

Синтез новых гетероциклических производных дегидроабетиламина и их биологическая активность

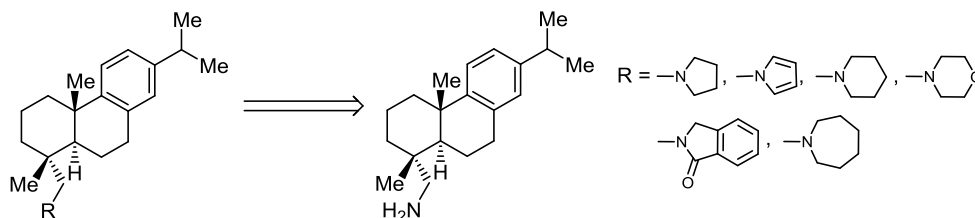
Ксения С. Ковалева^{1,2}, Ольга И. Яровая^{1,2*}, Андрей В. Шернюков¹, Владимир В. Зарубаев³, Анна А. Штро³, Яна Р. Оршанская³, Нариман Ф. Салахутдинов^{1,2}

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, пр. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090, Россия; e-mail: ooo@nioch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, ул. Пирозова, 2, Новосибирск 630090, Россия; e-mail: kseniya.kovaleva3103@yandex.ru

³ Научно-исследовательский институт гриппа, ул. Профессора Попова, 15/17, Санкт-Петербург 197376, Россия e-mail: vladimir.zarubaev@influenza.spb.ru

Поступило 14.12.2016
Принято 6.03.2017



На основе первичной аминогруппы дегидроабетиламина получены производные, содержащие пирролидиновый, пиперидиновый, азепановый, морфолиновый, изоиндолиноновый и пиррольный гетероциклические фрагменты. Изучена противовирусная активность полученных соединений в отношении штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, а также антибактериальная активность в отношении некоторых видов бактерий и грибов.

Ключевые слова: дегидроабетиламин, природные соединения, антибактериальная активность, противовирусная активность.

Одним из наиболее эффективных современных подходов к синтезу биологически активных соединений является функционализация заведомо биоактивной молекулы различными фармакофорными группами, в частности гетероциклическими фрагментами. В этом плане исследователей особенно привлекают азотистые гетероциклы, встречающиеся в структурах большого количества классов биологически активных соединений (например, в структурах алкалоидов).

Объектом исследования в данной работе является дегидроабетиламин (**1**, ДГААм) – производное дегидроабетиновой кислоты (**2**, ДАК) (рис. 1), которая содержится в живице хвойных растений, относящихся к родам *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix*. Особенно высоким содержанием ДАК (71%) отличается живица *Picea obovata*.¹

ДГААм (**1**) также известен под названием лиламин и включен в список соединений, являющихся важными строительными блоками в медицинской химии.² Азотетины (основания Шиффа), полученные на основе ДГААм (**1**) и производных бензальдегида, проявляют

бактерицидную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*,³ а также антипролиферативные свойства на линиях клеток рака легких A549, NCI-H460 и рака толстой кишки SW620.⁴ Также было обнаружено, что гидрохлорид ДГААм (**1**) проявляет высокую цитотоксичность по отношению к некоторым линиям раковых клеток.⁵ Было показано, что ДГААм (**1**) способен эффективно избирательно уничтожать клетки меланомы путем уменьшения уровня клеточной пролиферации и индукции апоптоза.⁶ Цитотоксический эффект и механизм

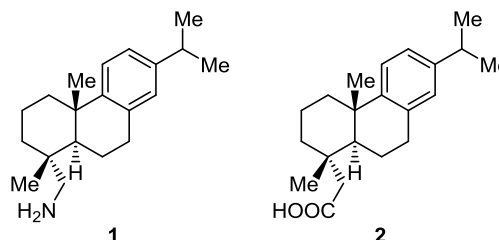


Рисунок 1. Структуры ДГААм (**1**) и ДАК (**2**).

апоптоза производного, полученного из ДГААМ (1) и *para*-трифторметилбензальдегида, изучен на клетках карциномы SMMC-7721.⁷ В последние годы появились исследования антипропозойной активности амидов ДГААМ⁸ относительно *Leishmania donovani* и *Trypanosoma cruzi* и активности замещенных в остове амидов ДГААМ.⁹

Ранее были описаны разнообразные амиды и иминоподобные производные, содержащие заместители в ароматическом цикле. Также были получены *N*-алкилпроизводные.¹⁰ Известны некоторые соединения, содержащие гетероциклические фрагменты (фталимидный и полихлорфталимидный).^{11,12} Целью данной работы является синтез производных, содержащих алифатические и ароматические азотистые гетероциклы.

Для получения алифатических пяти-, шести- и семичленных азотистых гетероциклов проводилась реакция циклизации первичных аминов с алифатическими дигалогеналканами с различной длиной углеродной цепи по методике, предложенной ранее.¹³ Было показано, что при взаимодействии ДГААМ (1) с 1,4-дибромбутаном образуется соединение 3, содержащее пирролидиновый фрагмент, при взаимодействии ДГААМ (1) с 1,5-дибромпентаном – соединение 4, содержащее пиперидиновый фрагмент, а при взаимодействии ДГААМ (1) с 1,6-дибромгексаном – азапан 5. Реакции проводили при кипячении в MeCN с добавлением K₂CO₃ (схема 1). По данным хромато-масс-спектрометрии спустя 5 ч кипячения в реакционной смеси не наблюдалось исходного амина 1, конверсия была полной. Выходы продуктов составили 36–43% после очистки колоночной хроматографией.

