

## Строение и антибактериальная активность (опосредованная SOS-ответом) спиропиперидиниевых солей, полученных циклизацией оснований Манниха арилалифатических 1,5-дикетонов

Алексей В. Букреев<sup>1</sup>, Таисия И. Акимова<sup>1\*</sup>, Илья А. Остерман<sup>2,3</sup>, Анна Н. Шахтина<sup>3</sup>,  
Юлия В. Худякова<sup>4</sup>, Андрей В. Герасименко<sup>5</sup>, Петр В. Сергиев<sup>2,3</sup>, Ольга А. Донцова<sup>2,3,6</sup>,  
Павел И. Дерябин<sup>1</sup>, Вера Б. Колычева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук,  
пр. Университетский, к. L, о. Русский, Владивосток 690622, Россия; e-mail: akimova.tiv@dvfu.ru

<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, центр Науки о жизни,  
Большой бульвар, 30, Москва 143025, Россия; e-mail: Osterman@skoltech.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва 119992, Россия; e-mail: osterman@yandex.ru

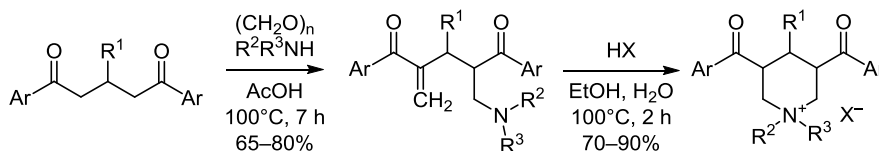
<sup>4</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН,  
пр. 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток 690022, Россия; e-mail: 161070@rambler.ru

<sup>5</sup> Институт химии ДВО РАН,  
пр. 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток 690022, Россия; e-mail: gerasimenko@ich.dvo.ru

<sup>6</sup> Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва 117997, Россия  
e-mail: dontsova@belozersky.msu.ru

Поступило 28.02.2020

Принято после доработки 15.04.2020



Ar = Ph, thiophen-2-yl; R<sup>1</sup> = H, Me, Ph  
NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = NMe<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O  
X = Cl, ClO<sub>4</sub>, *p*-TsO, (4-HO)(3-HO<sub>2</sub>C)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>

Ранее разработанным методом циклизации метилиденмонооснований Манниха арилалифатических 1,5-дикетонов получены новые производные 3,5-дibenзоилспиропиперидиниевых солей и изучена их антибактериальная активность. Пространственная структура одной из солей определена методом рентгенструктурного анализа. Изучение механизма действия с помощью репортерной системы pDualger2 показало, что некоторые соединения вызывают SOS-ответ в бактериальной клетке.

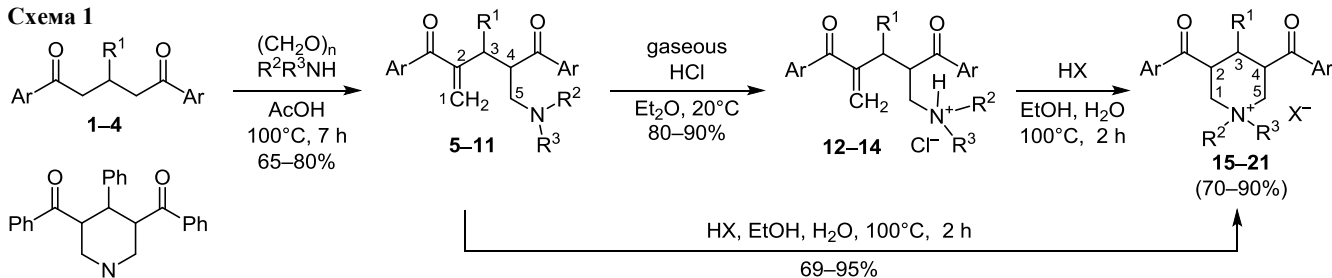
**Ключевые слова:** 1,5-дикетоны, основания Манниха, соли спиропиперидиния, четвертичные аммониевые соли, антибактериальная активность, SOS-ответ.

