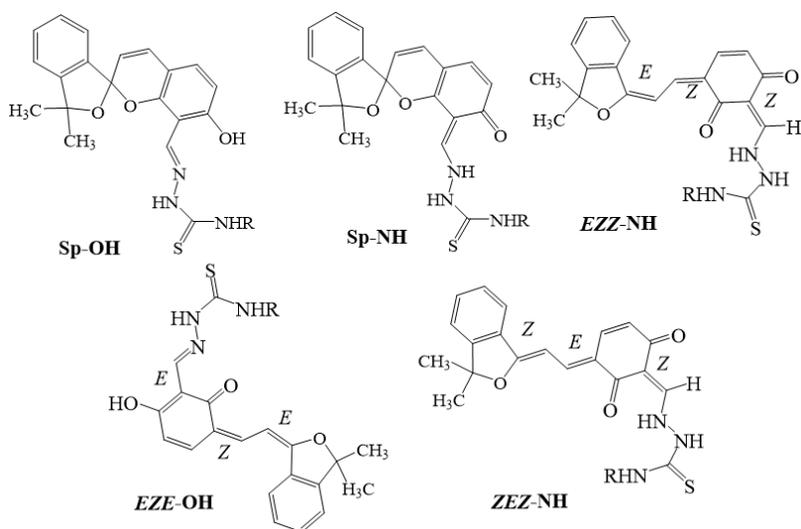


Рисунок 3. Структура изомерных форм тиосемикарбазонов

связано с наличием в растворе малой доли “открытой” изомерной формы соединения.

Исследуемые соединения способны образовывать различные изомерные структуры, наиболее устойчивые из них представлены на рис. 3. Для получения более точного представления об относительной стабильности возможных изомерных форм исследуемых соединений, мы провели детальное исследование электронной структуры изомеров соединений **Tn(1–10)** методом квантово-химического моделирования (DFT) (B3LYP/6

311++G(d,p)). Моделирование проводилось в газовой фазе и в растворе ДМСО, в рамках приближения непрерывной поляризуемой среды (PCM).

В газовой фазе “закрытая” форма тиосемикарбазонов Sp-OH, более стабильна, чем форма Sp-NH и “открытые” формы EZE, EZZ, ZEZ. Можно отметить увеличение стабильности “закрытой” формы Sp-OH по сравнению с “открытой” формой в растворе ДМСО для тиосемикарбазонов, содержащих алифатические заместители (в табл. 1). По данным расчетов, тиосемикарбазоны **Tn(4–7)**, содержащие ароматические углеводороды, непосредственно присоединенные к гидразидному фрагменту более устойчивы в “открытой” форме, что находится в противоречии с экспериментальными данными. Данное несоответствие может быть вызвано переоценкой вклада электростатического взаимодействия полярных мерацианиновых форм с растворителем в рамках модели непрерывной поляризуемой среды (PCM).

Таблица 1. Значение рассчитанной относительной стабильности (ккал/моль) изомерных форм тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** в газовой фазе и растворе ДМСО (B3LYP/6-311++G(d,p)).

Соед.	Sp-OH		Sp-NH		EZE-OH		EZZ-NH		ZEZ-NH	
	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО
Tn1	0.00	0.00	16.39	11.12	10.89	3.84	16.00	7.96	9.56	0.98
Tn2	0.00	0.00	10.89	8.75	11.23	3.24	12.63	4.18	9.17	0.38
Tn3	0.00	0.00	16.14	11.14	10.00	3.23	11.90	4.47	12.07	0.73
Tn4	0.00	0.68	11.20	9.94	10.63	4.34	12.32	5.60	6.01	0.00
Tn5	0.00	0.94	11.00	10.10	12.93	6.06	12.18	5.57	5.70	0.00
Tn6	0.00	1.15	17.06	12.36	10.65	4.84	12.14	5.85	5.18	0.00
Tn7	0.00	1.06	11.00	10.23	10.78	3.71	12.30	9.52	5.54	0.00
Tn8	0.00	0.00	10.75	8.74	10.51	3.74	11.65	4.44	9.13	0.77
Tn9	0.00	0.00	15.93	11.44	11.73	4.09	13.06	4.96	9.50	0.96
Tn10	0.00	0.00	10.82	8.59	13.77	5.25	16.24	8.14	8.89	0.40

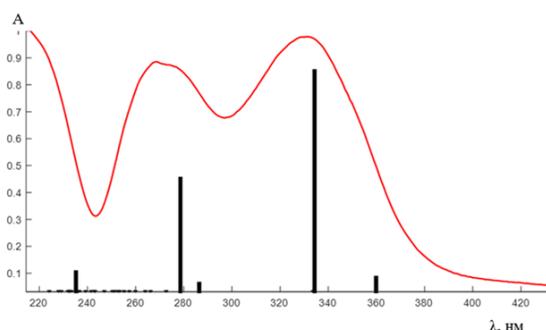


Рисунок 4. Экспериментальный (красная сплошная линия) и рассчитанный линейчатый (вертикальные линии) спектры тиосемикарбазона **Tn8**. Расчет методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)).

ВЗМО→НСМО π - π^* типа, характеризующийся небольшой интенсивностью (рассчитанные формы молекулярных орбиталей приведены на рис. 5). Наибольшую интенсивность имеет переход в области 334 нм, преимущественно определяемый возбуждением π - π^* типа ВЗМО-1→НСМО. Положение второй экспериментальной полосы поглощения определяется переходом в пятое возбужденное состояние, соответствующее одноэлектронному переносу ВЗМО→НСМО+1 в области 279 нм π - π^* типа.

Результаты квантово-химического расчета хорошо совпадают с характеристиками экспериментальных спектров поглощения тиосемикарбазонов.

Для рационализации спектральных свойств соединений были выполнены расчеты TD-DFT для тиосемикарбазонов (уровень теории B3LYP/6-311G(d)). Спектры поглощения тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** имеют схожий характер. На рисунке 4 для примера приведен экспериментальный спектр соединения **Tn8** (красная сплошная линия) и рассчитанный методом TD-DFT линейчатый спектр.

В экспериментальном спектре тиосемикарбазона **Tn8** присутствуют две интенсивные полосы поглощения с максимумами в области 272 и 330 нм. По результатам моделирования, наиболее длинноволновая полоса поглощения определяется двумя электронными переходами. В области 359 нм имеет место переход

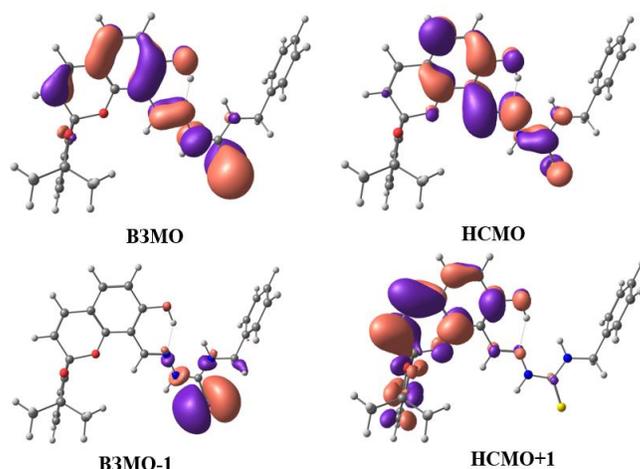
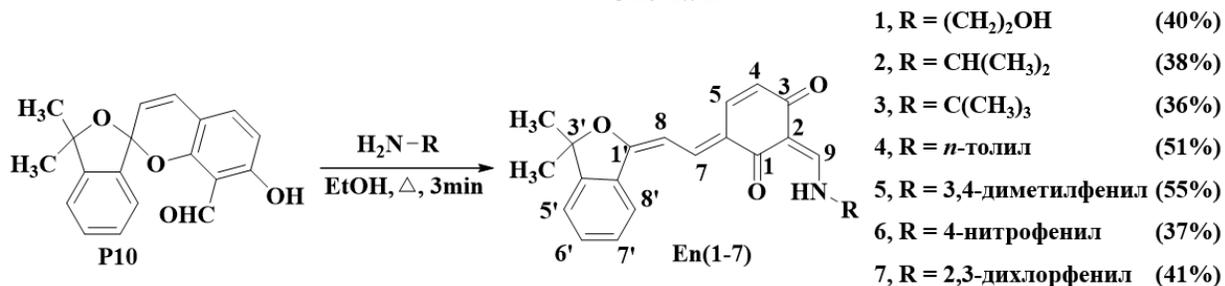


Рисунок 5. Граничные молекулярные орбитали изомера для тиосемикарбазона **Tn8** в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

2. Синтез енаминокетонов

Енаминокетоны **En(1–7)** получали конденсацией спиропирана (**P10**) с первичными аминами (Схема 2). К горячему раствору 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'-Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида **P10** (1.2 ммоль) в 5 мл этанола добавляли горячий раствор 1.2 ммоль соответствующего амина в 5 мл этанола. Раствор нагревали до точки кипения и кипятили с обратным холодильником в течение 3 минут. После медленного охлаждения выпадал красный осадок, который отфильтровывали и перекристаллизовывали из хлористого метилена.

Схема 2



Исследование строения

ИК-спектры образцов твердых порошков **En(1–7)** свидетельствуют об “открытой” изомерной структуре енаминокетонов из-за наличия характерного для валентных колебаний связи C=O поглощения в области 1640–1649 см⁻¹. Валентные колебания связи N–H смещены в сторону более низких частот и регистрируются в области 3047–3075 см⁻¹ за счет сильной внутримолекулярной водородной связи NH···O.

В спектрах ¹H ЯМР соединений **En(1–7)** в растворе ДМСО наблюдается суперпозиция нескольких перекрывающихся наборов сигналов с различной интенсивностью из-за динамических равновесий нескольких изомеров (рис. 6). Два набора сигналов являются наиболее интенсивными и относятся к изомерам, представленным на схеме 3 как *E* и *Z* изомеры относительно связи C²=C⁹.

