

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



Буравченко Галина Игоревна

**Синтез и биологическая активность новых производных
хиноксалин 1,4-диоксида**

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре органической химии ФГБОУ ВО РХТУ им. Менделеева и в лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе

Научный руководитель д.х.н., профессор РАН Щекотихин Андрей Егорович

Официальные оппоненты:

Доктор химических наук,
профессор, заслуженный деятель
науки РФ
Зык Николай Васильевич

Профессор кафедры органической химии
Химического факультета
Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова

Доктор химических наук,
Ферштат Леонид Леонидович

Заведующий лабораторией
азотсодержащих соединений Института
органической химии им. Н.Д. Зелинского
РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «11» ноября 2022 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета РХТУ.1.4.01 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на сайте https://muctr.ru/university/departments/ods/inhouse/inhouse_announcements/.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
РХТУ.1.4.01



Чепцов Д.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Химия *N*-оксидов гетероциклических соединений – одно из динамично развивающихся направлений органического синтеза. Высокий биологический потенциал хиноксалин 1,4-диоксидов определяет перспективы их использования для целенаправленной разработки лекарственных средств различных фармацевтических групп, а также обуславливает актуальность проведенного исследования и его научную значимость. Хиноксалин 1,4-диоксиды являются многообещающим классом для разработки новых лекарственных средств для лечения бактериальных инфекций, туберкулеза, малярии, трипаносомоза, лейшманиоза и амёбиаза. Некоторые производные запатентованы как противомикробные препараты и используются в сельском хозяйстве в качестве промоторов роста животных. Дальнейшее исследование химических свойств этого класса соединений и изучение роли структурных фрагментов в биологических свойствах необходимо для создания лекарственных препаратов с улучшенными фармакологическими свойствами.

Степень разработанности темы. Несмотря на то что хиноксалин 1,4-диоксиды являются сравнительно хорошо изученным классом соединений, методология получения их водорастворимых производных не была разработана ранее, что не позволило оценить их биологические свойства и, в частности, противоопухолевый потенциал этого перспективного хемотипа противоопухолевых веществ.

Цель работы – разработка новых направлений химической модификации хиноксалин 1,4-диоксидов, перспективных для получения биологически активных производных этого класса.

Для достижения поставленной цели запланировано решение следующих **задач**:

- 1) изучение региоселективности реакции Бейрута между монозамещенными бензофуросанами и СН-кислотами;
- 2) исследование реакций галогенопроизводных хиноксалин 1,4-диоксида с аминами;
- 3) разработка схем получения серий хиноксалин 1,4-диоксидов, содержащих заместители в положениях 2, 3, 6 и 7 гетероцикла, и синтез производных, обладающих приемлемой растворимостью в водных средах;
- 4) оценка биологических свойств полученных хиноксалин 1,4-диоксидов и выявление роли структурных фрагментов в их способности индуцировать гибель опухолевых, бактериальных или клеток протистов.

Научная новизна.

1. Выявлено, что региоселективность реакции Бейрута определяется электронными эффектами заместителей в бензофуросане: электронодонорные группы приводят к образованию 7-замещенных продуктов, в то время как в случае сильных электроноакцепторов преобладают 6-изомеры. Получен и охарактеризован ряд ранее

неизвестных 6-замещенных хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов.

2. Разработан оригинальный подход к синтезу 7-амино-6-галогенохиноксалин 1,4-диоксидов, для реализации которого предложена препаративная схема синтеза ранее неизвестных 5-аминобензофуроксанов. Выявлена региоселективность гетероциклизации 5-аминопроизводных бензофуроксана с бензоилацетонитрилом и 1-ацил-3,3,3-трифторацетонами, приводящая к 7-аминохиноксалин 1,4-диоксидам.
3. Обнаружена высокая региоселективность нуклеофильного ароматического замещения атомов галогенов аминами в положении 6 и/или 7 6,7-дигалогенозамещенных хиноксалин 1,4-диоксидов, определяемая электроноакцепторными свойствами заместителей в положении 2 и 3 гетероцикла.
4. Синтезирована серия 6(7)-аминопроизводных хиноксалин 1,4-диоксида с вариацией заместителей в положении 2, 3, 6 и 7 гетероциклического кольца, обладающих высокой растворимостью в водных средах.
5. Получено более 100 производных, подавляющих рост опухолевых и бактериальных клеток. Выявлены производные, преодолевающие множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток, связанную с экспрессией трансмембранного эффлюксного транспортера Р-гр. Изучена роль структурных фрагментов и их расположения в хиноксалиновом ядре в биологических свойствах полученных производных, варьирование которых позволяет модулировать спектр биологической активности и их действие на гипоксические сигнальные пути в опухолевых клетках.
6. Выявлена селективная гипоксическая цитотоксичность ряда соединений, обусловленная способностью ингибировать экспрессию и активность гипоксия-индуцируемого фактора HIF-1 α , а также индуцировать апоптоз опухолевых клеток в условиях гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в разработке схем синтеза серии новых биологически активных производных хиноксалин 1,4-диоксида, в получении данных о региоселективности реакций гетероциклизации бензофуроксанов, описании химических свойств хиноксалин 1,4-диоксидов, новых способов их химической модификации и идентификации методом ^{13}C ЯМР спектроскопии. Выявленные в работе связи «структура–активность», а также структурные особенности функциональных групп, важные для проявления биологической активности, будут способствовать дальнейшему развитию направленного синтеза химиотерапевтических средств. Найден ряд соединений, обладающих селективной цитотоксичностью в отношении злокачественных клеток в условиях гипоксии, а также высокой активностью в отношении опухолевых линий с МЛУ. Отобраны соединения-лидеры с улучшенными фармакологическими свойствами для дальнейшего углубленного доклинического изучения.

Методология и методы исследования. Методы, использованные в диссертационной работе, представлены в экспериментальной части и позволяют воспроизвести разработанные методики синтеза; физико-химические и спектральные характеристики новых производных приведены в полном объеме.

Положения, выносимые на защиту:

- Соотношение изомерных продуктов в реакции Бейрута между монозамещенными бензофуроксанами с бензоилацетонитрилом и 1-ацил-3,3,3-трифторацетонами зависит от электронных эффектов заместителей в ядре бензофуроксана; доказательство строения полученных изомеров;
- Региоселективное замещение атомов галогенов аминами в положении 6 и/или 7 в 6,7-дигалогенозамещенных хиноксалин 1,4-диоксидах определяется электроноакцепторными эффектами заместителей в положении 2 и 3 гетероциклического ядра; результаты исследования физико-химических и спектральных характеристик таких производных;
- Метод синтеза ранее неизвестных 7-амино-6-галогенохиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов.
- Данные о связи структура-активность для серии новых производных хиноксалин 1,4-диоксида и их действии на внутриклеточные мишени.