Схема 1

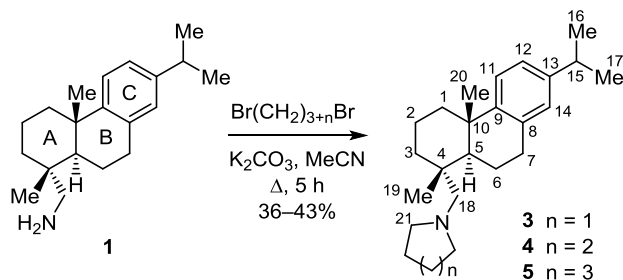
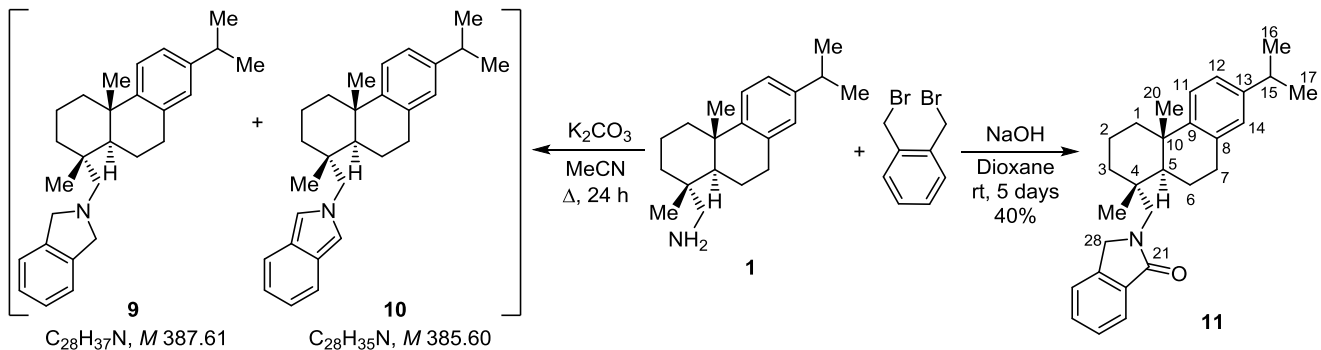
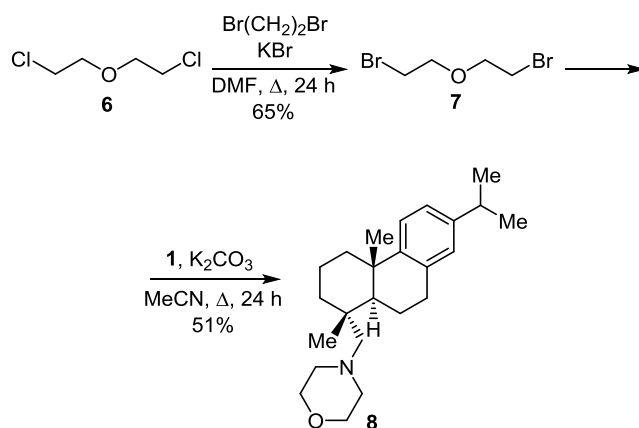


Схема 3



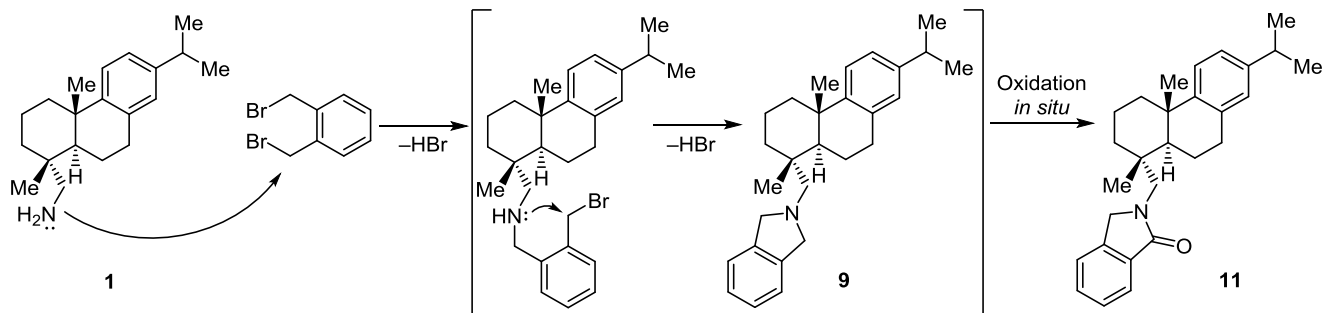
Нами было показано, что проведение реакции с использованием микроволновой активации при температуре 110 °С позволяет существенно сократить время реакции – с 5 до 1 ч, но увеличивает осмоление реакционной смеси и снижает выходы (20%). Для получения соединений с морфолиновым фрагментом была предпринята попытка провести реакцию с бис(2-хлорэтиловым) эфиром (6). В данных условиях конверсия была низкой (5%), поэтому атомы хлора в эфире 6 замещали на атомы брома для увеличения реакционной способности. При кипячении бис(2-хлорэтилового) эфира (6) в дибромэтане с KBr был получен бис(2-бромэтиловый) эфир (7), который в дальнейшем был введен в реакцию циклизации с ДГААМ (1) с образованием соединения 8 (схема 2). Выход соединения 8 после очистки колоночной хроматографией составил 51%.