Схема 3

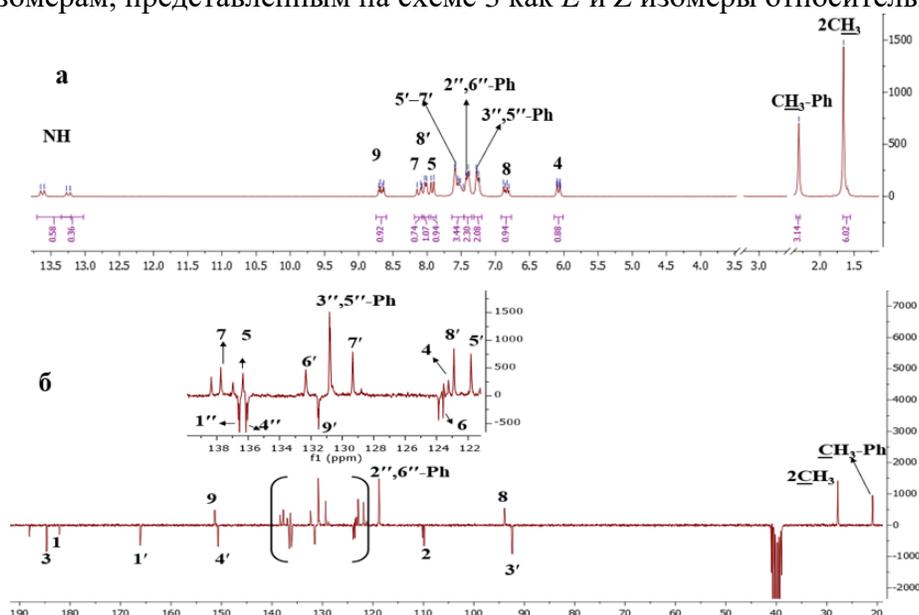
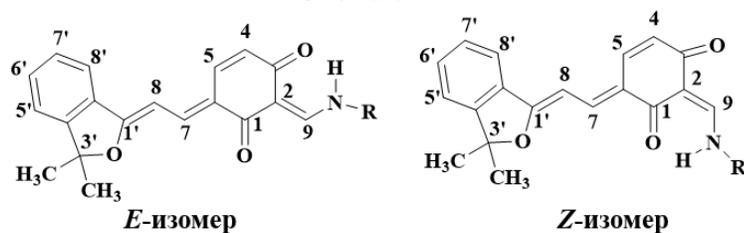


Рисунок 6. Спектры ¹H ЯМР (а) и ¹³C ЯМР (б) енаминокетона **En4** (R=*n*-толил) в ДМСО-*d*₆.

При проведении ^{13}C ЯМР исследований енаминокетонов было обнаружено, что количество сигналов атомов углерода превышает число атомов углерода в ожидаемой формуле, что подтверждает наличие изомеров в растворе ДМСО (рис. 6). Конформация *Z* вокруг двойной связи $\text{C}^8=\text{C}^{1'}$ подтверждается наличием кросс-пика между ядрами H^8 и $\text{H}^{8'}$ в спектрах ^1H - ^1H NOESY соединений. Конфигурацию *E* по отношению к двойной связи $\text{C}^6=\text{C}^7$ подтверждает наблюдение кросс-пика NOESY для пары ядер H^5-H^8 (рис. 7).

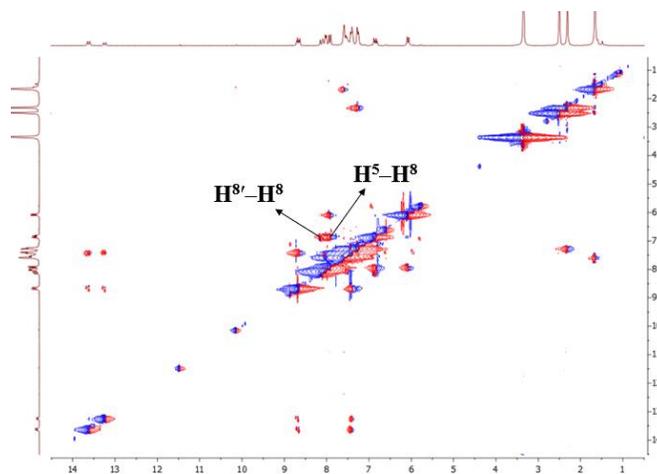


Рисунок 7. Спектр ^1H - ^1H NOESY енаминокетона **En4** ($\text{R}=\textit{n}$ -толил) в ДМСО- d_6 .

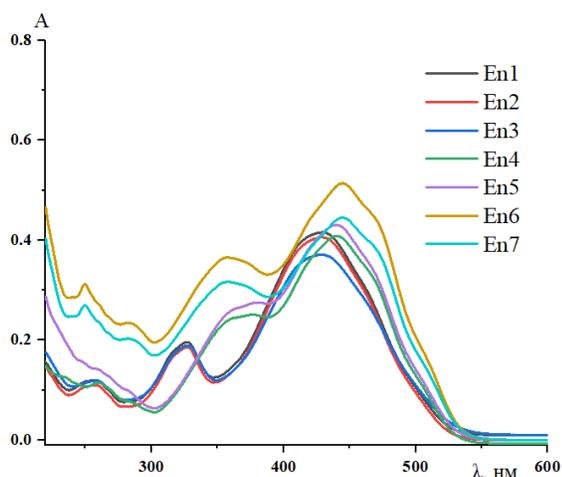


Рисунок 8. Электронные спектры поглощения растворов енаминокетонов в ацетонитриле, $\text{C} = 1.0 \times 10^{-5}$ М, $\text{T} = 293$ К.

В электронных спектрах поглощения енаминокетонов **En(1–7)** в растворе ацетонитрила (рис. 8) присутствуют высокоинтенсивные широкие асимметричные полосы поглощения в области 300–550 нм.

Модификация заместителя R приводит к небольшому сдвигу максимумов полос поглощения енаминокетонов. Для енаминокетонов **En(1–3)** – продуктов конденсации с алифатическими аминами, максимум поглощения располагается при 429 нм. В спектрах поглощения соединений **En(6, 7)**, содержащих электроноакцепторные заместители в фенильном фрагменте, появляются два пика поглощения при 355–356 и 443–444 нм. В то время

как соединения **En(4, 5)**, содержащих электронодонорные заместители в фенильном фрагменте, появляются два максимума поглощения при 365–366 и 434–439 нм. Наличие интенсивных полос поглощения в видимой области придает раствору енаминокетонов темно-красный цвет.

Исследуемые соединения могут образовывать большое разнообразие изомерных структур. Некоторые из наиболее важных структур для этого исследования и их условные обозначения показаны на рис. 9. Для более глубокого понимания относительной стабильности возможных изомерных форм синтезированных соединений проведено детальное исследование электронной структуры изомеров соединений **En(1–7)** методом DFT

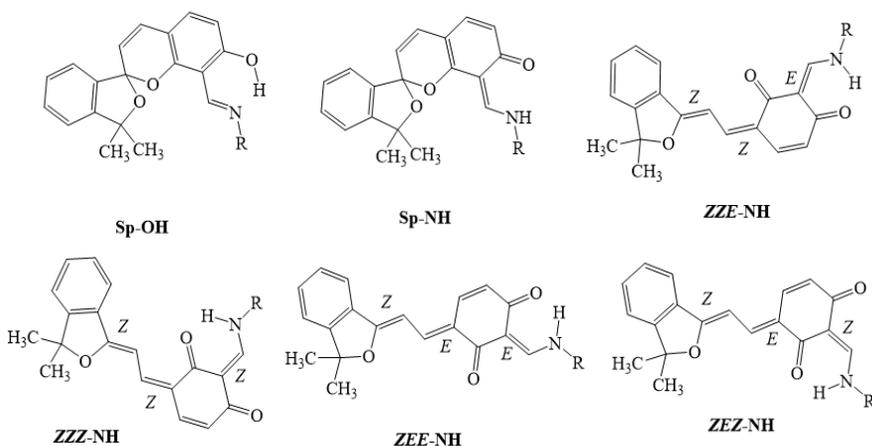


Рисунок 9. Изомеры енаминокетонов и их обозначения.

(B3LYP/6-311G(d)).

Рассчитанные для газовой фазы (с поправкой на энергию нулевых колебаний (ZPE)) и раствора ДМСО значения относительной стабильности изомерных форм **En(1–7)** приведены в таблице 2. Как с учетом, так и без учета эффектов сольватации для всех соединений предпочтительной оказывается енаминокетонная форма. Рассчитанная энергия дестабилизации спироизомеров значительно выше в растворе, чем в газовой фазе, за счет стабилизации более полярных енаминокетонов в полярном растворителе. Для спироизомеров в газовой фазе бензоеидный таутомер (Sp-OH) более стабилен, чем хиноеидный (Sp-NH), но в растворе ДМСО относительная стабильность обратная. В случае енаминокетонов, образующихся из ароматических аминов как в газовой фазе, так и в растворе ДМСО, изомеры типа Sp-OH более стабильны, чем Sp-NH.

Таблица 2. Значение рассчитанной относительной стабильности (ккал/моль) изомерных форм соединений **En(1–7)** в газовой фазе и растворе ДМСО (B3LYP/6 311++G(d,p)).

Сое д.	Sp-OH		Sp-NH		ZZE-OH		ZZZ-NH		ZEE-NH		ZEZ-NH	
	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО
En1	4.72	10.65	8.22	9.40	0.00	0.47	0.06	0.50	0.70	0.26	0.57	0.00
En2	5.37	11.10	7.81	9.43	0.00	0.71	0.39	0.47	0.80	0.25	0.66	0.00
En3	5.85	11.31	7.50	8.95	0.00	0.70	0.28	0.48	0.78	0.33	0.61	0.00
En4	4.93	9.70	7.74	9.74	0.00	0.32	0.44	0.51	0.95	0.32	0.83	0.00
En5	5.08	9.80	7.66	9.67	0.00	0.68	0.49	0.50	0.94	0.30	0.88	0.00
En6	4.99	9.33	8.61	10.38	0.00	0.47	2.90	2.67	1.00	0.24	0.98	0.00
En7	4.14	8.32	10.47	12.67	0.03	0.62	0.00	0.36	0.87	0.27	0.61	0.00

Спектры поглощения енаминокетонов **En(1–7)** (рис. 8) значительно отличаются от спектров соединений **Tn(1–10)** (рис. 2). В экспериментальных спектрах поглощения соединений **En(1–7)** наблюдается высокоинтенсивная несимметричная полоса поглощения в области 300–550 нм. Для рационализации спектральных свойств енаминокетонов были выполнены расчеты TD-DFT для соединений **En1** (уровень теории B3LYP/6-311G(d)). Наиболее интенсивные расчетные переходы для изомеров ZEE-NH и ZEZ-NH соединения **En1** и его экспериментальный спектр поглощения приведены на рисунке 10.