Степень достоверности результатов. Структура всех соединений подтверждена методами физико-химического анализа: ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-ионизация), ИК- и УФ-спектроскопии. Чистота соединений, переданных для биологических испытаний, подтверждена методом ВЭЖХ и составляла >95%. Полученные экспериментальные данные о региоселективности нуклеофильного замещения подтверждены квантово-химическими расчетами, выполненными с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31G(d). Положение заместителей в региоизомерных хиноксалин 1,4-диоксидах было доказано методами PCA, а также двумерной ЯМР спектроскопии HSQC и CIGAR.

Апробация работы. Результаты научно-исследовательской работы доложены и обсуждены на ряде конференций, включая: Зимнюю конференцию молодых ученых по органической химии «WSOC-2017» (Красновидово, 2017); Научно-практические конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2017-2019); 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Казань, 2017); XXV Международную научную конференцию студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); V Всероссийскую конференцию по органической химии (Владикавказ, 2018); International molecular medicine symposium by the Bosphorus (Istanbul, Turkey, 2019); The IV and V International Scientific Conference «Advances in Synthesis and

Complexing» (Москва, 2017 и 2019); VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (Афины, Греция, 2019); VI Междисциплинарную конференцию «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, 2020); II Научную конференцию молодых ученых «Актуальные исследования в фармакологии» (Москва, 2021).

Публикации. Результаты диссертационной работы представлены в 6 научных статьях, индексируемых в международных изданиях и рекомендованных ВАК и 30 докладах конференций, включая 10 тезисов, опубликованных в журналах *Annals of oncology*, *ESMO Open*, *FEBS OpenBio* (WoS, Scopus), а также в Российском биотерапевтическом журнале и Успехах молекулярной онкологии (РИНЦ, RSCI). По результатам работы получено 2 патента РФ.

Личный вклад автора состоял в анализе литературных данных, синтезе целевых соединений и установлении их строения; анализе и обработке полученных результатов, а также обсуждении и интерпретации результатов тестирования биологической активности; подготовке публикаций по теме исследования; формулировании выводов работы.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам, принимавшим участие в исследовании физико-химических и биологических свойств полученных соединений: д.х.н. Королеву А.М., к.х.н. Лузикову Ю.Н., к.х.н. Быкову Е.Е., к.х.н. Соловьевой С.Е., к.х.н. Деженковой Л.Г., к.б.н. Грамматиковой Н.Э., к.х.н. Иванову И.В., Малютиной Н.М., Борунову А.М. (ФГБНУ «НИИНА»), к.б.н. Щербакову А.М. (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»), д.х.н. Корлюкову А.А. (ИНЭОС РАН), к.б.н. Маслову Д.А. (ИОГен РАН), проф. Monzote L. (Institute of Tropical Medicine 'Pedro Kouri', Cuba, Havana), проф. Zhang T. (Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, China).

Отдельные этапы работы выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-33-90186, № 18-53-34005 и грантов РНФ № 20-13-00402, 21-45-00018.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка работ, опубликованных автором. Общий объем работы 269 страниц, включая 31 рисунок, 30 таблиц, библиографию из 192 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Широкий спектр биологической активности хиноксалин 1,4-диоксидов говорит о перспективности разработки новых лекарственных препаратов с улучшенными свойствами на их основе. Обзор литературы выявил, что известные на сегодняшний день методы модификации хиноксалин 1,4-диоксидов ограниченно применимы для синтеза расширенной серии соединений этого ряда. Кроме того, анализ данных

литературы позволил определить перспективные направления для синтетических работ, важнейшим из которых ставилась стратегия введения заместителей, содержащих солеобразующие аминогруппы, в структуру хиноксалин 1,4-диоксида с вариацией функциональных групп в положениях 2, 3 и 6(7) гетероцикла.

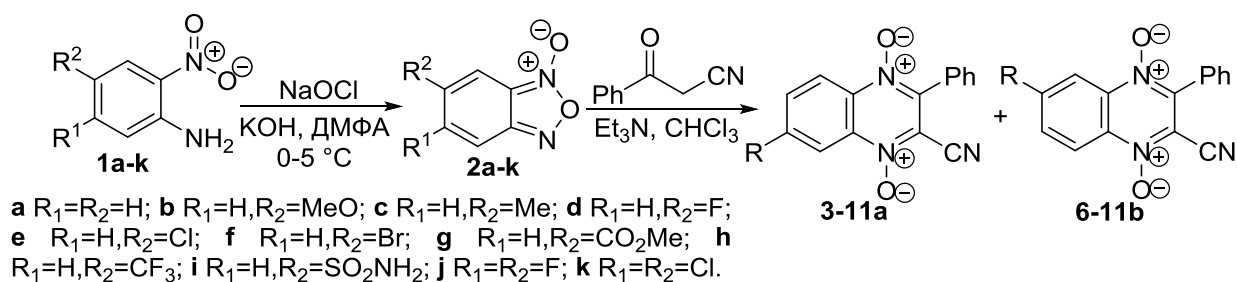
Синтез производных хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида

Ранее были описаны галогенопроизводные 3-арилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида, ингибирующие рост опухолевых клеток в условиях нормоксии и гипоксии. Однако, такие производные обладают низкой растворимостью в фармакологически приемлемых водных средах, что существенно ограничивает их дальнейшие исследования. Поэтому ключевой задачей работы ставилось получение соединений, обладающих растворимостью в водных средах.

Реакция Бейрута является основным методом синтеза целевой гетероциклической системы, исходными для которого выступают бензофуроксаны. Поэтому для получения исходных соединений была оптимизирована одностадийная методика окислительной циклизации 2-нитроанилинов **1a-k** в бензофуроксаны **2a-k**, протекающая в мягких условиях и не требующая применения опасных реагентов. В результате оптимизации найдены условия окисления 2-нитроанилинов **1a-k**, которые позволяют получать бензофуроксаны **2a-k** с высокими выходами действием гипохлорита натрия в присутствии КОН в ДМФА (Табл. 1).

Известно, что в ряде случаев реакция Бейрута между монозамещенными бензофуроксанами и СН-кислотами приводит к смеси 7- и 6-замещенных хиноксалин 1,4-диоксидов, что объясняется наличием таутомерного равновесия у бензофуроксанов в растворе. Поэтому далее было изучено влияние заместителей на региоселективность реакции Бейрута. Гетероциклизация между бензофуроксанами **2a-k** и бензоилацетонитрилом в хлороформе в присутствии триэтиламина в качестве основания позволяет получать искомые хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксиды **3-11** с высокими выходами. Обнаружено, что наряду с описанными в литературе 7-изомерами **6-11a** в реакции наблюдается образование неизвестных ранее их 6-замещенных аналогов **6-11b**. Выявлено, что выход 6-изомера не зависит от условий проведения конденсации и возрастает с увеличением электроноакцепторного характера заместителя, а также хорошо коррелирует с константой Гаммета (Табл. 1).