Схема 2



По аналогии с предыдущими превращениями, ожидалось, что взаимодействие *орто*-дибромсилола с амином 1 в тех же условиях (кипячение в MeCN) будет приводить к образованию соединения 9. Однако, по данным хромато-масс-спектрометрии, в реакционной смеси помимо продукта 9 наблюдалось образование соединения, имеющего молекулярный пик с *m/z* 385 [M]⁺. Возможно, что при проведении реакции в данных условиях, образуется изоиндол 10 (схема 3). Выделить в индивидуальном виде из реакционной смеси соединения 9 и 10 и доказать их структуру не удалось.

Схема 4



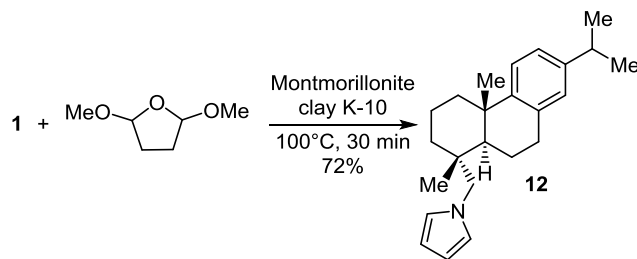
Взаимодействие *орто*-дибромсилола с амином **1** в условиях, предложенных в работе,¹⁴ привело к образованию в качестве основного продукта соединения **11** с изоиндолиновым фрагментом (схема 3). Соединение **11** выделено нами методом колоночной хроматографии с выходом 40%.

Строение полученного изоиндолинона **11** было полностью подтверждено физико-химическими методами. Так, в его спектрах ЯМР наблюдаются характерные сигналы изоиндолинового заместителя. В спектре ЯМР ¹H проявляются сигналы протонов при атоме углерода C-28 в виде АВ-дублетов (4.45 и 4.49 м. д., ²J = 16.8 Гц) и наблюдаются 4 сигнала протонов несимметричной ароматической системы. В спектре ЯМР ¹³C наблюдается сигнал атома C-21 при 169.9 м. д., соответствующий амидной карбонильной группе. В хромато-масс-спектре проявляется пик молекулярного иона с *m/z* 401 [M]⁺, который соответствует брутто-формуле продукта **11**.

Получение изоиндолинонов в одну стадию из первичного амина и *орто*-дибромсилола в литературе ранее описано не было. Существуют различные методы синтеза данного класса соединений, среди которых наиболее простым и эффективным способом является селективное моновосстановление легкодоступных фталимидов. Фталимиды восстанавливают водородом на катализаторах под давлением,¹⁵ с использованием стехиометрического количества олова¹⁶ или цинка¹⁷ в присутствии кислоты, с применением полиметилгидросилоксана с каталитическим количеством ионов фтора.¹⁸ Другим методом получения соединений с изоиндолиновым фрагментом является окисление изоиндолинов. Известно электрохимическое окисление изоиндолинов в пиридине,¹⁹ однако данный метод не является селективным и приводит к образованию изоиндолинов в смеси с фталимидами. Для реакции ДГААм (**1**) и *орто*-дибромсилола нами был предложен механизм (схема 4), включающий изначально образование изоиндолинового фрагмента и последующее его окисление в реакционной смеси. Можно предположить, что изоиндолиновое соединение **11** образуется в процессе окисления перекисями диоксана. Эту версию подтверждает и тот факт, что доля продукта **11** в реакционной смеси увеличивается при длительном стоянии, а при дополнительной очистке диоксана от перекисей на Al₂O₃ продукта не наблюдается.

Пиррольный цикл является одним из наиболее значимых гетероциклических структурных платформ и присутствует в большом количестве биологически активных молекул.²⁰ Простым и удобным в реализации методом синтеза пирролов является синтез по Клаусону–Каасу. В данной реакции *N*-замещенные пирролы образуются в результате конденсации первичных алифатических или ароматических аминов и 2,5-диметокситетрагидрофурана в присутствии кислотного катализатора, как правило, в среде AcOH.²¹ Проведение реакции взаимодействия ДГААм (**1**) с 2,5-диметокситетрагидрофураном в AcOH приводит к образованию ожидаемого продукта **12**, но сопровождается сильным осмолением реакционной смеси. Для уменьшения осмоления и упрощения извлечения чистого продукта, нами использовалась методика с применением монтмориллонитовой глины K-10 в качестве катализатора.²² При проведении данного превращения без растворителя с использованием глины K-10 и при нагревании до 100 °С реакция прошла полностью менее чем за 30 мин с образованием соединения **12** (схема 5).

Схема 5



У всех полученных соединений была изучена противовирусная активность в отношении вируса гриппа и антибактериальная активность относительно некоторых видов бактерий и грибов. Антимикробный скрининг был проведен CO-ADD (The Community for Antimicrobial Drug Discovery), при поддержке Wellcome Trust (Великобритания) и Университета Квинсланда (Австралия).

Первичный скрининг противомикробной активности проводился путем тестов на ингибирование размножения клеток, используя образцы в одной (32 мг/мл) концентрации. Тесты проводились в двойном повторе. В случае если один или оба раза наблюдалось

Таблица 1. Результаты первичного скрининга полученных соединений на противомикробную активность

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
3	+	–	–	–	–	+	+
4	–	–	–	–	–	–	–
5	+	–	–	–	–	+	+
8	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–

ингибирование роста $\geq 80\%$, соединение считалось активным. Ингибирование роста изучалось относительно 5 различных видов бактерий: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, и двух разновидностей грибов: *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* (табл. 1).