Четвертичные аммониевые соли, к числу которых относятся спиропиперидиниевые соли, могут использоваться для получения ионных жидкостей, в том числе неводных электролитов.<sup>1</sup> С другой стороны, эти соединения оказались биологически активными веществами с анальгетическим<sup>2</sup> и антимикробным действием.<sup>3</sup> Некоторые антипсихотики были синтезированы на их основе.<sup>4</sup> Также можно отметить, что различные произ-

водные 3,5-дibenзоил-4-фенилпиперидина показали противоопухолевую активность.<sup>5</sup>

В настоящее время одной из важнейших проблем является бактериальная резистентность к антибиотикам.<sup>6</sup> В связи с этим разработка методов синтеза и поиск новых потенциальных антибиотиков является важным направлением исследований. Для большинства из полученных нами в этой работе спиропипери-

Схема 1



22, 23

- 1 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph; 2 R<sup>1</sup> = Me, Ar = Ph; 3 R<sup>1</sup> = H, Ar = Ph; 4 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = thiophen-2-yl  
 5 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; 6 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O; 7 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>;  
 8 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me; 9 R<sup>1</sup> = Me, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O; 10 R<sup>1</sup> = H, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O;  
 11 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = thiophen-2-yl, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>;  
 12 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, X = Cl; 13 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O, X = Cl;  
 14 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, X = Cl;  
 15 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, X = Cl; 16 a-d R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O, a X = Cl, b X = ClO<sub>4</sub>,  
 c X = 4-HO-3-(HO<sub>2</sub>C)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, d X = *p*-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>; 17 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, X = Cl;  
 18 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = Ph, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = Me, X = Cl; 19 R<sup>1</sup> = Me, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O, X = Cl;  
 20 R<sup>1</sup> = H, Ar = Ph, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O, X = Cl; 21 R<sup>1</sup> = Ph, Ar = thiophen-2-yl, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, X = Cl  
 22 R = CH<sub>2</sub>Ph; 23 R = Me

диниевых солей, а также исходных оснований Манниха и их гидрохлоридов, учитывая известную полифункциональную биоактивность оснований Манниха,<sup>7</sup> была исследована антибактериальная активность с изучением механизма действия с помощью репортерной системы *pDualrep2*. Некоторые соединения индуцируют SOS-ответ, вызванный, вероятно, повреждением ДНК.

Ранее основным способом получения спироаммониевых солей являлось взаимодействие циклических вторичных аминов с дихлоралканами.<sup>1-4</sup> Мы разработали новый способ получения такого типа соединений на основе арилалифатических 1,5-дикетон<sup>8</sup> в реакции Манниха эти дикетоны при соотношении реагентов дикетон – параформ – вторичный амин (морфолин, пиперидин, диметиламин) 1:2:2 в AcOH образуют  $\alpha$ -метилен- $\alpha'$ -аминометилдикетоны 5–11 вместо бисоснований Манниха.<sup>9</sup> Полученные соединения способны образовывать два типа солей. При пропускании газообразного HCl через эфирный раствор оснований 5–11 выпадают гидрохлориды 12–14 (схема 1). При нагревании водно-спиртового раствора оснований 5–11 с концентрированной HCl происходит нуклеофильное присоединение амина по сопряженной связи C=C с образованием спиропиперидиниевых солей 15–21.<sup>8</sup> В этих же условиях происходит превращение гидрохлоридов 12–14 в спироаммониевые соли 15–21.<sup>8</sup>

В данную работу мы дополнительно включили дикетон 4 с тиофенильным заместителем,<sup>10</sup> рассчитывая, что серосодержащий фрагмент внесет особенности в биоактивность соединений. На его основе в соответствии со схемой 1 получили новые соединения – основание Манниха 11 и спироаммониевая соль 21. Также на основе дикетона 1 и пирролидина получили ранее неописанные соединения с пирролидиновым фрагментом – основание Манниха 5, его гидрохлорид 12 и спироаммониевая соль 15. Именно эти соединения показали наибольшую антибактериальную активность для культуры грамотрицательной *Escherichia coli*.