Так, для электронодонорных групп 6-изомер не обнаружен, а в случае CO_2Me -, CF_3 - и SO_2NH_2 -групп производные **9-11b** являются основными продуктами реакции. Примечательно, что региоизомерные хиноксалин 1,4-диоксиды имеют практически идентичные спектральные характеристики (за исключением ЯМР ^{13}C спектров).


 Таблица 1 – Выходы замещенных 3-фенилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов **3-11**.

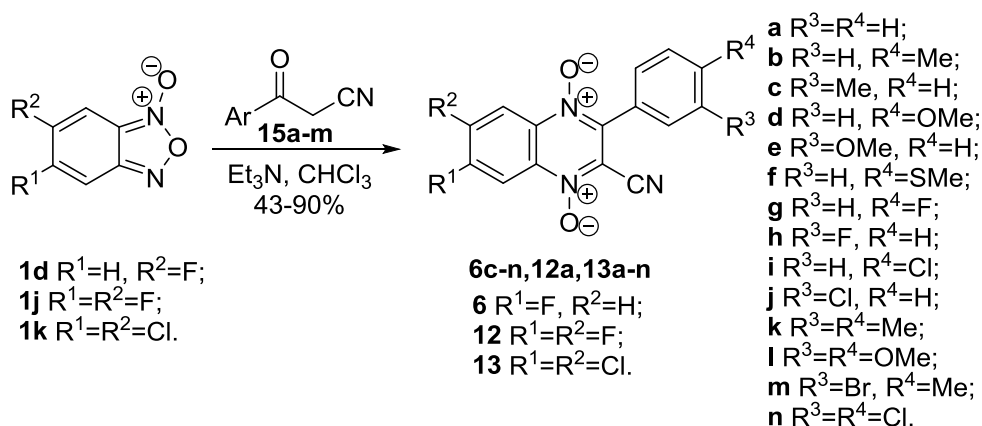
Исходное соединение	R	σ_p^*	Продукты	Выходы продуктов, %	
				7-изомер 3-11a	6-изомер 6-11b
2a	H	0.00	3a	45	
2b	MeO	-0.14	4a	91	0
2c	Me	-0.28	5a	80	0
2d	F	0.15	6a, 6b	70	2
2e	Cl	0.24	7a, 7b	75	6
2f	Br	0.26	8a, 8b	74	16
2g	CO ₂ Me	0.39	9a, 9b	13	25
2h	CF ₃	0.53	10a, 10b	22	34
2i	SO ₂ NH ₂	0.57	11a, 11b	28	37

σ_p^* – константа Гаммета, $\sigma < 0$, ЭД; $\sigma > 0$, ЭА.

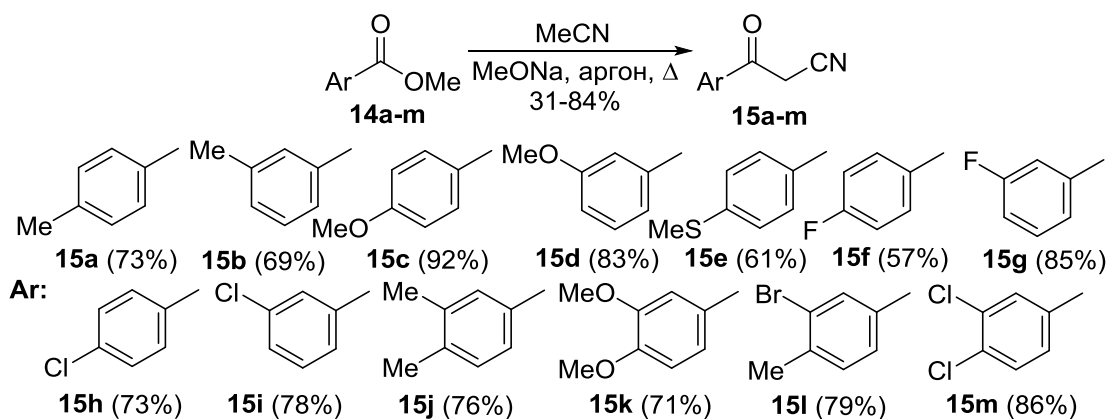
Изучение строения соединений показало, что спектроскопия на ядрах ¹³C является достоверным способом определения положения заместителей. Анализ спектров ЯМР ¹³C производных **4-11a** и **6-11b** показал, что заместители вызывают существенные смещения сигналов бензольной части гетероцикла, в то время как сигналы пиразинового ядра, нитрильной группы и фенильного радикала смещаются незначительно. Сравнение химических сдвигов сигналов бензольного ядра 3-фенилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида (**3a**) с соответствующими сигналами его производных **4-11a** и **6-11b**, замещенных в положениях 7 или 6, выявило, что смещение сигналов соответствует (как по величине, так и по знаку) инкрементам заместителей, характерным для производных бензола и полиароматических соединений. Более того, корреляция между литературными значениями инкрементов заместителей и наблюдаемые смещения сигналов узловых атомов углерода в положениях 9 и 10 хиноксалина **3a** при сравнении с соответствующими парами изомеров однозначно указывает на то, что в производных **4-11a** заместители располагаются в положении 7, а производные **6-11b** являются 6-замещенными аналогами, свидетельствуя о корректности приписываемым им структур.

С целью углубленного изучения роли отдельных структурных элементов в биологических свойствах производных этого ряда аналогично была получена серия 3-арилхиноксалин 1,4-диоксидов с вариацией заместителей и их положения в бензольном кольце при С3 атоме углерода гетероцикла. Взаимодействием бензофуороксанов **1d,j,k** с ароилацетонитрилами **15a-m** в присутствии триэтиламина получены 3-арилхиноксалин-

2-карбонитрил 1,4-диоксиды **6**, **12-13**.