При первичном скрининге было выявлено наличие противомикробной активности у двух исследованных соединений – гетероциклических производных дегидроабиетиламина **3** и **5**, содержащих пирролидиновый и азепановый фрагменты соответственно. Данные соединения проявили активность в отношении культуры бактерий *Staphylococcus aureus*, а также культур грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*. Для соединений **3** и **5** была определена минимальная ингибирующая концентрация МИС (мг/мл) в отношении вышеуказанных культур бактерий и грибов, а также концентрация, вызывающая гибель 50% клеток, CC_{50} (мг/мл) в отношении линии клеток почки эмбриона человека НЕК293 (табл. 2).

Таким образом, было показано, что некоторые производные ДГААм (**1**) способны эффективно ингибировать рост патогенных микроорганизмов, в частности бактерий *Staphylococcus aureus* и некоторых видов грибов. Производные ДГААм (**1**) могут стать новым перспективным классом противогрибковых препаратов после более широких исследований, решения задачи снижения токсичности полученных соединений.

О противовирусных свойствах производных ДГААм (**1**) практически ничего не известно. Противовирусная активность изучена у близких структурных аналогов этого же класса ароматических дитерпеноидов.²³ Гидроксилированные в цикле А соединения – аналоги ДАК (**2**) – проявили высокую ингибирующую активность в отношении вируса герпеса HSV-2,²⁴ кроме того, значительные антигерпетические свойства выявлены у

Таблица 2. Противомикробная и цитотоксическая активность соединений **3** и **5**

Соединение	МИС, мг/мл (% максимального ингибирования)			CC_{50} , мг/мл НЕК293
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	
3	8 (101)	32 (98)	8 (96)	7.64 (86)
	8 (102)	32 (97)	8 (94)	
5	32 (83)	32 (100)	8 (104)	25.4 (59)
	>32 (62)	32 (99)	16 (98)	

Таблица 3. Противовирусная активность полученных соединений

Соединение	CC_{50} ,* ммоль	IC_{50} ,** ммоль	SI***
3	21.2 ± 2.8	5.9 ± 1.4	4
4	50.7 ± 5.1	12.5 ± 2.3	4
5	>800	83.7 ± 6.0	10
8	40.3 ± 2.7	19.7 ± 1.7	2
11	48.6 ± 2.3	12.5 ± 2.5	4
12	>900	70.7 ± 12.3	13

* CC_{50} – концентрация, вызывающая гибель 50% клеток.

** IC_{50} – концентрация, вызывающая 50% от максимального ингибирования вируса.

*** SI – индекс селективности, отношение CC_{50}/IC_{50} .

дегидроабиетинола ацетата.²⁵ Противовирусная активность производных ДГААм (**1**) относительно вируса гриппа в данной работе была изучена впервые. Противовирусные свойства полученных соединений изучались относительно штамма гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09. Наибольшую активность в отношении вируса гриппа показали соединения **5** и **12**, включающие в структуру азепановый и пиррольный фрагменты соответственно. Индекс селективности для них ≥ 10 , что достигается за счет понижения токсичности (табл. 3).

Таким образом, в данной работе, нами была изучена реакция алкилирования первичной аминогруппы дегидроабиетиламина дибромалканами и синтезирован ряд новых его гетероциклических производных: пирролидиновое, пиперидиновое, азепановое и морфолиновое производные. Выявлена возможность получения дегидроабиетиламина с изоиндолиновым фрагментом в одну стадию из первичного амина и *орто*-дибромсилола. Найден способ успешно получать производное, содержащее пиррольный фрагмент с высоким выходом. Для всех полученных соединений была изучена биологическая активность, у 1-{{(1R,4aS)-7-изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}пирролидина и 1-{{(1R,4aS)-7-изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}азепана была обнаружена способность эффективно ингибировать рост культуры бактерий *Staphylococcus aureus*, а также культур грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*. Показано, что изученные производные не обладают выраженной противовирусной активностью.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C зарегистрированы на спектрометре Bruker DRX-500 (500 и 125 МГц соответственно) в CDCl_3 , внутренний стандарт – остаточные сигналы растворителя (7.24 м. д. для ядер ^1H , 76.9 м. д. для ядер ^{13}C). Масс-спектры высокого разрешения записаны на спектрометре DFS Thermo Scientific в режиме полного сканирования в диапазоне m/z 0–500, ионизация ЭУ (70 эВ) при прямом вводе образца. Разделение продуктов реакции проведено с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60–200 μ , Masherey-Nagel). Хромато-масс-спектры записаны на газовом хроматографе Agilent 7890 А с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975С в качестве детектора, кварцевая колонка HP-5MS 30000 \times 0.25 мм, газ-носитель – гелий. Идентификация соединений проведена сравнением времен удерживания ряда заведомых образцов и сопоставлением полных экспериментальных масс-спектров с масс-спектрами из базы данных. Температуры плавления определены на столике Кофлера. Структуры полученных соединений были установлены по спектрам ЯМР ^1H и ^{13}C , двумерным гомоядерным корреляциям ^1H – ^1H COSY и NOESY, двумерным гетероядерным корреляциям ^1H – ^{13}C HSQC и HMBC. Нумерация атомов в соединениях дана для отнесения сигналов в спектрах ЯМР и не совпадает с нумерацией атомов в номенклатурном названии.