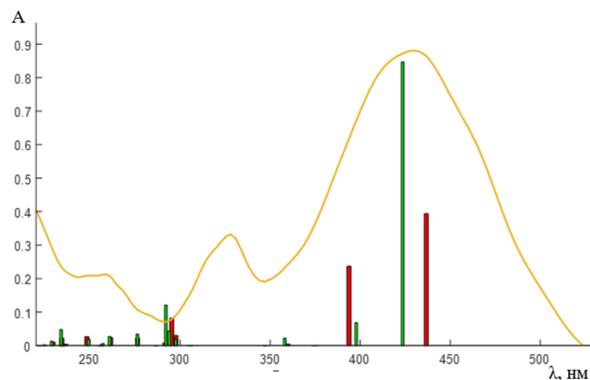


Рисунок 10. Экспериментальный (желтая сплошная линия) и линейчатый теоретический (вертикальные линии) спектры енаминокетона **En1**. Красные вертикальные линии – ZEE-NH, зеленые – ZEZ-NH изомер (соотношение интенсивностей 40:60, соответственно). Расчет методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)).

Рассчитанные формы молекулярных орбиталей изомеров *ZEZ-NH* и *ZEE-NH* приведены на рис. 11. Несимметричная форма полосы поглощения в области 300–550 нм определяется перекрыванием спектров поглощения двух изомерных форм. Наибольший вклад соответствует переходам ВЗМО→НСМО изомеров *ZEE-NH* – 437 нм и *ZEZ-NH* – 424 нм, которые относятся к π – π^* типу. Так же заметный вклад в форму экспериментальной полосы поглощения оказывает переход π – π^* типа в *ZEE-NH* и *ZEZ-NH* изомерах, соответствующий одноэлектронному возбуждению ВЗМО-1→НСМО. ВЗМО и НСМО делокализованы по изобензофурановым и циклогексадионовым фрагментам, связанным бутадиеновым линкером. ВЗМО-1 и НСМО+1 представляют собой π -орбитали, делокализованные по азометиновым и циклогексадионовым фрагментам (рис. 11). Таким образом, в “открытом” изомере енаминокетонов присутствуют две слабо взаимодействующие π -сопряженные системы, определяющие их спектры в видимой области.

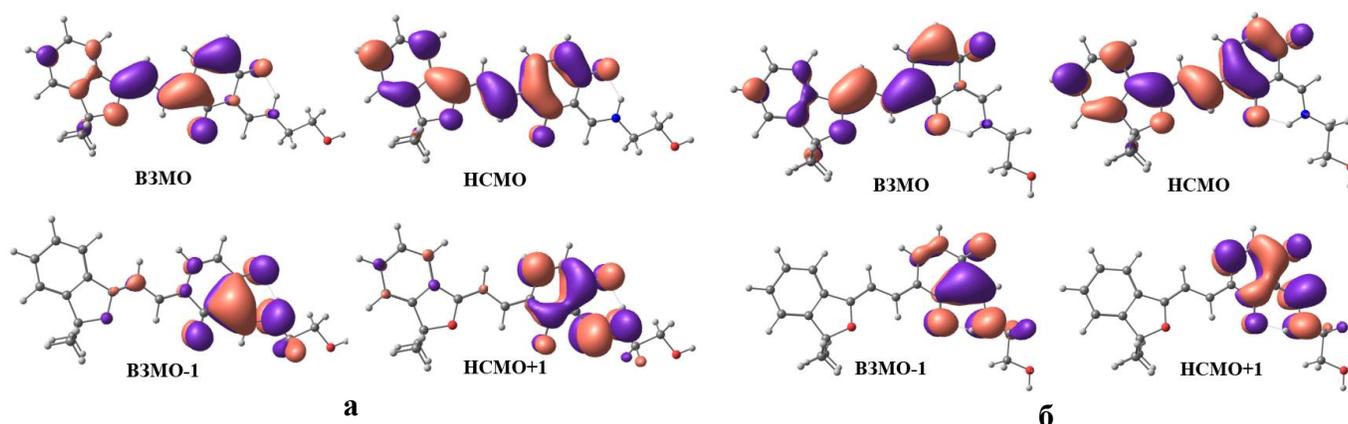


Рисунок 11. Граничные молекулярные орбитали изомеров *ZEE-NH* (а) и *ZEZ-NH* (б) для енаминокетона **En1** в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

Рентгеноструктурный анализ (РСА)

Монокристаллические образцы³ **En1** и **En5** были получены медленным упариванием метанольного раствора и использовались для исследования методом рентгеноструктурного анализа. Соединение **En1** кристаллизуется в триклинной пространственной группе с четырьмя симметрично независимыми молекулами в элементарной ячейке с близкой молекулярной геометрией. Молекулярная структура показана на рис. 12. Молекула **En1** в кристаллическом состоянии представляет собой енаминокетонный изомер и образует конформацию *ZEZ-NH*.

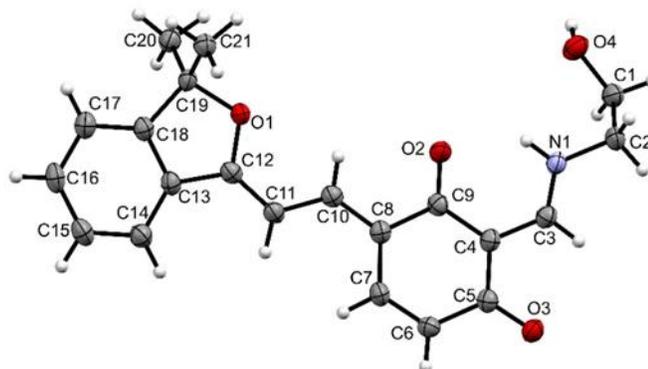


Рисунок 12. Строение молекулы соединения **En1** по данным РСА.

³ Рентгеноструктурный анализ проводился в НИЦ «Курчатовский институт», Москва.

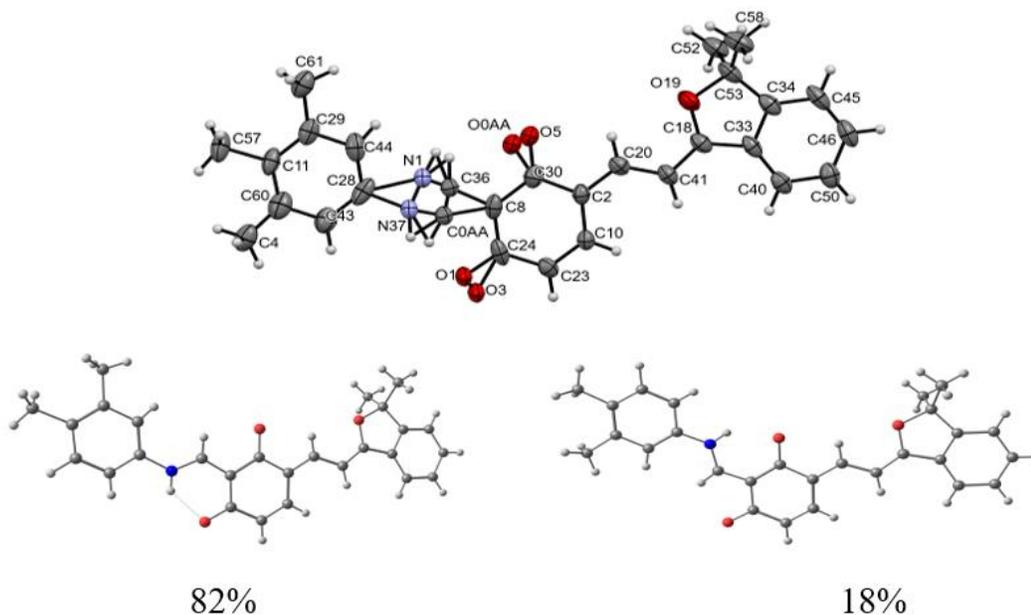


Рисунок 13. Вверху: строение молекулы соединения **En5** по данным РСА; внизу: строение молекул с заселенностями 82% и 18%.

Енаминокетонная изомерная форма наблюдается и в случае кристаллов соединения **En5**, однако кристаллическое строение этого соединения оказалось необычным (рис. 13). По полученным данным, в кристалле наблюдается структурная разупорядоченность с соотношением заселенностей 82:18, связанная с сосуществованием в кристаллической решетке двух конформеров енаминокетонной формы – *ZEE-NH* (заселенность 82%) и *ZEZ-NH* (заселенность 18%).

3. Исследование комплексообразования в растворе Тиосемикарбазоны

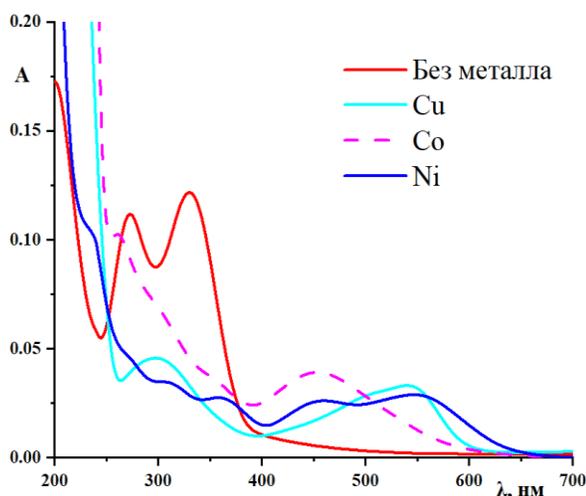


Рисунок 14. Спектры поглощения тиосемикарбазона **Tn4** $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М без и после добавления солей Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $T = 293$ К.