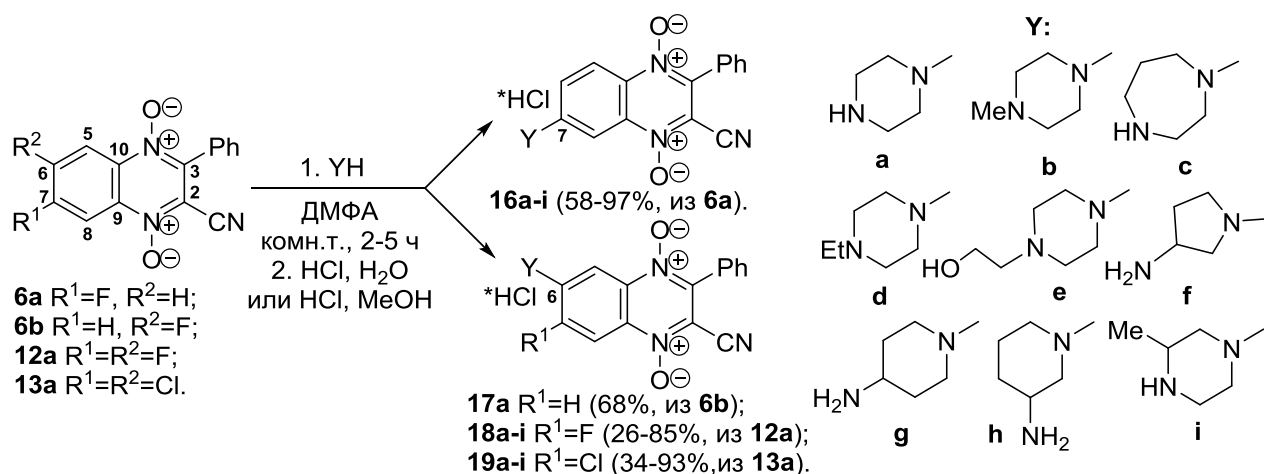


Исходные ароилацетонитрилы **15a-m** для гетероциклизации получены конденсацией метиловых эфиров соответствующих арилкарбоновых кислот **14a-m** с ацетонитрилом при кипячении в присутствии метоксида натрия.



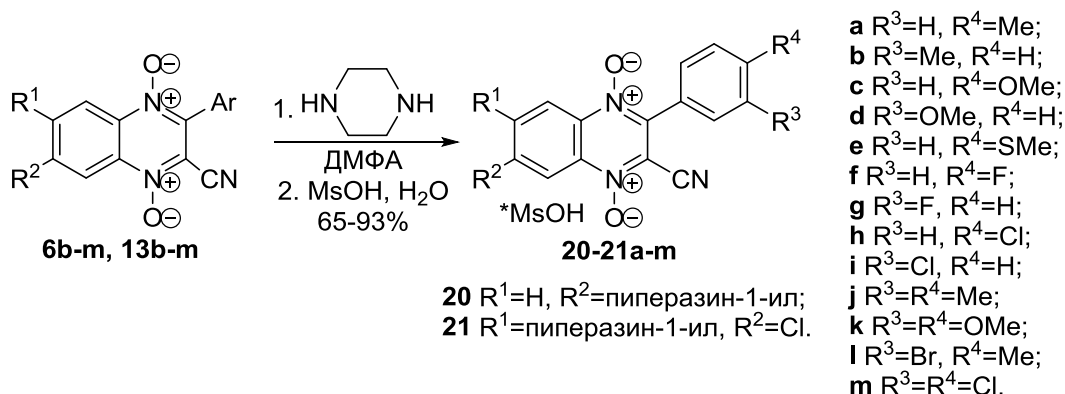
Модификация галогенозамещенных хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов и исследование их химических свойств

Одной из задач диссертационной работы ставился синтез водорастворимых производных хиноксалин 1,4-диоксида. Для их получения применена реакция замещения атома галогена в хиноксалинах **6a,b** и **12-13a** на солеобразующие аминогруппы. В результате оптимизации условий синтеза было найдено, что при действии пятикратного избытка диамина атом галогена в хиноксалинах **6a**, **6b** и **12-13a** замещается с полной конверсией исходного. Применение избытка амина позволило избежать описанных в литературе побочных процессов, таких как образование бис(диаминил)-замещенных хиноксалин 1,4-диоксидов и деоксигенация пиразин 1,4-диоксидной системы. Действием циклическими диаминами **a-i** на хиноксалины **6a**, **6b** и **12-13a** в ДМФА получены серии 6- и 7-замещенных аминов **16a-i** и **18-19a-i** с высокими выходами. Обработкой раствором HCl в метаноле конечные соединения были превращены в водорастворимые гидрохлориды **16-19**.



Стоит отметить, что замещение атома галогена в дигалогенопроизводных **12-13a** протекает региоселективно, давая 6-аминозамещенные продукты **18-19**. Это объясняется образованием термодинамически более стабильного (на ~10 ккал/моль, по данным расчетов в базе 6-31G(d) с использованием функционала B3LYP) комплекса Мезенгеймера при С6 атоме углерода и в значительной степени вызвано электроноакцепторным эффектом CN группы в положении 2 гетероцикла. Результаты расчетов также показали, что сопряжение с нитрильной группой при С2 атоме углерода приводит к увеличению значения положительного заряда, индексов Фукуи и коэффициента НСМО в положении 6 хиноксалина в сравнении с таковыми у соседнего атома углерода С7 в 6,7-дифторпроизводном **12a**, что определяет его более высокую реакционную способность в реакциях замещения.

Для анализа связи «структура–активность» синтезирован ряд 6(7)-аминопроизводных хиноксалин 1,4-диоксида, модифицированных по положению 3. Атомы галогенов в соединениях **6с-n** и **13b-m** легко замещаются при действии избытка пиперазина в ДМФА, давая с высокими выходами целевые хиноксалины **20-21a-m**.

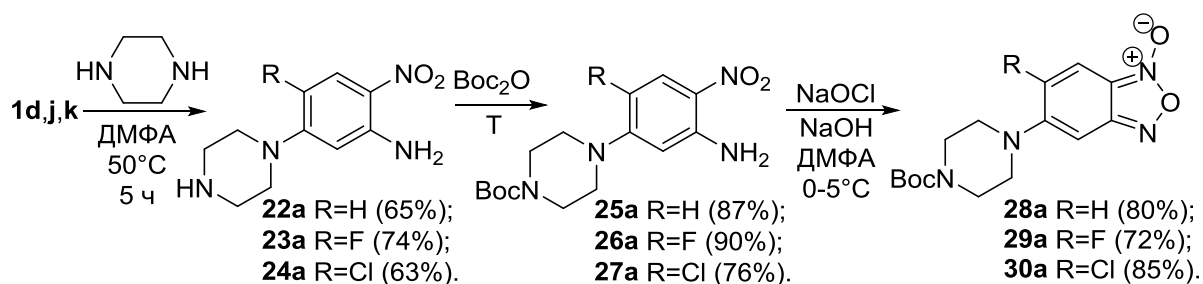


Ввиду низкой растворимости гидрохлоридов производных **20-21a-m**, эти соединения были выделены в виде более растворимых в воде метансульфонатов.