Спироаммониевые соли 15 и 21, а также ранее полученные спироаммониевые соли 16–20<sup>8</sup> хорошо растворимы в воде, химически устойчивы и имеют температуру плавления выше 200 °C. Известные спироаммониевые соли без бензоильных заместителей имеют низкие температуры плавления и являются ионными жидкостями.<sup>1</sup>

Строение новых соединений 5, 11, 15, 21 подтверждено спектроскопией ИК, ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (с экспериментом DEPT-135) и масс-спектрометрией, а соли 12 – ИК спектроскопией и элементным анализом. Данные спектров ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C спироаммониевых солей 15, 21 также сравнивали с ранее опубликованными данными<sup>8</sup> для спироаммониевых солей 16, в спектрах которых отнесение сигналов сделано с помощью 2D экспериментов COSY, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMBSC и <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC. В ИК спектрах спироаммониевых солей 15, 21 присутствует широкая полоса поглощения при 3400 см<sup>-1</sup>, что отмечалось и в работах других авторов,<sup>1a</sup> связанная с удерживанием воды. При сушке солей в вакууме при 100 °C эта полоса в ИК спектрах исчезает. Данные спектров ЯМР <sup>13</sup>C, записанных с экспериментом DEPT-135, соединений 5, 11, 15, 21 хорошо согласуются с числом и месторасположением сигналов вторичных, третичных и четвертичных атомов углерода. Данные спектров ЯМР <sup>1</sup>H также подтверждают строение, а для спироаммониевых солей 15, 21 позволяют сделать вывод о стереохимии этих соединений. Таким определяющим фактором является сигнал бензильного протона 3-CH. Во всех спироаммониевых солях, в том числе солях 15, 21, он находится в области 3.63–3.71 м. д. и проявляется триплетом с большим значением константы (11.4–11.6 Гц), что свидетельствует о его аксиальном расположении в пиперидиниевом цикле и о взаимодействии с аксиальными протонами в соседних положениях 2-CH и 4-CH. Эти протоны дают в спектре совмещенный сигнал в области около 4.56–5.06 м. д. в виде мультиплетов. Из этого следует, что все заместители пиперидиниевого цикла – два бензоильных фрагмента и фенил – располагаются в экваториальном положении.

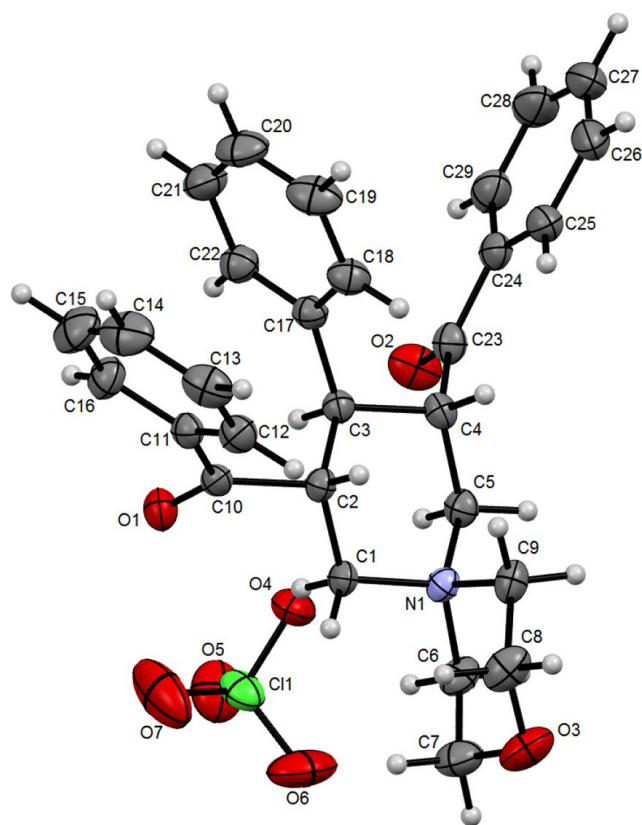
Для доказательства пространственного строения спиросолей мы сделали рентгеноструктурный анализ родственной для солей **15**, **21** спиросоли **16b** (получена из того же дикетона **1**, что и соль **15**), спектры ИК, ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  которой полностью соответствуют этим же спектрам соединений **15**, **21**. Спектральные данные соединения **16b** с отнесением сигналов с помощью 2D экспериментов COSY,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC и  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC описаны ранее.<sup>8</sup> Соединение **16b** получено из основания Манниха **6** нагреванием в водно-спиртовом растворе с  $\text{HClO}_4$ .<sup>8</sup>