Синтез соединений 3–5 алкилированием амина 1. Суспензию, состоящую из 1.0 г (3.5 ммоль) дегидроабиетиламина (**1**), 3.5 ммоль соответствующего дибромалкана и 1.0 г (7.2 ммоль) K_2CO_3 в 50 мл MeCN, кипятят в течение 5 ч, после чего охлаждают до комнатной температуры и осадок отфильтровывают. Фильтрат упаривают в вакууме, подкисляют 1 мл конц. HCl, после чего промывают Et_2O (3 \times 10 мл). Потом водный раствор разбавляют 1 мл H_2O , нейтрализуют 10% водным раствором NaOH и экстрагируют Et_2O (3 \times 10 мл). Органический экстракт сушат над Na_2SO_4 , упаривают в вакууме и остаток очищают методом колоночной хроматографии на силикагеле (гексан–EtOAc, 20:1).

1-{{(1R,4aS)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-пирролидин (3**).** Выход 0.511 г (43%), светло-коричневый порошок, т. пл. 40–44 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.82 (3H, с, 19- CH_3); 1.19 (3H, с, 20- CH_3); 1.22 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.36–1.45 (3H, м, 5-CH, 6- CH_2); 1.55–1.77 (10H, м, 1,2,3,22,23- CH_2); 2.13 (1H, д, $J = 13.9$) и 2.47 (1H, д, $J = 13.9$, 18- CH_2); 2.53–2.63 (4H, м, 21,24- CH_2); 2.74–2.83 (3H, м, 15-CH, 7- CH_2); 6.88 (1H, с, Н-14); 6.98 (1H, д, $J_{12,11} = 8.2$, Н-12); 7.18 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 147.7 (C-9); 145.1 (C-13); 134.8 (C-8); 126.6 (C-14); 124.1 (C-11); 123.5 (C-12); 68.2 (C-18); 57.3 (C-21,24); 44.2 (C-5); 38.3 и 38.2 (C-4 и C-1); 37.2 (C-10); 36.6 (C-3); 33.2 (C-15); 30.2 (C-7); 25.5 (C-20); 24.1 (C-22,23); 23.8 (C-16,17); 19.2 (C-19); 18.8 (C-6); 18.7 (C-2). Найдено, m/z : 339.2914 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}$. Вычислено, m/z : 339.2921.

1-{{(1R,4aS)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-пиперидин (4**).** Выход 0.446 г (36 %), светло-коричневый порошок, т. пл. 73–75 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.80 (3H, с, 19- CH_3); 1.18 (3H, с, 20- CH_3); 1.21 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.25–1.35 (3H, м, 5-CH, 6- CH_2); 1.40–1.56 (6H, м, 22,23,24- CH_2); 1.56–1.60 (2H, м, 1- CH_2); 1.64–1.74 (2H, м, 7- CH_2); 1.76–1.86 (4H, м, 2,3- CH_2); 2.21–2.27 (2H, м, 18- CH_2); 2.32–2.45 (4H, м, 21,25- CH_2); 2.82 (1H, септ, $J = 6.9$, 15-CH); 6.86 (1H, с, Н-14); 6.97 (1H, д, $J_{12,11} = 8.2$ Н-12); 7.17 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 147.8 (C-9); 145.1 (C-13); 134.9 (C-8); 126.8 (C-14); 124.2 (C-11); 123.6 (C-12); 69.7 (C-18); 57.6 (C-21,25); 44.2 (C-5); 38.9 (C-4); 38.4 (C-1); 37.5 (C-10); 36.2 (C-3); 33.3 (C-15); 30.4 (C-7); 26.4 (C-22,24); 25.8 (C-20); 24.0 (C-23); 23.9 (C-16,17); 19.2 (C-6); 18.8 (C-2). Найдено, m/z : 353.3072 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}$. Вычислено, m/z : 353.3082.

1-{{(1R,4aS)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-азепан (5**).** Выход 0.515 г (40%), желтое масло. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.78 (3H, с, CH_3 -19); 1.18 (3H, с, 20- CH_3); 1.20 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.28–1.43 (3H, м, 5-CH, 6- CH_2); 1.45–1.60 (8H, м, 22,23,24,25- CH_2); 1.58–1.63 (2H, м, 1- CH_2); 1.63–1.72 (2H, м, 7- CH_2); 1.76–1.86 (4H, м, 2,3- CH_2); 2.47 и 2.11 (2H, д, $J = 14.5$, 18- CH_2); 2.64–2.71 (4H, м, 21,26- CH_2); 2.82 (1H, септ, $J = 6.9$, 15-CH); 6.86 (1H, с, Н-14); 6.96 (1H, д, $J_{12,11} = 8.2$, Н-12); 7.16 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 146.3 (C-9); 145.5 (C-13); 134.1 (C-8); 126.6 (C-14); 123.9 (C-11); 123.8 (C-12); 58.9 (C-18); 51.6 (C-21,26); 46.6 (C-5); 37.8 (C-22,25); 37.6 (C-4); 36.2 (C-1); 35.8 (C-10); 35.6 (C-3); 33.2 (C-15); 29.6 (C-23,24); 29.3 (C-7); 25.1 (C-20); 23.8 (C-17,16); 19.1 (C-6); 17.8 (C-2); 17.6 (C-19). Найдено, m/z : 367.3234 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}$. Вычислено, m/z : 367.3239.