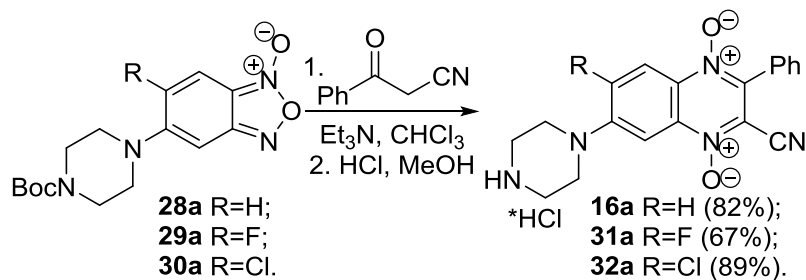
Синтез 7-аминопроизводных 6-галогенохиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов

Ввиду того, что взаимодействие монозамещенных бензофуроксанов, содержащих

электронодонорные заместители, с бензоилацетонитрилом дает исключительно 7-изомеры, было предположено, что гетероциклизация Бейрута между аминозамещенными бензофуруксанами и бензоилацетонитрилом будет приводить к 7-аминопроизводным хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида. В связи с этим был разработан оригинальный четырехстадийный метод получения аминобензофуруксанов, для реализации которого были синтезированы замещенные 2-нитроанилины. Нуклеофильным замещением атома галогена 2-нитроанилинов **1d,j,k** на остаток пиперазина были получены производные фенилендиамина **25-27a**. Окисление *o*-нитроанилинов **25-27a** гипохлоритом натрия в щелочной среде с высоким выходом дало ключевые аминобензофуруксаны **28-30a**.

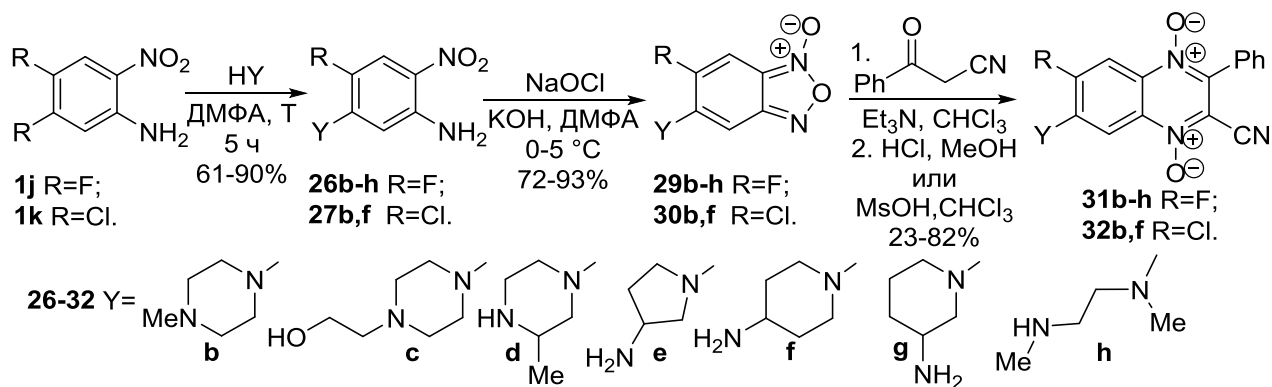


Последующей гетероциклизацией фуруксанов **28-30a** с бензоилацетонитрилом в присутствии триэтиламина получены 7-аминопроизводные **16a, 31-32a**. Стоит отметить, что хиноксалин **16a**, образующийся из бензофуруксана **28a**, по физико-химическим и спектральным характеристикам оказался идентичным производному **16a**, полученному нуклеофильным замещением из фторхиноксалин 1,4-диоксида **6a**.

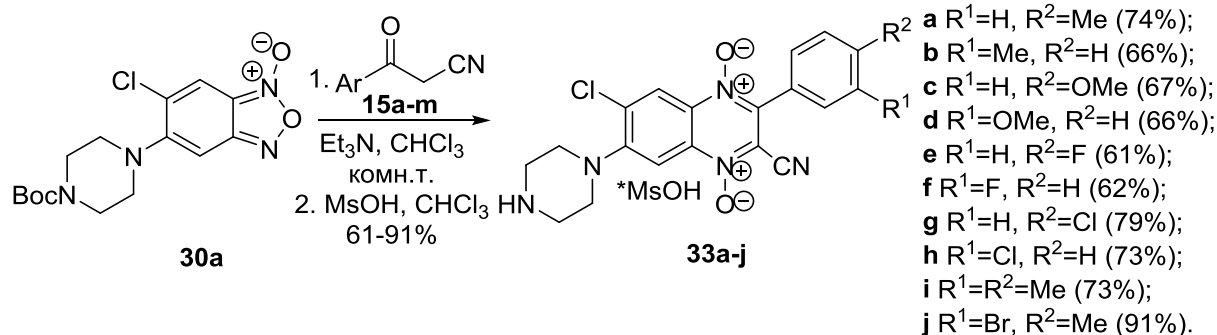


Аналогичным способом из нитроанилинов **1j,k** были синтезированы *o*-нитроанилины **29b-h** и **30b,f** с остатками различных диаминов, которые были трансформированы в бензофуруксаны **26b-h** и **27b,f**. Поскольку разработанный метод оказался пригодным для получения ранее неизвестных 7-аминопроизводных 6-галогенохиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов, он был использован для синтеза расширенной серии аналогов **31b-h** и **32b,f** из фуруксанов **26b-h** и **27b,f**. Удаление защитной Voc-группы действием HCl в метаноле или метансульфокислоты были получены соли целевых аминов **31a-h** и **32a,b,f**. Анализ спектров ^{13}C ЯМР показал, что величина инкрементов заместителей относительно незамещенного 3-фенилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида в положении 9 и 10 для ранее полученных 6-аминопроизводных **18-19** и их 7-изомерных аналогов **31-32** соответственно коррелирует

с литературными данными и подтверждает приписываемую структуру соединений.

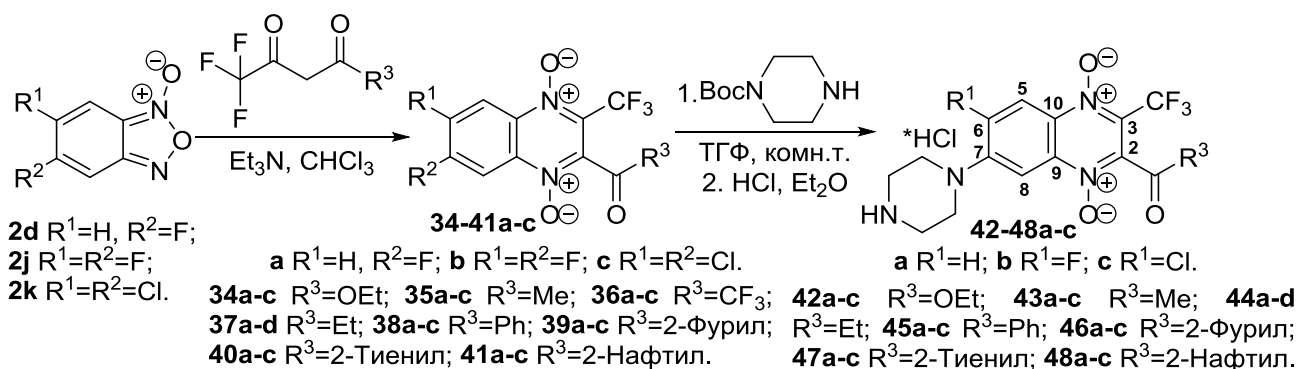


Аналогично соединениям **31-32** из бензофуросана **30a** и ароилацетонирилов получена серия 3-арилпроизводных **33a-j**. Вос-защита в остатке пиперазина конечных соединений **33a-j** была удалена обработкой метансульфокислотой в хлороформе.