Фрагмент “N–NH–C=S” в производных тиосемикарбазонов может действовать как активный центр, образуя хелаты с ионами некоторых металлов. Для исследования комплексообразования в растворе ацетонитрила брали растворы тиосемикарбазонов с концентрацией $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М и добавляли десятикратный избыток соответствующей соли металла. Действительно, растворы тиосемикарбазонов в ацетонитриле имеют интенсивные полосы поглощения в области 250–370 нм. Добавление солей Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} приводит к темному окрашиванию растворов координационных соединений из-за появления новых полос поглощения в видимой области (400–650 нм). На рисунке 14 приведены спектры поглощения соединения **Tn4** после добавления перхлоратов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} .

С помощью методов квантовохимического моделирования были проведены расчеты

пространственного строения комплексного соединения Cu^{2+} с “закрытой” (SP) и двумя возможными “открытыми” (ZEZ и EZE) формами тиосемикарбазона **Tn4** в газовой фазе. Были рассмотрены две модели комплексообразования в соотношении L : М (лиганд : металл) = 1:1 и в соотношении 2:1. Оптимальные структуры и их относительные энергии приведены на рисунке 15.

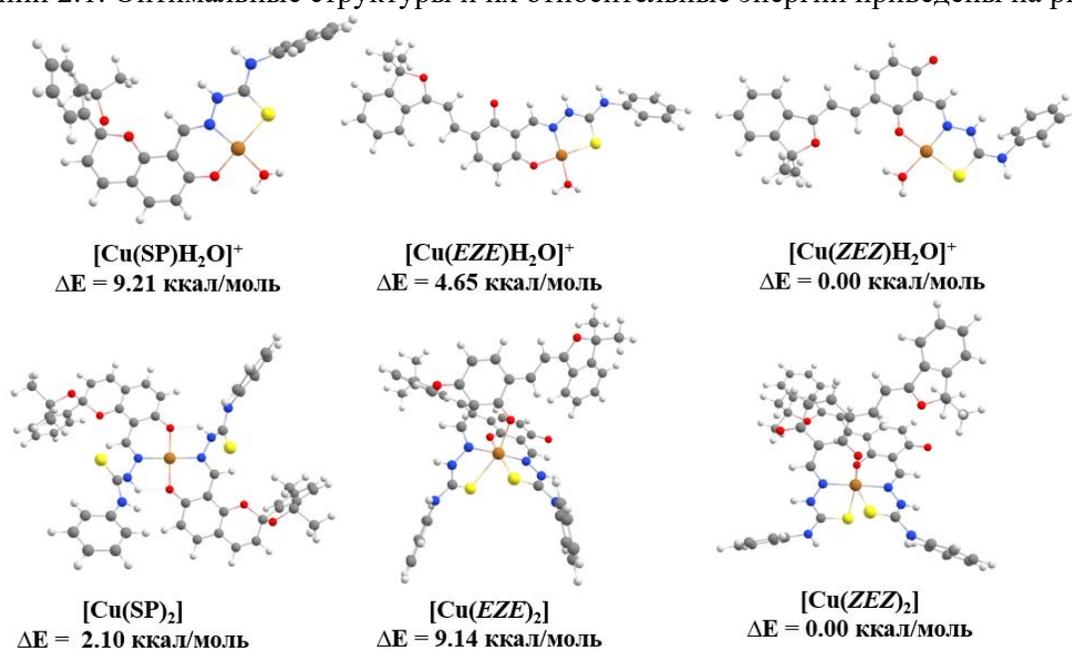


Рисунок 15. Оптимизированные модели DFT возможных сценариев комплексообразования между лигандом тиосемикарбазона **Tn4** и катионом Cu^{2+} в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

В обоих случаях, комплекс с лигандом, существующим в “открытой” изомерной форме типа ZEZ, отвечает наиболее устойчивой структуре соединения. Дестабилизация комплекса с SP-изомером составляет 9.21 ккал/моль для комплекса состава 1:1 и 2.10 ккал/моль для бис-хелатного комплекса.

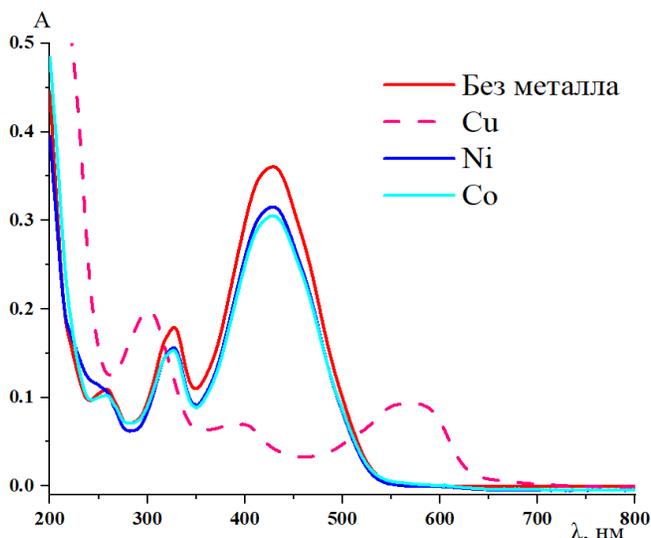


Рисунок 16. Спектры поглощения енаминокетона **En3** ($\text{R}=\text{C}(\text{CH}_3)_3$) $\text{C} = 1.0 \times 10^{-5}$ М без и после добавления ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в ацетонитриле, $\text{C} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $\text{T} = 293$ К.

Енаминокетоны

Исходный раствор енаминокетонов в ацетонитриле имеет красный цвет. Добавление солей меди вызывает углубленную окраску. Новые полосы поглощения находятся в видимой области спектра 500–650 нм за счет образования комплекса с ионами Cu^{2+} (рис. 16). Однако при добавлении к раствору енаминокетонов в ацетонитриле солей ионов металлов Co^{2+} и Ni^{2+} не наблюдалось появление новых полос поглощения, что свидетельствовало об отсутствии комплексообразования между енаминокетонами и ионами Co^{2+} и Ni^{2+} , либо о малой величине константы устойчивости соответствующих комплексов.

С помощью методов квантово-химического моделирования определили способность к образованию комплексов между енаминокетонами **En3** и ионами Cu^{2+} в

газовой фазе. Были также рассмотрены две модели комплексообразования. В первом случае, рассмотрим комплекс состава $[\text{Cu}(\text{En})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$: енаминокетон реагирует с ионами Cu^{2+} в соотношении 1:1. Координационная сфера иона меди достраивалась координацией двух молекул воды. Во втором случае рассматривался комплекс состава $[\text{Cu}(\text{En})_2]$. Согласно такой модели, две молекулы лиганда **En** окружают катион Cu^{2+} , образуя первую координационную сферу, содержащую два атома кислорода и два атома азота, характеризующуюся *транс*-плоскоквдратной формой (рис. 17).

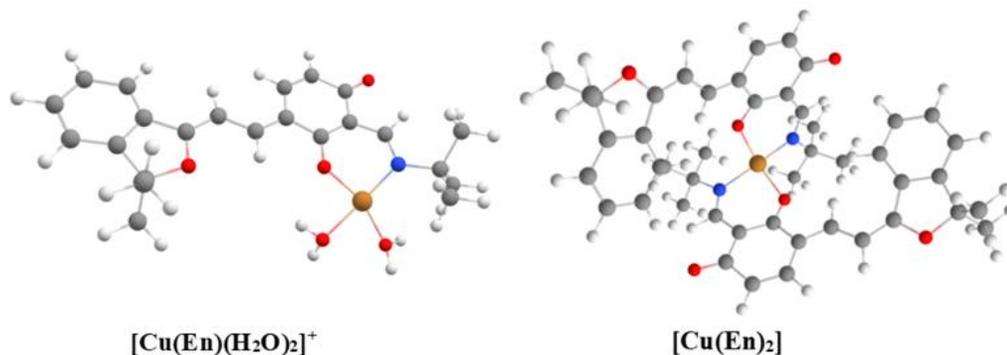


Рисунок 17. Оптимизированные модели DFT двух возможных сценариев комплексообразования между енаминокетонами **En3** и ионами Cu^{2+} (B3LYP/6-311G(d)).

Таким образом, тиосемикарбазоны хорошо взаимодействуют с ионами металлов Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} . Взаимодействие с ионами металлов протекает по гидразонному фрагменту и сопровождается раскрытием пиранового кольца с образованием “открытой” МС формы, сдвигая спектр поглощения тиосемикарбазонов в область видимого света. Среди исследованных ионов металлов енаминокетоны взаимодействуют только с ионами Cu^{2+} .

4. Фотохромные свойства соединений

Для анализа фотохимических свойств, были изучены тиосемикарбазоны **Tn1**, **Tn8** и енаминокетоны **En(1, 2; 4–7)** в растворе ацетонитрила. Фотохимическая активность была зарегистрирована для тиосемикарбазонов **Tn1**, **Tn8** и енаминокетонов **En1**, **En2**.

Тиосемикарбазоны **Tn1** и **Tn8**

Таблица 3. Спектрально-кинетические свойства тиосемикарбазонов в ацетонитриле при 293 К.

Соед.	R	$\lambda_{\text{max}}^{\text{SP}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MC}}$, нм	τ_{MC} , с
Tn1	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	268(18.1); 328 (25.4)	450	70.7
Tn8	CH_2Ph	270(23.1); 325 (20.4)	486	15.6

В электронных спектрах поглощения соединения **Tn1**, **Tn8** наблюдаются полосы поглощения в области 250–370 нм. После облучения светом при $\lambda = 365$ нм наблюдается значительное смещение полос в спектре поглощения (проявляющееся в диапазоне 400–600 нм), с изменением окраски раствора с бесцветного на красный. Это объясняется образованием мероцианиновой формы МС, связанной с разрывом связи $\text{C}_{\text{spiro}}-\text{O}$. Исходные два ортогональных фрагмента становятся компланарными, и вся молекула образует большую π -сопряженную систему.