Как показано на рис. 1, молекула соли **16b** представляет собой трехмерную структуру, состоящую из двух ортогонально расположенных шестичленных циклов, циклогесанового и морфолинового, объединенных спироатомом азота, находящихся в конформациях "кресло". Два бензоильных и фенильный заместитель занимают в пиперидиновом цикле экваториальное положение. Фенильный заместитель у атома C-3 отклоняется в сторону бензоильного заместителя C-2, по-видимому, из-за  $\pi$ – $\pi$ -стекинг-взаимодействий.<sup>11</sup>

Для исследования биологической активности взяты новые, полученные в данной работе соединения **5**, **11**, **12**, **15**, **21**, а также полученные ранее основания Манниха **6**–**10**,<sup>9</sup> гидрохлориды **13**, **14**<sup>9</sup> и спиропиперидиновые соли **16**–**20**<sup>8</sup> (табл. 1). Чтобы выяснить влияние аниона на биоактивность соединения, мы использовали спиросоли **16a**–**d**, содержащие различные анионы при одном и том же катионе. Все они получены нагреванием основания Манниха **6** в водно-спиртовом растворе с различными кислотами –  $\text{HCl}$  (соль **16a**),  $\text{HClO}_4$  (соль **16b**), сульфосалициловой (соль **16c**) и *p*-TsOH (соль **16d**).<sup>8</sup> По этой же методике мы получили спиросоли **15**, **21**.

Антибактериальная активность была определена методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков (для веществ **5**–**11**, **14**, **16a**–**d**, **17**, **19**, **21**, растворимых в летучих растворителях (EtOH)) и лунок (для водорастворимых веществ **12**, **13**, **15**, **18**).<sup>12</sup> Метод основан на способности веществ диффундировать в агар, зараженный определенным тест-микробом. В качестве тестеров для определения антибактериальной активности использовали грамположительные бактериальные культуры *Bacillus subtilis* (KMM 430), *Staphylococcus aureus* (ATCC 21027) и грамотрицательные бактериальные культуры *Pseudomonas aeruginosa* (KMM 433) и *Escherichia coli* (VKPM (B-8208) M-17). В табл. 1 указан диаметр зоны подавления роста тест-культуры в мм.

Наиболее активными оказались производные, содержащие пирролидиновый фрагмент: основание Манниха **5** и его гидрохлорид **12** действуют против всех четырех видов бактерий, а соответствующая спиросоль **15** против двух грамотрицательных бактерий. Активными также оказались производные морфолина: основание **6** и его соль **13** проявили активность против трех бактерий, а из соответствующих спиросолей **16a**–**d**, отличающихся анионами, активной оказалась только соль с сульфосалицилатным анионом **16c**, спиросоли **16a**, **b**, **d**



**Рисунок 1.** Молекулярная структура соединения **16b** в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 50% вероятностью.

**Таблица 1.** Антибактериальная активность изучаемых соединений\*

Соединение	Диаметр зоны подавления роста колонии микроорганизма**, мм			
	<i>Bacillus subtilis</i> (KMM 430)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 21027)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KMM 433)	<i>Escherichia coli</i> (VKPM (B-8208) M-17)
<b>5</b>	15	15	10	15
<b>6</b>	20	10		20
<b>12</b>	15	20	<10	25
<b>13</b>	15	15		20
<b>15</b>			<10	15
<b>16c</b>	10	15		
<b>17</b>		15		10
<b>18</b>		20		10
<b>19</b>		10		
<b>20</b>	20	25		

\* Концентрация 20 мг/мл.