Синтез производных 3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксида

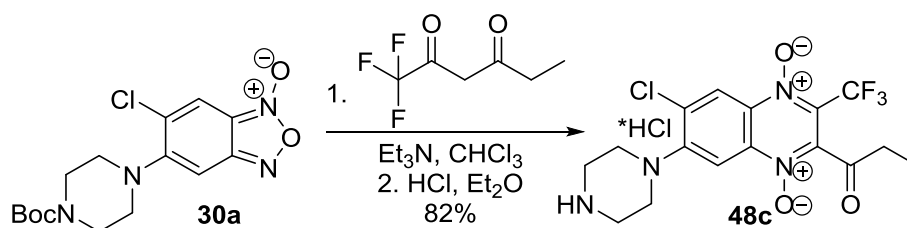
Следующим этапом работы стало исследование роли заместителя в положении 2 и 3 хиноксалина в биологических свойствах соединений этого класса. Учитывая данные литературы и ряд уникальных свойств CF₃-группы, выполнен синтез серии 3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксидов **34-41a-c** посредством аналогичной циклизации между бензофуросанами **2d,j,k** и 1-ацил-3,3,3-трифторацетонами. Тем не менее попытки провести конденсацию бензофуросанов **2d,j,k** с 1,1,1,5,5,5-гексафторацетилацетоном в тех же условиях оказались неудачными. Найдено, что взаимодействие бензофуросанов **2d,j,k** с 1,1,1,5,5,5-гексафторацетилацетоном можно осуществить при использовании триэтиламина в качестве основания и растворителя, однако, целевые 2-трифторацетил-3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксиды **36a-c** в этих условиях образуются с выходами менее 10%.



Заключительным направлением синтетических работ стала модификация полученных галогенопроизводных **34-35a-c** и **37-41a-c** в аминопроизводные. В результате оптимизации условий синтеза удалось провести замещение атома галогена в соединениях **34-35a-c** и **37-41a-c** при использовании трехкратного избытка Вос-пиперазина в ТГФ, что позволило получать с хорошими выходами Вос-производные **42-48a-c** с различными заместителями в положении 2 и 6 гетероцикла. Расщепление защитной Вос-группы после очистки промежуточных Вос-производных **42-48a-c** и превращение в водорастворимые гидрохлориды проведено действием раствора HCl в диэтиловом эфире. В связи с низкими выходами галогенопроизводных 2-трифторацетил-3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксидов **36a-c** исследовать их реакционные свойства в реакциях нуклеофильного замещения и получить их аминопроизводные не удалось.

Выявлена региоселективность замещения атома галогена в дигалогенопроизводных **34-35b-c** и **37-41b-c**, приводящая к 7-аминозамещенным продуктам, что может быть связано с большим электроноакцепторным эффектом CF₃-группы в положении 3. Интересно, что в случае дифторпроизводных **38-41b**, содержащих в положении 2 ароильный или гетероароильный фрагменты, атом фтора в положении 6 также подвергался нуклеофильному замещению, давая побочные продукты дизамещения, вероятно, вследствие более сильного электроноакцепторного эффекта ароильного и гетероароильного ядра при C2 атоме углерода.

Встречный синтез, основанный на конденсации бензофуросана **30a** с 1,1,1-трифторгексан-2,4-дионом в хлороформе в присутствии триэтиламина, привел к хиноксалин 1,4-диоксиду **48c**. По физико-химическим и спектральным характеристикам продукт **48c** оказался идентичным производному, синтезированному нуклеофильным замещением атома хлора хиноксалин 1,4-диоксида **37c**. Идентичность структуры образцов 7-(пиперазин-1-ил)-2-пропионил-3-трифторметил-6-хлорхиноксалин 1,4-диоксида (**48c**), полученного различными способами, доказана спектральными методами (ЯМР спектроскопией, HRMS ESI) и данными ВЭЖХ.



Строение всех новых соединений подтверждено методами ЯМР-спектроскопии (¹H, ¹³C) и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS-ESI), а для некоторых производных доказано данными РСА и двумерной ЯМР-спектроскопии HSQC и CIGAR. Индивидуальность и чистота конечных соединений подтверждены ВЭЖХ.

Биологические свойства производных хиноксалин 1,4-диоксида

Тестирование антипролиферативных свойств полученных производных показало, что большинство хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов подавляет пролиферацию опухолевых клеток различного гистогенеза в низких микромолярных и субмикромолярных концентрациях. Наиболее важным преимуществом полученных хиноксалин 1,4-диоксидов является селективное ингибирование роста злокачественных клеток в условиях гипоксии, а также способность преодолевать МЛУ опухолевых клеток с экспрессией трансмембранного транспортера Р-гр. Скрининг цитотоксичности серии аминопроизводных хиноксалин 1,4-диоксида в отношении клеток рака молочной железы (MCF-7) позволил идентифицировать ряд соединений-лидеров, перспективных для дальнейшей разработки новых химиотерапевтических агентов, а также выявить ключевые закономерности связи «структура–активность». Установлено, что гибель опухолевых клеток MCF-7 и MDA-MB-231 в условиях гипоксии, обусловленная действием хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов, связана с генерацией активных форм кислорода, ингибированием сигнального пути HIF-1α и снижением транскрипции VEGF-A. Выявлено, что соединения **31a** и **32b** имеют высокую антипролиферативную активность в отношении клеток рака молочной железы MCF-7 и оказывают значительное влияние на сигнальные пути рецептора эстрогенов ERα, поддерживающие рост этих клеток. Таким образом, производные хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида могут рассматриваться как двойные блокаторы HIF-1α/ERα, модулирующие активность сигнальных путей HIF-1α и ERK 1/2 и являются перспективным классом противоопухолевых веществ, действующих на солидные эстрогензависимые опухоли.

Обнаружены производные хиноксалин 1,4-диоксида, подавляющие рост микроорганизмов и простейших. Найден ряд соединений, превосходящих по противомикробной активности препарат сравнения Диоксидин. Результаты скрининга показали, что 3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксиды обладают высокой активностью для большинства протестированных грамположительных, грамотрицательных бактерий

и грибковых культур. Стоит отметить, что наиболее чувствительными ко всем протестированным производным оказались грамположительные бактерии. Выявлено, что механизм их антибактериального действия обусловлен повреждением ДНК. Обнаружен ряд хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидов, обладающих высоким противопротозойным потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методология синтеза водорастворимых производных хиноксалин 1,4-диоксида и выявлены закономерности структура–свойство в ряду синтезированных соединений. Полученные результаты позволили дополнить и расширить знания о действии хиноксалин 1,4-диоксидов на опухолевые клетки и патогенные микроорганизмы и выявить высокий потенциал их водорастворимых производных для разработки новых лекарственных средств. Успешное прохождение последующих доклинических и клинических испытаний отобранных соединений-лидеров позволит создать инновационный гипоксия-селективный противоопухолевый препарат на основе хиноксалин 1,4-диоксида для лечения солидных опухолей.