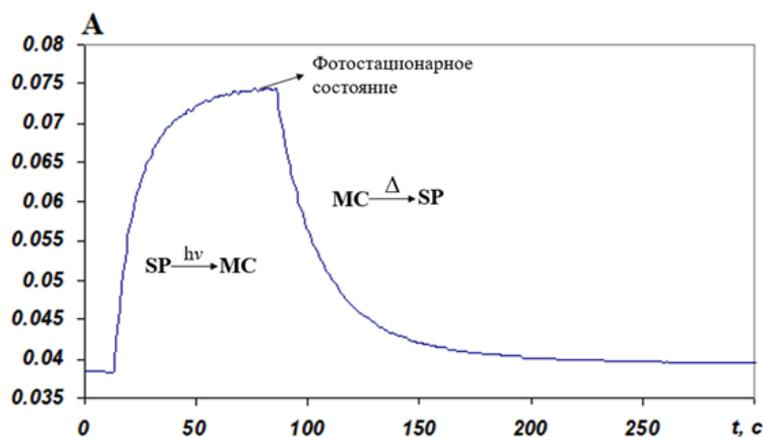


Рисунок 18. Кинетическая кривая фотоокрашивания и темновой релаксации фотоиндуцированной формы раствора тиосемикарбазона **Tn8** на длине волны 485 нм.

фотохромизмом. Облучение раствора енаминокетонов **En1**, **En2** видимым светом при $\lambda = 436$ нм сопровождается уменьшением интенсивности полосы поглощения в области длинных волн. После прекращения облучения наблюдается восстановление интенсивности этой полосы (см. рис. 19). Это свидетельствует об фотохимическом образовании “закрытой” (SP) изомерной формы и последующем образовании “открытой” (MC) формы в процессе темновой релаксации. Это свидетельствует об обратимости изомеризации между изоформами MC и SP в случае енаминокетонов **En1**, **En2**.

Двухэкспонентная кинетика процесса темновой релаксации может объясняться протеканием двух элементарных химических реакций – 1,5-сигматропного переноса протона (более быстрая стадия) и последующего процесса образования пиранового цикла (более медленная стадия). Скорость быстрого процесса определяется временем 17.2–22.3 с, характеристическое время второго процесса – значительно больше, 222.1–301.5 с (в табл. 4). Спектр поглощения енаминокетона **En1** при облучении светом с $\lambda = 436$ нм и после прекращения облучения и динамика изменений оптической плотности в максимуме поглощения в ходе облучения представлены в рисунках 19 и 20.

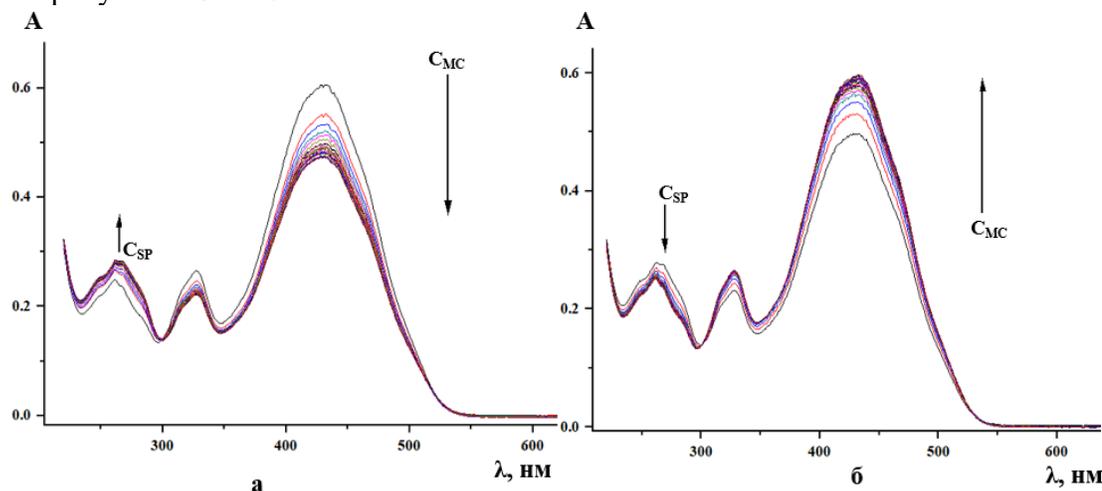


Рисунок 19. Спектры поглощения енаминокетона **En1** в ацетонитриле при облучении светом с $\lambda = 436$ нм (а) и после прекращения облучения (б).

Соединения **Tn1**, **Tn8** характеризуются положительным (прямым) фотохромизмом, значением времени жизни фотоиндуцированного изомера, составляющим 70.7 и 15.6 с соответственно (в табл. 3). Кинетическая кривая фотоокрашивания и темновой релаксации фотоиндуцированной формы раствора тиосемикарбазона **Tn8** на длине волны 485 нм представлены на рисунке 18. Динамика изменения спектра поглощения тиосемикарбазона **Tn8** в ацетонитриле показывает, что тиосемикарбазон **Tn8** является обратимой фотохромной системой.

Енаминокетоны

Енаминокетоны **En1**, **En2** обладают отрицательным

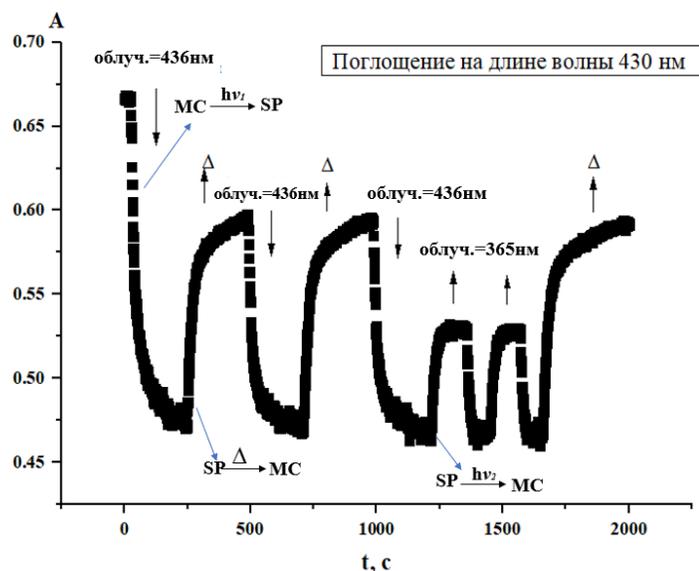


Рисунок 20. Динамика изменений оптической плотности в максимуме поглощения енаминокетона **En1** в ацетонитриле в ходе облучения (436, 365 нм).

Таблица 4. Спектрально-кинетические свойства енаминокетонов в ацетонитриле при 293 К.

Соед.	R	λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ_1 , с	τ_2 , с
En1	(CH ₂) ₂ OH	261(17.1); 328(20.9); 429(49.8)	17.2	301.5
En2	CH(CH ₃) ₂	259(7.4); 326(13.9); 429(31.1)	22.3	222.1
En4	<i>n</i> -толил	434(39)	-	-
En5	3,4-диметилфенил	437(45.1)	-	-
En6	4-нитрофенил	444(40.5)	-	-
En7	2,3-дихлорфенил	249(10.6); 443(30.5)	-	-

Обратная реакция раскрытия спироцикла может протекать как под действием облучения на длине волны 365 нм, так и за счет термической тепловой релаксации. Происходящий процесс изображен на рисунке 21.

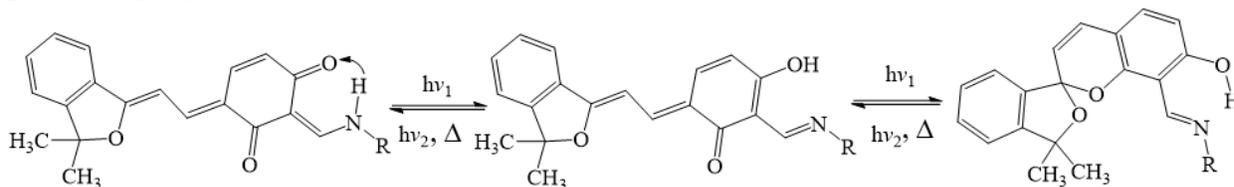


Рисунок 21. Фотохимическое превращение енаминокетонов **En1** и **En2**.

Таким образом, тиосемикарбазоны проявляют прямой фотохромизм, а для енаминокетонов характерен отрицательный фотохромизм.

5. Изучение *in vitro* противораковой активности

Для синтезированных соединений была изучена цитотоксическая активность *in vitro* в отношении четырех типичных раковых клеточных линий человека: гепатоцеллюлярной карциномы (Hep-G2), карциномы молочной железы (MCF-7), рака легких (A549), и плоскоклеточной карциномы полости рта (KB). Результаты представлены в таблице 5. В качестве эталона сравнения использовали эллиптицин.

Таблица 5. Антипролиферативная активность тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En** (IC₅₀: Концентрация полумаксимального ингибирования, μM).

Соед.	R	IC ₅₀ (μM)			
		Hep-G2	MCF-7	KB	A549
Tn1	CH(CH ₃) ₂	14.00±0.10	16.00±0.53	2.43±0.06	3.69±0.09
Tn2	C(CH ₃) ₃	96.00±3.12	10.57±0.34	1.43±0.04	3.45±0.09
Tn3	H	40.62±4.01	28.47±1.75	20.00±1.30	-
Tn5	<i>n</i> -толил	15.33±0.21	20.17±0.82	1.92±0.07	1.84±0.06
Tn6	2,4-диметилфенил	44.97±1.24	18.96±0.78	1.77±0.06	3.04±0.08
Tn8	CH ₂ Ph	21.50±1.18	8.00±0.12	3.45±0.08	4.36±0.09
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	17.23±0.65	14.86±0.32	3.44±0.07	4.27±0.08
En1	(CH ₂) ₂ OH	47.27±3.63	39.89±1.47	-	-
En2	CH(CH ₃) ₂	13.11±0.91	10.60±0.84	-	-
En3	C(CH ₃) ₃	22.88±1.56	17.28±0.87	-	-
En5	3,4-диметилфенил	20.46±0.64	61.39±2.03	13.38±0.43	20.29±0.67
En6	4-нитрофенил	>128	>128	100.57±30.11	118.86±3.62
En7	2,3-дихлорфенил	126.11±0.80	>128	26.21±0.81	48.00±1.65
	Эллиптицин*	0.45±0.04	0.46±0.03	0.21±0.01	0.41±0.02

[*] Положительный контроль.