\*\* Отмечены только положительные результаты.

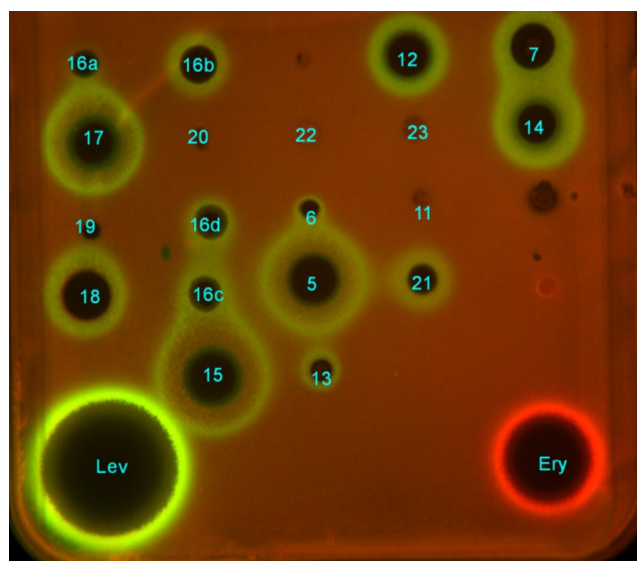
биоактивности не проявили. Подобную активность проявило и соединение **20** с морфолиновым фрагментом ( $R^1 = H$ ). Взятые для сравнения производные 3,5-дibenзоил-4-фенилпиперидина **22** и **23**, которые по литературным данным обладают противоопухолевой активностью,<sup>5</sup> антибактериальной активности не проявили. В целом у взятых оснований Манниха и их солей наибольшая активность наблюдается в отношении штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 грамположительной бактериальной культуры и в отношении штамма *Escherichia coli* VKPM (B-8208) M-17 грамотрицательной бактериальной культуры.

Все приведенные соединения были протестированы также на противогрибковую активность (*Candida albicans* КММ 455) и показали отрицательный результат.

Механизм антибактериального действия полученных соединений оценивали с помощью репортерной плазмиды pDualrep2 (PMID-27736765),<sup>13</sup> несущей гены двух красных флуоресцентных белков – TurboRFP и Katushka2S. Количество белка TurboRFP увеличивается в присутствии антибиотиков, индуцирующих SOS-ответ, таких как, например, левофлоксацин, ингибитор ДНК-гиразы (на рис. 2 TurboRFP обозначен зеленым псевдоцветом). Количество белка Katushka2S возрастает в присутствии ингибиторов синтеза белка (красный псевдоцвет), в качестве контроля использован эритромицин, макролид, блокирующий продвижение рибосомы по мРНК. Штамм *Escherichia coli* с делецией гена белка TolC, обеспечивающего активный транспорт метаболитов, в том числе антибиотиков, из клетки был использован для повышения чувствительности метода: этот штамм, трансформированный плазмидой dDualrep2, наносили в виде газона на поверхность чашки Петри, затем при помощи метода диффузии в агар анализировали активность и механизм действия изучаемых соединений.

Все активные соединения индуцируют SOS-ответ, что свидетельствует о вероятном повреждении ДНК в обработанных клетках. Такими оказались соединения с пирролидиновым фрагментом **5**, **12**, **15**, а также с пиперидиновым фрагментом **7**, **14**, **17**. Выраженный SOS-ответ вызвало и соединение **18** с диметильными заместителями у атома азота. Основание Манниха **11**, полученное на основе дикетона **4** с тиофеновыми заместителями взаимодействием с пиперидином, не проявило антибактериальной активности, а его спиро-соль **21** вызвала лишь слабый SOS-ответ. Приблизительно одинаково слабые SOS-ответы наблюдали у солей **16b–d** и отсутствие ответа у соли **16a**.