Бис(2-бромэтиловый) эфир (7**).** Суспензию, состоящую из 5.0 г (0.035 моль) бис(2-хлорэтилового) эфира (**6**) и 8.3 г (0.07 моль) КВг в 150 мл смеси ДМФА–1,2-дибромэтан, 2:1, кипятят в течение 24 ч. Потом в реакционную смесь добавляют 50 мл насыщенного раствора NaCl и экстрагируют Et_2O . Растворитель сушат над Na_2SO_4 и упаривают в вакууме, остаток очищают перегонкой при пониженном давлении (4–5 торр). Выход 5.25 г (65%), темно-коричневое масло. Спектры ЯМР совпадают с литературными.²⁶

4-{{(1R,4aS)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-морфолин (8**).** Суспензию, состоящую из 0.42 г (1.5 ммоль) дегидроабиетиламина (**1**), 0.35 г (1.5 ммоль) дибромэтилового эфира **7** и 0.2 г (1.4 ммоль) K_2CO_3 в MeCN, кипятят в течение 24 ч, после чего осадок отфильтровывают и фильтрат упаривают в вакууме. Остаток подкисляют 1 мл конц. HCl, промывают Et_2O (3 \times 10 мл). Потом водный раствор разбавляют 1 мл H_2O , нейтрализуют 10% водным раствором NaOH и экстрагируют Et_2O (3 \times 10 мл). Органический экстракт сушат над Na_2SO_4 и упаривают в вакууме, остаток очищают методом колоночной хроматографии на

силикагеле (гексан–EtOAc, 20:1). Выход 0.267 г (51%), оранжевый порошок. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.83 (3H, с, 19- CH_3); 1.20 (3H, с, 20- CH_3); 1.22 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.36–1.54 (3H, м, 5- CH , 6- CH_2); 1.55–1.77 (4H, м, 2,3- CH_2); 1.31 (1H, д, $^2J = 12.8$) и 2.26 (1H, д, $^2J = 12.8$, 1- CH_2); 1.93 (1H, д, $J = 14.3$) и 2.32 (1H, д, $J = 14.3$, 18- CH_2); 2.49 (4H, т, $J = 4.4$, 21,24- CH_2); 2.71–2.90 (3H, м, 15- CH , 7- CH_2); 3.62 (4H, т, $J = 4.4$, 22,23- CH_2); 6.88 (1H, с, Н-14); 6.99 (1H, д, $J_{12,11} = 8.2$, Н-12); 7.18 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 146.1 (С-9); 145.5 (С-13); 133.2 (С-8); 126.3 (С-14); 123.8 (С-11); 123.6 (С-12); 72.8 (С-22,23); 62.6 (С-18); 55.8 (С-21,24); 47.0 (С-5); 37.8 (С-4); 37.4 (С-1); 37.3 (С-10); 36.4 (С-3); 33.0 (С-15); 29.3 (С-7); 24.9 (С-20); 23.5 (С-17,16); 19.1 (С-6); 17.8 (С-2,19). Найдено, m/z : 355.2859 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{NO}$. Вычислено, m/z : 355.2870.

2-{{(1R,4aS,10aR)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-изоиндолин-1-он (11). Раствор 0.16 г (0.58 ммоль) дегидроабиегиламина (1), 0.15 г (0.58 ммоль) орто-дибромксилола и 0.06 г (1.5 ммоль) NaOH в 50 мл диоксана при комнатной температуре перемешивают в течение 5 сут. Затем добавляют 5 мл H_2O , экстрагируют CHCl_3 (3×10 мл) и растворитель упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографии на силикагеле (гексан–EtOAc, 20:1). Выход 0.09 г (40%), белый порошок, т. пл. 168–170 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.04 (3H, с, 19- CH_3); 1.19 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.22 (3H, с, 20- CH_3); 1.35 (1H, д. д. д, $^2J = J_{1ax,2ax} = 13.0$, $J_{1ax,2eq} = 3.8$, 1- CH_{ax}); 1.49–1.61 (2H, м, 3- CH_2); 1.53 (1H, д. д. д, $J_{5,6ax} = 12.6$, $J_{5,6eq} = 2.2$, 5- CH); 1.65 (1H, д. д. д, $^2J = 13.5$, $J_{2eq,1ax} = 3.8$, $J_{2eq,1eq} = 3.0$, 2- CH_{eq}); 1.75 (1H, д. д. д. д. д, $^2J = J_{2ax,3ax} = 13.5$, $J_{2ax,1ax} = 13.0$, $J_{2ax,3eq} = J_{2ax,1eq} = 3.5$, 2- CH_{ax}); 1.83 (1H, д. д. д. д, $^2J = 13.4$, $J_{6ax,5ax} = 12.6$, $J_{6ax,7ax} = 12.0$, $J_{6ax,7eq} = 6.9$, 6- CH_{ax}); 2.12 (1H, д. д. д. д, $^2J = 13.4$, $J_{6eq,7ax} = 7.4$, $J_{6eq,5ax} = 2.2$, $J_{6eq,7eq} = 1.6$, 6- CH_{eq}); 2.26 (1H, д. д. д, $^2J = 13.0$, $J_{1eq,2ax} = 3.5$, $J_{1eq,2eq} = 3.0$, 1- CH_{eq}); 2.79 (1H, септ, $J = 6.9$, 15- CH); 2.90 (1H, д. д. д, $^2J = 17.3$, $J_{7ax,6ax} = 12.0$, $J_{7ax,6eq} = 7.4$, 7- CH_{ax}); 2.90 (1H, д. д. д, $^2J = 17.3$, $J_{7eq,6ax} = 6.9$, $J_{7eq,6eq} = 1.6$, 7- CH_{eq}); 3.44 (1H, д, $^2J = 14.1$) и 3.49 (1H, д, $^2J = 14.1$, 18- CH_2); 4.45 (1H, д, $^2J = 16.8$) и 4.49 (1H, д, $^2J = 16.8$, 28- CH_2); 6.88 (1H, д, $J_{14,12} = 1.8$, Н-14); 6.95 (1H, д. д, $J_{12,11} = 8.2$, $J_{12,14} = 1.8$, Н-12); 7.13 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11); 7.37 (1H, д. д. д, $J_{26,25} = 7.6$, $J_{26,24} = 0.8$, $J_{26,23} = 0.8$, Н-26); 7.42 (1H, д. д. д, $J_{24,23} = 7.7$, $J_{24,25} = 7.4$, $J_{24,26} = 0.8$, Н-24); 7.49 (1H, д. д. д, $J_{25,26} = 7.6$, $J_{25,24} = 7.4$, $J_{25,23} = 1.2$, Н-25); 7.81 (1H, д. д. д, $J_{23,24} = 7.7$, $J_{23,25} = 1.2$, $J_{23,26} = 0.8$, Н-23). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 169.9 (С-21); 147.1 (С-9); 145.5 (С-13); 141.4 (С-22); 134.5 (С-8); 132.4 (С-27); 131.2 (С-25); 127.8 (С-24); 126.8 (С-14); 123.9 (С-11); 123.7 (С-12); 123.6 (С-23); 122.3 (С-26); 55.0 (С-18); 54.0 (С-28); 45.4 (С-5); 39.5 (С-4); 38.2 (С-1); 37.5 (С-10); 37.4 (С-3); 33.3 (С-15); 30.0 (С-7); 25.5 (С-20); 23.8 (С-16,17); 19.2 (С-19); 19.1 (С-6); 18.6 (С-2). Найдено, m/z : 401.2712 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}$. Вычислено, m/z : 401.2713.