Результаты⁴ показали, что тиосемикарбазоны проявляют заметную цитотоксическую активность в отношении протестированных линий раковых клеток. Обнаружено, что по сравнению с четырьмя протестированными клеточными линиями, большинство исследуемых веществ оказывают наилучшее противораковое действие на две клеточные линии: клетки рака легких (A549) и клетки плоскоклеточной карциномы полости рта (KB). Так, для тиосемикарбазона **Tn2** концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) по отношению к клеткам KB составила 1.43 μM, а по отношению к клеткам A549 – 3.45 μM; для тиосемикарбазона **Tn5** IC₅₀(KB) = 1.92 μM и IC₅₀(A549) = 1.84 μM. По отношению к линии KB хорошую активность продемонстрировало соединение **Tn6**. Наименьшая активность по отношению к линии KB оказалась у тиосемикарбазона **Tn3**.

Изученные енаминокетоны **En(1–7)** показали значительно меньшую антипролиферативную активность в сравнении с тиосемикарбазонами для всех клеточных линий.

6. Прогнозирование фармакокинетики и прогноз токсичности (ADMET)

Исследуемые соединения прошли предиктивный анализ *in silico*. По его результатам были спрогнозированы параметры ADMET (всасывание, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность). Помимо этого, проводилась оценка рисков побочных эффектов – мутагенных и онкогенных.

Данные ADMET указывают на то, что для этих соединений прогнозируется хорошее всасывание в кишечнике человека (HIA = 90.10–97.20%)⁵. Согласно результатам, представленным в таблице 6, видно, что соединения соответствуют всем правилам лекарственного подобия (правилу Липински и правилу Вебера), ни для одного из них не наблюдается нарушение более

⁴ Эксперименты по анализу противоопухолевой активности соединений проводились в лаборатории прикладной биохимии Химического института и Биологического института, Вьетнамской академии наук и технологий.

⁵ Расчёты HIA и прогноз токсичности были выполнены с использованием онлайн программы PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>).

одного критерия ADMET⁶. А именно: согласно правилу Липински, молекулярная масса ≤ 500 , количество акцепторов водородной связи a-acc ≤ 10 , количество доноров водородных связей a-don ≤ 5 , коэффициент распределения октанол/вода LogP ≤ 5 . Также, согласно правилу Вебера, число вращающихся связей b-rotN не превышает 10, а площадь полярной поверхности TPSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$.

Таблица 6. Прогнозируемые ADMET-свойства тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En**.

Соед.	M ^[a]	TPSA ^[b]	b-rotN ^[c]	a-acc ^[d]	a-don ^[e]	logP ^[f]	L.V ^[g]	V.V ^[h]	HIA ^[i]
Tn1	423.53	107.20	5	4	3	3.77	+	+	94.29
Tn2	437.55	107.20	5	4	3	3.98	+	+	94.49
Tn3	381.45	121.19	3	4	3	2.85	+	+	93.57
Tn4	457.54	107.20	5	4	3	4.33	+	+	95.43
Tn5	471.57	107.20	5	4	3	4.67	+	+	95.56
Tn6	485.60	107.20	5	4	3	4.96	+	+	95.69
Tn7	485.60	107.20	5	4	3	4.96	+	+	95.69
Tn8	471.57	107.20	6	4	3	4.30	+	+	95.62
Tn9	485.60	107.20	7	4	3	4.57	+	+	95.75
Tn10	479.63	107.20	9	4	3	5.09	+	+	95.06
En1	351.40	75.63	4	4	2	2.64	+	+	94.27
En2	349.42	55.40	3	3	1	3.69	+	+	96.08
En3	363.45	55.40	3	3	1	3.94	+	+	96.16
En4	397.47	55.40	3	3	1	4.39	+	+	96.70
En5	411.49	55.40	3	3	1	4.80	+	+	96.78
En6	428.44	101.22	4	5	1	3.42	+	+	90.10
En7	452.33	55.40	3	3	1	5.20	+	+	97.20

^[a]Молекулярная масса, г/моль; ^[b]Площадь топологической полярной поверхности, \AA ; ^[c]Количество вращающихся связей; ^[d]Количество акцепторов водородной связи; ^[e]Количество доноров водородной связи; ^[f]Логарифм коэффициента распределения соединения между *n*-октанолом и водой; ^[g]Соответствие правилу Липинского; ^[h]Соответствие правилу Вебера; ^[i]Всасывание в кишечнике человека, % (0–20%: плохое, 20–70%: умеренное, 70–100%: хорошее).

Результаты исследования токсичности⁵ показали, что тиосемикарбазоны не являются ни мутагенными, ни канцерогенными и обладают умеренным ингибированием гена специфических калиевых каналов сердца hERG (за исключением **Tn3**, который сильно ингибирует hERG). Тиосемикарбазоны **Tn4**, **Tn8**, **Tn9**, хотя и не вызывают мутации, но классифицируются как неоднозначные молекулы в тесте ингибирования hERG. Это означает, что есть две возможности: во-первых, молекула может ингибировать hERG; а вторая заключается в том, что молекула не представляет опасности для hERG.

Большинство енаминокетонов не являются мутагенными, но являются канцерогенными и обладают умеренным ингибирующим потенциалом в отношении hERG.

7. Моделирование методом молекулярного докинга

Для интерпретации противораковых свойств изученных соединений был проведен молекулярный докинг соединений с активным центром рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). EGFR – трансмембранный белок, принадлежащим к семейству рецепторных ингибиторов

⁶ TPSA, a-acc, a-don, b-rotN, LogP и оценка нарушений правил Липински и Вебера проводили с использованием программного обеспечения SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

тирозинкиназы ErbB. Его избыточная экспрессия приводит к неконтролируемому делению клеток и связана с развитием широкого спектра опухолей.

Энергия связи и характер связывания соединений с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) по сравнению с эрлотинибом были рассчитаны с помощью метода молекулярного докинга⁷. Кристаллографическая структура целевого белка была получена из Protein DataBank (идентификатор PDB: 4HJO, разрешение 2.75 Å)⁸.

Таблица 7. Молекулярный докинг-анализ стыковки белка-мишени EGFR с тиосемикарбазонами **Tn** и енаминокетонами **En** в сравнении с эрлотинибом.

Соед.	S ^[a]	Водородные связи	l ^[b] , (Å)	C–H…π связи	l, (Å)
Tn1	-9.88	Asp831, Thr766	2.86, 3.81	-	-
Tn2	-10.45	Asp831, Cys773	2.94, 3.99	Arg871	3.90
Tn3	-8.13	Asp831, Asp831	3.00, 3.04	Val702	4.34
Tn4	-9.78	Asn818, Asp831, Arg817	3.37, 3.29, 3.66	Val702	4.25
Tn5	-10.26	Thr830, Lys721	2.90, 3.64	-	-
Tn6	-9.22	Gly772	3.42	Gly772	3.67
Tn7	-8.97	Arg817	3.05	Lys721	3.54
Tn8	-10.07	Asn818, Asp831	3.19, 2.94	-	-
Tn9	-9.24	Asp831	3.64	Val702	4.15
Tn10	-8.41	Thr830, Lys721	2.82, 3.91	-	-
En1	-8.36	Met742, Lys721	3.71, 3.30	Arg817	4.19
En2	-8.32	Cys773, Met769	3.85, 3.14	-	-
En3	-7.97	Thr766	2.81	-	-
En4	-8.49	Met769	2.98	Arg817	4.21
En5	-8.65	Met769	2.99	Arg817	4.20
En6	-8.51	Lys721	3.34	Arg817	3.79
En7	-8.62	Met769	2.97	Arg817	4.23
Эрлотиниб	-11.86	Met769, Cys773	1.96, 2.00	Leu694	3.23

^[a]Энергия связи, ккал/моль; ^[b]Длина связи, Å.

Результаты молекулярного докинга свидетельствуют, что тиосемикарбазоны проявляют более сильное ингибирующее действие, образуя более прочные комплексы с активным центром домена тирозинкиназы EGFR, чем енаминокетоны. Энергии связи этих соединений лежат в диапазоне от -8.13 до -10.45 ккал/моль (в табл. 7). Например, на рис. 22 показана конформация соединения **Tn5** в комплексе с белком EGFR. Соединение **Tn5** (энергия связи -10.26 ккал/моль) образует две водородные связи с аминокислотными фрагментами: NH-группа гидразонного фрагмента взаимодействует с атомом кислорода аминокислоты треонина (остаток Thr830, длина водородной связи $l = 2.90$ Å) и C=S-группа тиосемикарбазона является акцептором водородной связи C=S…H–C с лизином (остаток Lys721, $l = 3.64$ Å).

⁷ Энергия связи и природа связывания соединений с EGFR были определены с помощью программного комплекса МОЕ 2014.09.

⁸ <https://www.rcsb.org/structure/4HJO>.