Выводы

1. Реакция Бейрута между монозамещенными бензофураксанами и бензоилацетонитрилом приводит, помимо 7-изомеров, к образованию ранее неизвестных их 6-замещенных аналогов, доля которых возрастает с увеличением электроноакцепторного характера заместителя.
2. Замещение атома галогена в 6,7-дигалогенохиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксидах диаминами протекает региоселективно, приводя к 6-аминопроизводным хиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида, что определяется распределением зарядов и образованием термодинамически более устойчивого комплекса Мезенгеймера.
3. Взаимодействие дигалогенопроизводных 2-ацил-3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксида с диаминами также происходит региоселективно, давая 7-аминозамещенные продукты, что объясняется более сильными электроноакцепторными свойствами трифторметильной группы в положении 3 гетероцикла, чем ацильного остатка при С2 атоме углерода.
4. Гетероциклизация 5-аминопроизводных бензофураксана с ацилацетонитрилами и 1-ацил-3,3,3-трифторацетонами протекает региоселективно и приводит к образованию 7-аминопроизводных 6-галогенохиноксалин 1,4-диоксидов.
5. Синтезировано свыше 100 водорастворимых хиноксалин 1,4-диоксидов с вариацией заместителей в положениях 2, 3, 6 и 7 гетероцикла, позволивших провести анализ роли отдельных функциональных групп в биологических свойствах, а также отобрать ряд новых противоопухолевых и противомикробных соединений-кандидатов и

оценить их влияние на внутриклеточные мишени.

6. Найдены производные, способные в микромолярных и субмикромолярных концентрациях ингибировать рост микроорганизмов и опухолевых клеток, включая клетки в условиях гипоксии и клетки с активированными механизмами МЛЮ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ:

Публикации в журналах, индексируемых WoS, Scopus, RSCI:

1. **Buravchenko G.I.** Synthesis and characterization of novel 2-acyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-dioxides as potential antimicrobial agents / G.I. Buravchenko, D.A. Maslov, M.S. Alam, N.E. Grammatikova, S.G. Frolova, A.A. Vatlin, X. Tian, I.V. Ivanov, O.B. Bekker, M.A. Kryakvin, O.A. Dontsova, V.N. Danilenko, T. Zhang, A.E. Shchekotikhin // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – Is. 2. – P. 155. DOI: 10.3390/ph15020155.
2. **Buravchenko G.I.** Synthesis of 7-amino-6-halogeno-3-phenylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxides: A way forward for targeting hypoxia and drug resistance of cancer cells / G.I. Buravchenko, A.M. Scherbakov, L.G. Dezhenkova, L. Monzote, A.E. Shchekotikhin // *RSC Adv*. – 2021. – Vol. 11. – Is. 61. – P. 38782-38795. DOI: 10.1039/d1ra07978f.
3. Щекотихин А.Е. Разработка нового поколения химиотерапевтических препаратов для лечения онкологических и инфекционных заболеваний на основе хиноксалин-1,4-диоксидов и эфирных масел тропических растений / А.Е. Щекотихин, **Г.И. Буравченко**, А.М. Щербаков // *Вестник РФФИ*. – 2021. – №3(111). – С. 95-98. DOI: 10.22204/2410-4639-2021-111-03-95-98.
4. **Buravchenko G.I.** Discovery of derivatives of 6(7)-amino-3-phenylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxides: novel, hypoxia-selective HIF-1 α inhibitors with strong antiestrogenic potency / G.I. Buravchenko, A.M. Scherbakov, L.G. Dezhenkova, E.E. Bykov, S.E. Solovieva, A.A. Korlukov, D.N. Sorokin, L.M. Fidalgo, A.E. Shchekotikhin // *Bioorg. Chem*. – 2020. – Vol. 104. – P. 104324. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104324.
5. **Buravchenko G.I.** Revision of the regioselectivity of the Beirut reaction of monosubstituted benzofuroxans with benzoylacetone. 6-Substituted quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxides: Structural characterization and estimation of anticancer activity and hypoxia selectivity / G.I. Buravchenko, A.M. Scherbakov, A.D. Korlukov, P.V. Dorovatovskii, A.E. Shchekotikhin // *Curr. Org. Chem*. – 2020. – Vol. 17. – Is. 1. – P. 29-39. DOI: 10.2174/1570179416666191210100754.
6. Scherbakov A.M. Novel quinoxaline-2-carbonitrile-1,4-dioxide derivatives suppress HIF1 α activity and circumvent MDR in cancer cells / A.M. Scherbakov, A.M. Borunov, **G.I. Buravchenko**, O.E. Andreeva, I.A. Kudryavtsev, L.G. Dezhenkova, A.E. Shchekotikhin // *Cancer Invest*. – 2018. – Vol. 36. – Is. 3. – P. 199-209. DOI: 10.1080/07357907.2018.1453072.
7. Maslov D.A. Discovery of novel antimycobacterial agents based on quinoxaline 1,4-dioxide scaffold / D.A. Maslov, A.A. Vatlin, **G.I. Buravchenko**, S.G. Frolova, K.M. Klimina, Md.S. Alam, Z. Liu, H.M.A. Hameed, T. Zhang, A.E. Shchekotikhin, V.N. Danilenko // *FEBS Open Bio*. – 2021. – Vol. 11 (Suppl. 1). – P. 303. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.
8. Scherbakov A. Novel insights into the pharmacological effects of hypoxic cytotoxins in hormone-dependent breast cancer cells: ER α degradation and modulation of ERK signaling activity / A. Scherbakov, **G. Buravchenko**, D. Sorokin, L. Monzote Fidalgo, A. Shchekotikhin // *Ann. Oncol*. –

2020. – Vol. 31 (Suppl. S5). – P. S1230. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2203.

9. **Buravchenko G.** Evaluation of novel hypoxia-selective antitumor agents blocking HIF-1 α /CA9 axis in breast cancer / G. Buravchenko, A. Scherbakov, D. Sorokin, L. Fidalgo, A. Shchekotikhin // *Ann. Oncol.* – 2020. – Vol. 31 (Suppl. S1). – P. S11. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.01.033.

10. **Buravchenko G.** Hypoxia in breast cancer cells and targeting. HIF-1 α signaling by novel derivatives of quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxide / G. Buravchenko, A. Scherbakov, A. Shchekotikhin // *FEBS Open Bio.* – 2019. – Vol. 9 (Suppl. S1). – P. 323. DOI: 10.1002/2211-5463.12672.