1-{{(1R,4aS)-7-Изопропил-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}метил}-

1H-пиррол (12). В раствор 0.21 г (0.74 ммоль) дегидроабиегиламина (1) и 0.14 г (1.11 ммоль) диметокситетрагидрофурана в 3 мл Et_2O добавляют 0.5 г глины К-10 и перемешивают в течение 5 мин после чего растворитель отгоняют в вакууме. Сухую смесь нагревают до окрашивания реакционной смеси в светло-коричневый цвет, после чего приливают 10 мл Et_2O , отфильтровывают глину и промывают ее Et_2O (3×10 мл) от остатков вещества. Полученное вещество очищают колоночной хроматографией на силикагеле (CHCl_3) промывом водным раствором аммиака. Выход 0.178 г (72%), коричневый порошок, т. пл. 100–102 °С. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 0.97 (3H, с, 19- CH_3); 1.19 (6H, д, $J = 6.9$, 16,17- CH_3); 1.22 (3H, с, 20- CH_3); 1.36–1.40 (1H, м, 1- CH_{ax}); 1.49–1.61 (3H, м, 3- CH_2 , 5- CH); 1.58–1.66 (1H, м, 2- CH_{eq}); 1.68–1.75 (1H, м, 2- CH_{ax}); 1.75–1.86 (1H, м, 6- CH_{ax}); 1.88–1.97 (1H, м, 6- CH_{ax}); 2.19–2.26 (1H, м, 1- CH_{eq}); 2.79 (1H, септ, $J = 6.9$, 15- CH); 2.80–2.95 (2H, м, 7- CH_2); 3.59 (1H, д, $J = 14.3$) и 3.84 (1H, д, $J = 14.3$, 18- CH_2); 6.06 (2H, т, $J = 2.1$, Н-22,23); 6.56 (2H, т, $J = 2.1$, Н-21,24); 6.88 (1H, д, $J_{14,12} = 1.8$, Н-14); 6.95 (1H, д. д, $J_{12,11} = 8.2$, $J_{12,14} = 1.8$, Н-12); 7.13 (1H, д, $J_{11,12} = 8.2$, Н-11). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 147.1 (С-9); 145.5 (С-13); 134.3 (С-8); 126.9 (С-14); 124.3 (С-11); 123.7 (С-12); 122.8 (С-22,23); 107.4 (С-21,24); 61.1 (С-18); 44.8 (С-5); 38.5 (С-4); 38.2 (С-1); 37.5 (С-10); 37.4 (С-3); 33.3 (С-15); 30.1 (С-7); 25.5 (С-20); 23.8 (С-16,17); 19.2 (С-19); 19.1 (С-6); 18.6 (С-2). Найдено, m/z : 335.2604 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}$. Вычислено, m/z : 335.2608.

Определение цитотоксичности соединений. Все синтезированные соединения протестированы на токсичность в отношении клеток MDCK. Готовят серию трехкратных разведений каждого из препаратов от 300 до 3 мкг/мл на среде MEM. Клетки инкубируют в течение 24 ч при 37 °С при концентрации CO_2 5% в присутствии растворенных препаратов, после чего степень деструкции клеточного монослоя оценивают при помощи микротетразолиевого теста (МТТ).²⁷ Готовят раствор МТТ (Calbiochem № 475989) (0.5 мкг/мл) на физиологическом растворе. Раствор МТТ вносят в предварительно отмытые от среды лунки с клетками в объеме 0.1 мл. После 2 ч контакта МТТ с клетками лунки промывают и заливают 0.1 мл ДМСО, после чего оптическую плотность клеток измеряют на приборе Perkin ElmerVictor 2 при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывают 50% цитотоксическую концентрацию каждого из соединений, т. е. концентрацию препарата, при которой происходит деструкция 50% клеточного монослоя.