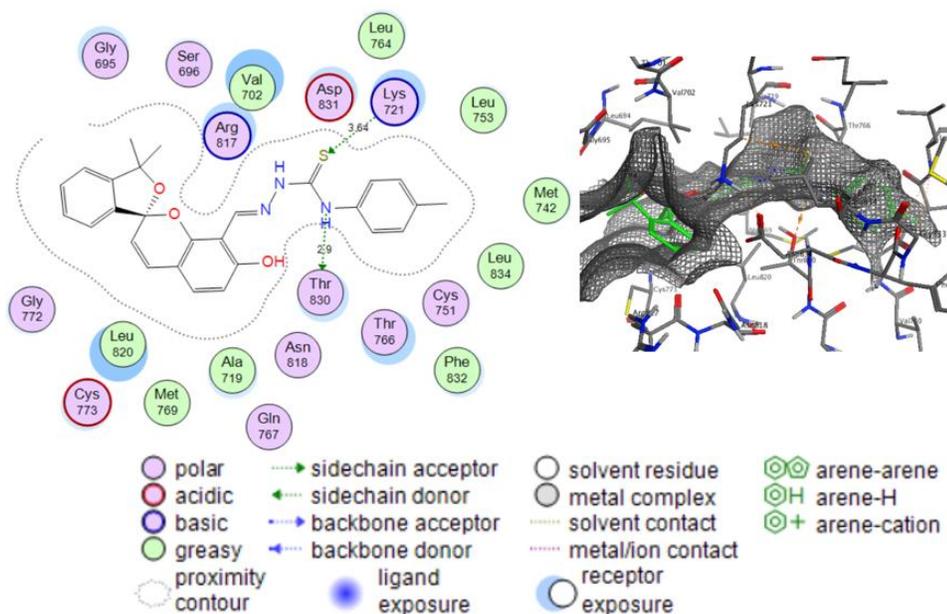


Рисунок 22. Конформация тиосемикарбазона **Tn5** в комплексе с рецептором EGFR.

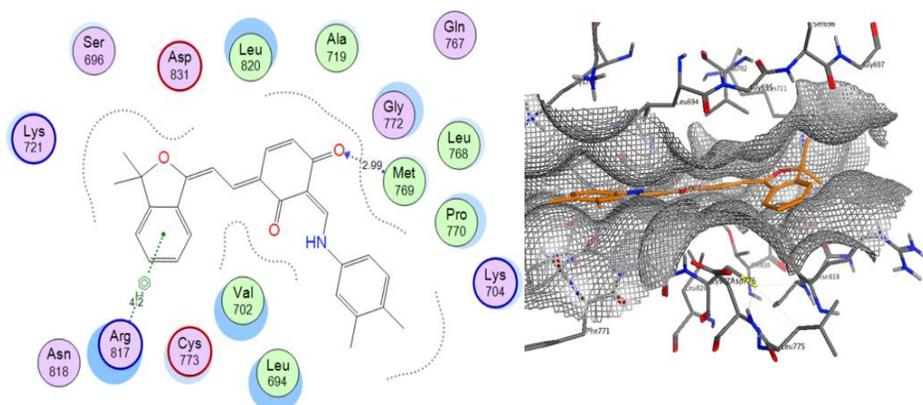


Рисунок 23. Природа взаимодействия енаминокетона **En5** с рецептором EGFR.

В общем, для енаминокетонов **En(1–7)** энергия связи, вычисленная с помощью молекулярного докинга, заметно меньше, чем у тиосемикарбазонов, что хорошо коррелирует с меньшей биологической активностью этой группы соединений. Енаминокетон **En5** обладает наибольшим связыванием ($S = -8.65$ ккал/моль) с рецептором EGFR. Это соединение взаимодействует с

четырнадцатью аминокислотами по типу Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и образует одну водородную связь между экзоциклическим атомом кислорода енаминакетона и NH группой метионина (остаток Met769, $l = 2.99$ Å). Кроме того, существует взаимодействие $\pi \cdots \text{H}-\text{C}$ типа между CH группой аминокислоты (Arg817, $l = 4.20$ Å) и ароматическим кольцом енаминокетона (рис. 23).

8. Оценка корреляции между энергией связи (S) и биологической активностью

Была оценена корреляция между энергией связи S , вычисленной с помощью молекулярного докинга, и биологической активностью тиосемикарбазонов. Исследования показали, что существует корреляция между энергией связи, вычисленной с помощью процедуры молекулярного докинга, и противораковыми свойствами изученных тиосемикарбазонов, а именно, величиной отрицательного логарифма концентрации полумаксимального ингибирования по отношению к клеточной линии рака KB (коэффициент корреляции $r = 0.84$). Энергия связывания, рассчитанная с помощью процедуры молекулярного докинга, и биологическая активность тиосемикарбазона по

отношению к клеточной линии рака MCF-7 в меньшей степени коррелируют друг с другом (коэффициент корреляции $r = 0.69$) (рис. 24).

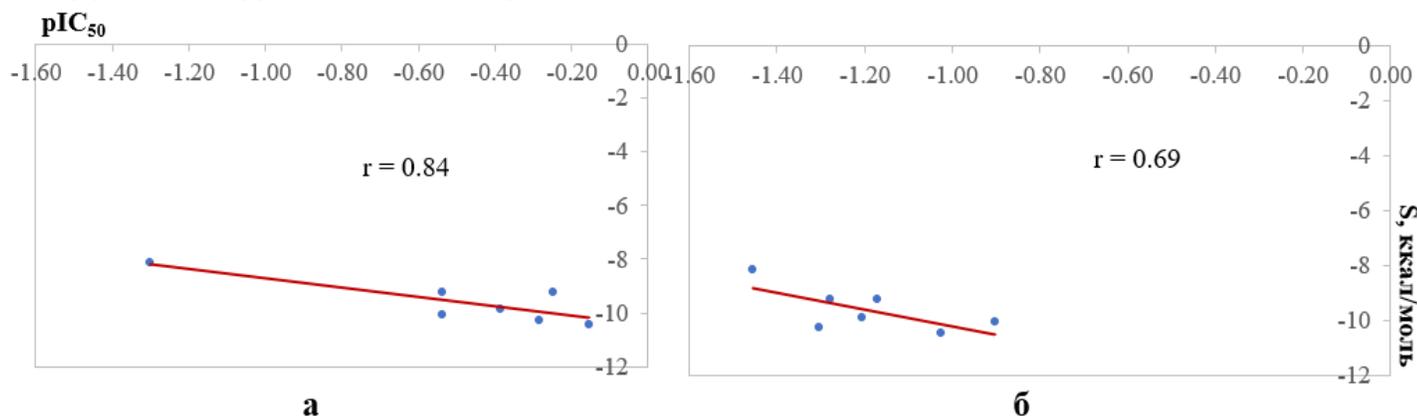


Рисунок 24. Корреляция между энергией связи S (ккал/моль) и $pIC_{50} = -\lg(IC_{50})$ для тиосемикарбазонов по отношению к раковой клеточной линии KB (а) и MCF-7 (б).

Таким образом, было показано, что результаты изучения *in vitro* противораковой активности к клеточной линии рака KB и MCF-7 согласуются с результатами модели докинга производных тиосемикарбазонов с рецептором EGFR. Это косвенно свидетельствует о правильном выборе белка-мишени, который определяет антипролиферативную активность тиосемикарбазонов в случае линий раковых клеток KB и MCF-7.

9. Использование тиосемикарбазона Tn8 для аналитического обнаружения аминокислот

Соединение Tn8 оказалось перспективным аналитическим реагентом для количественного определения концентрации L-глутатиона. Были изучены⁹ электронные спектры поглощения растворов тиосемикарбазона Tn8 в ацетонитриле с концентрацией 5.0×10^{-5} М в присутствии различных низкомолекулярных аминотиолов – L-глутатиона (GSH), L-цистеина (Cys), L-гомоцистеина (Hcy), L-глицина (Gly), и L-метионина (Met) при pH = 7.4 (использовали трис-HCl буферный раствор). Полученные спектры приведены на рисунке 25.

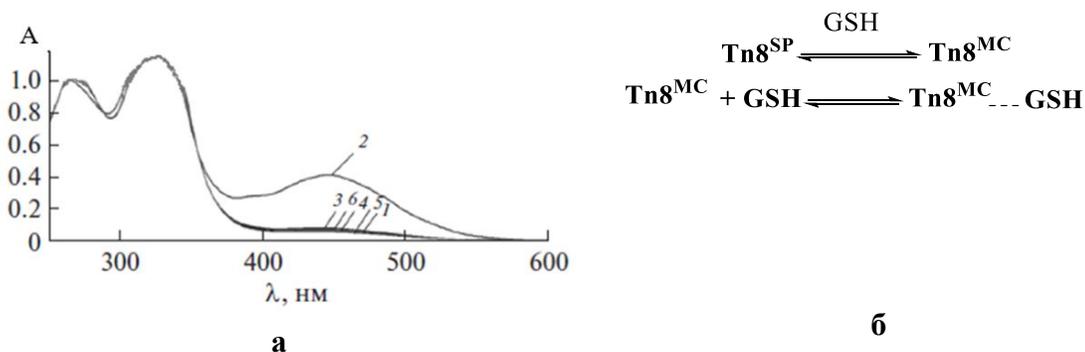


Рисунок 25. Электронные спектры поглощения (а) раствора тиосемикарбазона Tn8 в ацетонитриле (5.0×10^{-5} М) в отсутствие (1) и в присутствии 1.0×10^{-3} М аминотиолов GSH (2), Cys (3), Hcy (4), Gly (5) и Met (6). Схема комплексообразования тиосемикарбазона Tn8 в присутствии GSH (б).

⁹ А. А. Щербатых. Спиропираны на основе бензофуранового фрагмента как аналитические реагенты на низкомолекулярные аминотиолы // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78. – № 2. – С. 151–158.

В присутствии L-глутатиона (GSH) наблюдается значительное увеличение оптической плотности раствора в длинноволновой области спектра 360–550 нм. При этом присутствие остальных аминокислот в растворе не приводит к спектральным изменениям соединения в этой области. Увеличение поглощения в области 360–550 нм определяется формированием молекулярного комплекса L-глутатиона с мероцианиновой изомерной формой тиосемикарбазона **Tn8**. Процесс реакции тиосемикарбазона **Tn8** с GSH изображен на рисунке 25. Кинетика процесса изомеризации соответствует реакции первого порядка. Чувствительность реакции и предел обнаружения GSH в присутствии **Tn8** (1.0×10^{-4} М) определяли путем измерения оптической плотности ацетонитрильных растворов при различной концентрации GSH (в интервале 5.0×10^{-7} – 1.0×10^{-4} М) в буфере с pH = 7.4. Увеличение оптической плотности при длине волны 450 нм происходит пропорционально увеличению концентрации глутатиона в растворе. Это позволяет оценить константу устойчивости комплекса **Tn8**^{MC}...GSH ($\beta = 1.05 \times 10^6$ М⁻¹). Параметры градуировочной функции представлены в табл. 8.