11. Scherbakov A.M. Targeting HIF1 α /AP1 in hypoxia by novel 7-amino-6-halogeno-3-phenylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxides / A.M. Scherbakov, **G.I. Buravchenko**, L.G. Dezhenkova, A.E. Shchekotikhin // *Ann. Oncol.* – 2019. – Vol. 30. – P. i5. DOI: 10.1093/annonc/mdz029.

12. **Буравченко Г.И.** Производные 3-амино-2-хиноксалинкарбонитрил 1,4-диоксида – перспективные гипоксия-селективные ингибиторы опухолевого роста / Г.И. Буравченко, А.М. Щербаков, L. Monzote, А.Е. Щекотихин // *Успехи Мол. Онкологии.* – 2019. – №4. – С. 142-143.

13. **Buravchenko G.** Targeting of hypoxia-inducible factor 1 α in cancer cells by prodrugs based on quinoxaline 1,4-dioxide scaffold / G. Buravchenko, A. Scherbakov, A. Borunov, L. Dezhenkova, A. Shchekotikhin // *FEBS Open Bio.* – 2018. – Vol. 8 (Suppl. S1). – P. 314. DOI: 10.1002/2211-5463.12446.

14. **Buravchenko G.** Estimation of antitumor activity of amino derivatives of quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxide / G. Buravchenko, I. Treshalin, A. Scherbakov, A. Shchekotikhin // *ESMO Open.* – 2018. – Vol. 3 (Suppl. 2). – P. A459-460. DOI: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.439.

15. Scherbakov A. Novel HIF-1 α inhibitors suppress cancer cell growth and circumvent multidrug resistance / A. Scherbakov, **G. Buravchenko**, A. Borunov, O. Andreeva, L. Dezhenkova, A. Shchekotikhin // *ESMO Open.* – 2018. – Vol. 3 (Suppl. 2). – P. A184-185. DOI: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.439.

16. **Буравченко Г.И.** Антипролиферативная активность 6-аминопроизводных 1,4-диоксида 3-фенил-2-хиноксалинкарбонитрила / Буравченко Г.И., Щербаков А.М., Щекотихин А.Е. // *Росс. Биотерапевт. Журнал.* – 2018. – №17 (1). – С. 13.

17. Борунов А.М. 1,4-Диоксиды 3-арилхиноксалин-2-карбонитрилов: роль заместителей в гипоксической цитотоксичности / А.М. Борунов, **Г.И. Буравченко**, О.Е. Андреева, А.М. Щербаков, А.Е. Щекотихин // *Успехи Мол. Онкологии.* – 2017. – №4. – С. 88-89.

18. **Буравченко Г.И.** Цитотоксическая активность 7-аминопроизводных 1,4-диоксида 3-фенил-2-хиноксалинкарбонитрила / Г.И. Буравченко, Ю.А. Блинова, Н.Э. Вавилов, А.М. Щербаков, А.Е. Щекотихин // *Росс. Биотерапевт. Журнал.* – 2017. – №16 (s1). – С. 15-16.

Патенты:

19. Пат. 2640304 С1 Российская Федерация, МПК С07D 241/52, А61К 31/498, А61Р 35/00. Производные 1,4-диоксида хиноксалин-2-карбонитрила, ингибирующие рост опухолевых клеток / Щекотихин А.Е., Борунов А.М., Буравченко Г.И., Деженкова Л.Г., Щербаков А.М.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" -

№ 2016132126; заявл. 04.08.2016; опубл. 27.12.2017. Бюл. №36.

20. Пат. 2746395 С1 Российская Федерация, МПК C07D 241/52, A61K 31/498, A61P 35/00. Способ ингибирования опухолевых клеток новыми производными 3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксида / Щекотихин А.Е., Буравченко Г.И., Щербаков А.М.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" - № 2020124152; заявл. 21.07.2020; опубл. 13.04.2021. Бюл. № 11.

Тезисы конференций:

21. **Буравченко Г.И.** 3-Аминохиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксиды: перспективные гипоксия-селективные терапевтические агенты в отношении рака молочной железы / Г.И. Буравченко, А.М. Щербаков, А.Е. Щекотихин // Сборник материалов II Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии». – Москва, 2021. – С. 69-70. DOI: 10.29296/25877313-2020-s1-039.

22. **Буравченко Г.И.** Региоселективность нуклеофильного замещения в 6,7-дигалогенопроизводных 3-фенилхиноксалин-2-карбонитрил 1,4-диоксида / Г.И. Буравченко, Е.Е. Быков, А.Е. Щекотихин // Сборник материалов VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». – Нижний Новгород, 2020. – С. 142.

23. **Buravchenko G.** Targeting HIF-1 α signaling in breast cancer by 6-aminoderivatives of quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxide / G. Buravchenko, A. Scherbakov, D. Sorokin, A.E. Shchekotikhin // Book of abstracts of EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry. – Athens, 2019. – P.121.

24. **Buravchenko G.I.** Synthesis and antibacterial activity of amino derivatives of quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxide / G.I. Buravchenko, N.E. Grammatikova, L. Monzote, A.E. Shchekotikhin // Book of abstracts of Markovnikov congress on organic chemistry. – Moscow-Kazan, 2019. – P. 230.

25. Scherbakov A. Targeting HIF-1 α signaling in breast cancer cells by novel hypoxic cytotoxins / A. Scherbakov, **G. Buravchenko**, L. Monzote, A. Shchekotikhin // Book of abstracts of International molecular medicine symposium by the Bosphorus. – Istanbul, 2019.

26. **Buravchenko G.I.** Targeting HIF-1 α signaling in breast cancer by novel 7-aminoderivatives of quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxide / G.I. Buravchenko, A.M. Scherbakov, L.G. Dezhenkova, A.E. Shchekotikhin // Book of abstracts of The 5th international scientific conference «Advances in synthesis and complexing». Vol. 1. – Moscow, 2019. – P. 111.

27. **Buravchenko G.I.** The influence of functional groups on the cytotoxicity of amino-derivatives of 7-chloro-3-phenyl-quinoxaline-2-carbonitrile di-N-oxide / G.I. Buravchenko, A.M. Shcherbakov, A.E. Shchekotikhin // Book of abstracts of the 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry «Med Chem. Russia 2017». – Kazan, 2017. – P. 15.

28. **Buravchenko G.I.** Synthesis and biological evaluation of 3-phenyl-quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxia-selective cytotoxic agents / G.I. Buravchenko, A.M. Scherbakov, N.E. Vavilov, L.G. Dezhenkova, A.E. Shchekotikhin // Book of abstracts of the 4th international scientific conference «Advances in synthesis and complexing». Vol. 1. – Moscow, 2017. – P. 57.

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на 18 профильных конференциях, включая конференции международного и российского уровней.