Определение противовирусной активности соединений. Из исследуемых соединений готовят серию разведений (300–3 мкг/мл). В монослойную культуру клеток MDCK на 96-луночном планшете добавляют изучаемые соединения, растворенные в клеточной среде, и выдерживают планшеты в CO_2 -инкубаторе 1 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 . Далее клеточную культуру заражают вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 при множественности инфицирования 0.01TCID₅₀ на клетку. Микропланшеты с вирусом и препаратами

инкубируют 24 ч при 37 °С и 5% CO₂. Инфекционную активность вируса оценивают при помощи титрования вирусного потомства в культуре клеток МДСК. Для этого из культуральной жидкости готовят серию десятикратных разведений (10⁻¹–10⁻⁷), заражают этими разведениями монослой клеток и инкубируют 48 ч при 37 °С и 5% CO₂. Наличие вируса в лунках определяют при помощи реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Для этого в лунки круглодонного микропланшета для иммунологических реакций добавляют 100 мкл вирусосодержащей среды из соответствующей лунки планшета для клеточных культур, после чего в лунки вносят равное количество 1% суспензии куриных эритроцитов. Реакцию учитывают через 30–40 мин при комнатной температуре. За титр вируса принимают наибольшее разведение вируса, вызвавшее полную агглютинацию эритроцитов. На основании полученных данных рассчитывают 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) каждого из соединений, т. е. концентрацию, снижающую вирусный титр вдвое, по сравнению с контролем без препаратов, и индекс селективности (SI, отношение CC₅₀/IC₅₀).

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант 15-13-0017).

Авторы выражают благодарность Химическому сервисному центру коллективного пользования СО РАН за проведение спектральных и аналитических исследований.

Список литературы

- Sandermann, W. *Naturharze, Terpentinöl, Yallö 1. Chemie und Technologie*; Springer: Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1960, p. 483
- SDBSWeb: <http://www.thsci.com/35928-32-6/Leelamine.html>
- Zhao, X.; Song, D. K.; Radbil', A. B.; Radbil', B. A. *Russ. J. Appl. Chem.* **2007**, 80, 1373. [*Zh. Prikl. Khim.* **2007**, 1334.]
- Luo, H.; Sui, Y.; Lin, W.-H.; Wu, H.-Q. *Indian J. Chem., Sect B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2016**, 55B, 248.
- Robertson, G. P.; Raghavendragowda, C. D.; Madhunapantula, S. V.; Kuzu, O. F.; Inamdar, G. S. US Patent 2012141578.
- Gowda, R.; Madhunapantula, S. V.; Kuzu, O. F.; Sharma, A.; Gavin, R. P. *Cancer Res.* **2013**, 73, 5509.
- Fu, L.; Ling, H.; Zhan-Qian, S.; Jin-Cheng, Y.; Xiao-Ping, R.; Hai-Tao, L. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, 60, 205.
- Pirttimaa, M.; Nasereddin, A.; Kopelyanskiy, D.; Kaiser, M.; Yli-Kauhahuoma, J.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Brun, R.; Jaffe, C. L.; Moreira, V. M.; Alakurtti, S. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 362.
- Dea-Ayuela, M. A.; Bilbao-Ramos, P.; Bolás-Fernández, F.; González-Cardenete, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 121, 445.
- Fei, B. L.; Huang, Z. X.; Xu, W. S.; Li, D. D.; Lu, Y.; Gao, W. L.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Liu, Q. B. *J. Photochem. Photobiol., B* **2016**, 160, 43.
- Roa-Linares, V. C.; Brand, Y. M.; Agudelo-Gomez, L. S.; Tangarife-Castaño, V.; Betancur-Galvis, L. A.; Gallego-Gomez, J. C.; González, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 108, 79.
- Malkowsky, I. M.; Nieger, M.; Kataeva, O.; Waldvogel, S. R. *Synthesis* **2007**, 773.
- Binder, C. M.; Bautista, A.; Zaidlewicz, M.; Krzemiński, M. P.; Oliver, A.; Singaram, B. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2337.
- Subbarayappa, A.; Patoliya, P. U. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2009**, 48B, 545.
- Chapman, J. M.; Cocolas, G. H.; Hall, I. H. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 243.
- Norman, M. H.; Minick, D. J.; Rigdon, G. C. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 149.
- Feng, S.; Panetta, C. A.; Graves, D. E. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 612.
- Das, S.; Addis, D.; Knöpke, L. R.; Bentrup, U.; Junge, K.; Brückner, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 9180.
- Masui, M.; Hara, S.; Ueshima, T.; Kawaguchi, T. *Chem. Pharm. Bul.* **1983**, 31, 4209.
- Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Howard-Jones, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 517.
- Lee, C. K.; Jun, J. H.; Yu, J. S. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, 37, 15.
- Abid, M.; Landge, S. M.; Török, B. *Org. Prep. Proced. Int.* **2006**, 38, 495.
- González, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87, 834.
- Tagat, J. R.; Nazareno, D. V.; Puar, M. S.; McCombie, S. W.; Ganguly, A. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1101.
- Agudelo-Gómez, L. S.; Betancur-Galvis, L. A.; González, M. A. *Pharmacologyonline* **2012**, Special Issue, 1, 36.
- Bérubé, G.; Rabouin, D.; Perron, V.; N'Zemba, B.; Gaudreault, R. C.; Parent, S.; Asselin, E. *Steroids* **2006**, 71, 911.
- Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.