Таблица 8. Параметры градуировочной функции для спектрофотометрического определения L-глутатиона в присутствии тиосемикарбазона **Tn8**.

Коэффициенты градуировочных зависимостей			с _{мин} , М
K	b	r	
3.9×10^4	1.2	0.956	1.2×10^{-7}

r: коэффициент корреляции, с_{мин}: предел обнаружения.

Константа устойчивости комплекса **Tn8**^{MC}...GSH весьма велика, что позволяет использовать **Tn8** как аналитический реагент при спектрофотометрическом определении L-глутатиона, даже в присутствии ряда других аминокислот.

Заключение

1. Реакция 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с рядом тиосемикарбазидов, ароматических и алифатических первичных аминов показала возможность получения на их основе новых полидентантных лигандных систем.
2. Продукты взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с тиосемикарбазидами существуют в спиропирановой изомерной форме. Продукты взаимодействия с аминами существуют в “открытой” мероцианиновой форме в виде плоских енаминокетонов.
3. Изучение комплексообразующих свойств соединений в растворе показало, что полученные соединения обладают способностью взаимодействовать с ионами переходных металлов, у которых комплексообразование с ионами Cu²⁺ происходит лучше всего. Для енаминокетонов взаимодействие с ионами Ni²⁺, Co²⁺ не наблюдалось. Ионы переходных металлов вызывают изомеризацию бесцветной “закрытой” формы тиосемикарбазонов в кольцевую окрашенную форму с “открытыми” формами.
4. Тиосемикарбазоны **Tn1** (R=CH(CH₃)₂) и **Tn8** (R=CH₂Ph) проявляют обратимые фотохромные свойства, для енаминокетонов **En1** (R=(CH₂)₂OH), **En2** (R=CH(CH₃)₂) характерен обратный фотохромизм.
5. L-Глутатион (GSH) образует прочный молекулярный комплекс с “открытой” изомерной формой тиосемикарбазона **Tn8**. Разработаны спектрофотометрическая и кинетическая методики аналитического определения L-глутатиона с применением **Tn8** в качестве реагента.
6. Полученные соединения подвергали скринингу в отношении четырех типичных линий раковых клеток человека, включая клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7, клетки рака печени

Нер-G2, рака легких A549, и плоскоклеточной карциномы полости рта KB. Тиосемикарбазоны обладают значительной антипролиферативной активностью в отношении всех линий раковых клеток, особенно клеток карциномы KB и клеток рака легкого A549. Соединения **Tn2**, **Tn5**, **Tn6**, и **Tn8** могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования антираковой активности. Для енаминокетонов антипролиферативная активность оказалась низкой.

7. Методом молекулярного докинга показано, что тиосемикарбазоны характеризуются большими по абсолютной величине значениями энергии связывания с рецептором EGFR (pdb id: 4HJO) по сравнению с енаминокетонами, причем наибольший вклад в энергию связи вносит образование водородных связей между тиосемикарбазонным фрагментом и аминокислотными остатками белка-мишени.

8. Установлена корреляция между величиной энергии связи тиосемикарбазонов с рецептором EGFR (pdb id: 4HJO) и противораковыми свойствами по отношению к линиям клеток KB и MCF-7. Более высокие по абсолютной величине значения энергии связывания тиосемикарбазонов согласуются с их большей цитотоксической активностью по сравнению с енаминокетонами.

Список публикаций автора по теме диссертации.

Статья индексируется в базе Scopus:

1. **Nguyen X. T.** Study of the Schiff Base to Enamine-Ketone Rearrangement upon Condensation of Formyl Functionalized 2-Oxaindane Series Spiropyran with Aliphatic Amines / **X. T. Nguyen**, A. O. Bulanov, V. V. Lukov, G. Borodkin, T. T. T. Nguyen, L. D. Tran, H. D. Vu, B. N. Duong, V. A. Lazarenko, I. N. Shcherbakov // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93. – № 1. – P. 215–226. – DOI 10.1134/S1070363223010267.

2. **Нгуен С. Т.** Енаминокетоны – функциональные производные на основе 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида и замещенных ароматических аминов. Физико-химическое исследование и биологическая активность / **С. Т. Нгуен**, А. А. Зантман, А. О. Буланов, Ч. Т. Т. Нгуен, Л. Д. Чан, Х. Д. Ву, Б. Н. Зыонг, В. А. Лазаренко, И. Н. Щербаков // Журнал общей химии. – 2023. – Т. 93. – № 5. – С. 670–683 – DOI 10.31857/S0044460X23050037 [Англ. версия: Enaminoketones: Functional Derivatives Based on 7-Hydroxy-3',3'-dimethyl-3'H-spiro[chromen-2,1'-isobenzofuran]-8-carbaldehyde with Aromatic Amines. Physicochemical Studies and Biological Activity / X. T. Nguyen, A. A. Zantman, A. O. Bulanov, T. T. T. Nguyen, L. D. Tran, H. D. Vu, B. N. Duong, V. A. Lazarenko, I. N. Shcherbakov // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93. – № 5. – P. 1028–1039. – DOI 10.1134/S1070363223050031].

3. Казачкова В. И. О взаимовлиянии изомерии спиропиран-мероцианин и металлокоординации в комплексах 3d-металлов функционализированного спиропирана 2-оксаинданого ряда / В. И. Казачкова, **С. Т. Нгуен**, А. О. Буланов, А. А. Цатурян, Л. Д. Чан, И. Н. Щербаков // Журнала структурной химии. – 2023. – Т. 64. – № 8. – С. 114649. – DOI 10.26902/JSC_id114649 [Англ. версия: Interrelation Between the Spiropyran-Merocyanine Isomerism and the Metal Coordination in 3d Metal Complexes of a Functionalized Spiropyran of the 2-Oxaindane Series / V. I. Kazachkova, S. T. Nguyen, A. O. Bulanov, A. A. Tsaturyan, L. D. Chan, I. N. Shcherbakov // Journal of Structural Chemistry. – 2023. – Vol. 64. – № 8. – P. 1492–1503. – DOI 10.1134/S0022476623080139].

4. Щербатых А. А. Спиropyраны на основе бензофуранового фрагмента как аналитические реагенты на низкомолекулярные аминотиолы / А. А. Щербатых, О. И. Аскалепова, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, **С. Т. Нгуен** // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78. – № 2. – С. 151–158. – DOI: 10.31857/S0044450223010127 [Англ. версия: Benzofuran Spiropyrans as Analytical Reagents for Low-Molecular-Weight Amino Thiols / A. A. Shcherbatykh, O. I. Askalepova, A. O. Bulanov, I. N. Shcherbakov, S. T. Nguyen // Journal of Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 78. – № 2. – P. 200–206. – DOI 10.1134/S1061934823010112].

Статья в журнале из Перечня ВАК

5. **Нгуен С. Т.** Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность тиосемикарбазонов на основе 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида / **С. Т. Нгуен**, А. А. Зантман, А. О. Буланов, Ч. Т. Т. Нгуен, Л. Д. Чан, Х. Д. Ву, Б. Н. Зыонг, И. Н. Щербаков // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2023. – Т. 91. – № 65. – С. 60–64. – DOI 10.36807/1998-9849-2023-65-91-60-64.

В сборниках трудов конференций

6. Буланов А. О. Новые производные 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2Н-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] / А. О. Буланов, **С. Т. Нгуен**, Ю. П. Туполова, Т. С. Колесникова, Р. Г. Арустамова // Спектроскопия координационных соединений : тезисы докладов XVI Международной конференции, г. Туапсе, 16–21 сентября 2019 г. – Краснодар : Кубанский государственный университет, 2019. – С. 115.

7. **Нгуен С. Т.** Новые производные 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2Н-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] / **С. Т. Нгуен**, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, К. В. Токмакова // Спектроскопия координационных соединений : сборник научных трудов XVII Международной конференции, г. Краснодар, 10–13 сентября 2020 г. – Краснодар: Кубанский государственный университет, 2020. – С. 316.

8. **Тхи Н. С.** Новые енаминокетоны, производные спиропиранов оксаинданового ряда и алифатических аминов / **Н. С. Тхи**, А. О. Буланов, В. В. Луков // Химия: достижения и перспективы : сборник научных статей по материалам VI Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Ростов-на-Дону, 21–22 мая 2021 г. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2021. – С. 669.

9. **Нгуен С. Т.** Синтез, строение свойства новых тиосемикарбазонов, производных спиропирана ряда 3,3-диметил [2Н-1-безопиран-2,1-[2]-оксаиндана] / **С. Т. Нгуен**, А. О. Буланов // Химия: достижения и перспективы : сборник научных статей по материалам VII Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти д.х.н. В.В. Лукова, Ростов-на-Дону, 19–21 мая 2022 г. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2022. – С. 573–574.

10. **Нгуен С. Т.** Синтез, строение свойства новых тиосемикарбазонных производных 3,3-диметил [2Н-1-безопиран-2,1-[2]-оксаиндана] / **С. Т. Нгуен**, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, А. А. Зантман // Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии : материалы XVI Международной научно-практической конференции, г. Астрахань, 26–28 апреля 2022 г. / под общей редакцией Л. А. Джигола. – Астрахань : Астраханский государственный университет имени В. Н. Татищева, 2022. – С. 21–22.

11. **Нгуен С. Т.** Тиосемикарбазоны-производные 4-замещенных тиосемикарбазидов и 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида / **С. Т. Нгуен**, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, В. А. Казачкова // Спектроскопия координационных соединений «Сборник научных трудов XIX Международной конференции», Туапсе, 18–23 сентября 2022 г. – Краснодар : Кубанский государственный университет, – С. 113.