Таким образом, используя разработанный нами ранее способ получения спиропиперидиниевых солей на основе метилденмонооснований Манниха арил-алифатических 1,5-дикетонов, мы расширили круг соединений, получив для испытаний на биологическую активность структуры с пирролидиновым и тиофенильным фрагментами. Методом кристаллографии определили пространственное строение одной из спиропиперидиниевых солей. При исследовании антибактериальной активности с изучением механизма действия



**Рисунок 2.** Влияние синтезированных соединений на двойную репортерную систему dDualrep2 *E. coli*, чувствительную к ингибиторам синтеза белка (эритромицин, Ery) или индукторам SOS-ответа (левофлоксацин, Lev).

с помощью репортерной системы pDualrep2 установили, что SOS-ответ, вероятно, вызванный повреждением ДНК, индуцируют не только спиропиперидиниевые соли, но и исходные метилденмонооснования Манниха и их гидрохлориды. В этой цепочке основным фармакофором, по-видимому, является аминный фрагмент, введенный в молекулу на стадии синтеза основания Манниха.

### Экспериментальная часть

ИК спектры зарегистрированы на спектрометре Bruker V25 в таблетках KBr. Спектры ЯМР  $^1H$  и  $^{13}C$  записаны на спектрометре Bruker Avance 400 (400 и 100 МГц соответственно) в  $DMCO-d_6$ , внутренний стандарт TMS. Отнесения в спектрах ЯМР  $^{13}C$  сделаны на основании экспериментов DEPT-135 и ранее опубликованных спектров аналогов.<sup>8</sup> Масс-спектры высокого разрешения записаны на хромато-масс-спектрометре Agilent 6210 TOFLC/MS System в режиме ионизации электрораспылением, регистрация положительных и отрицательных ионов на жидкостном хроматографе HPLCAgilent 1200. Температуры плавления определены на приборе Buchi B-540 в капилляре. Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществлен методом ТСХ на пластинах Silufol и Sorbfil в системе EtOAc–гексан, 1:5, проявление в парах иода и УФ свете.

Дикетоны **1**,<sup>14a</sup> **2**, **3**,<sup>14b</sup> **4**<sup>10</sup> получены по литературным методикам. Соединения **22**, **23** получены присоединением метиламина и бензиламина соответственно к производному дикетона **1** –  $\alpha, \alpha'$ -диметилден-1,3,5-трифенилпентан-1,5-диону – по описанной методике.<sup>15</sup> Образуются в виде смеси двух стереоизомерных форм в соотношении  $\alpha$ -форма– $\beta$ -форма = 3:1. Общий выход 96%. Используются  $\alpha$ -формы. Соединение **22**, т. пл. 209–210 °С, соединение **23**, т. пл. 143–144 °С.

**Получение оснований Манниха 5–11** (общая методика). Раствор 0.003 моль diketона 1–4, 0.008 моль параформальдегида, 0.008 моль амина (пирролидина, морфолина, пиперидина или диметиламина) в 20 мл АсОН нагревают на кипящей водяной бане в течение 7 ч. Кислоту отгоняют, остаток экстрагируют H<sub>2</sub>O (4 × 5 мл), водную вытяжку промывают Et<sub>2</sub>O (4 × 4 мл). К водному раствору добавляют раствор КОН до pH 10–12. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают 3 мл холодного EtOH и 6 мл H<sub>2</sub>O.

**2-Метилиден-4-(пирролидин-1-илметил)-1,3,5-трифенилпентан-1,5-дион (5)**. Выход 0.918 г (77%), белый порошок, т. пл. 134–135 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1492, 1579, 1595 (Ph), 1653, 1673 (C=O). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H,  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 1.39–2.11 (6H, м, 3CH<sub>2</sub> пирролидин); 2.21–2.25 (1H, м, 5-CH); 2.33–2.37 (2H, м, CH<sub>2</sub> пирролидин); 2.81 (1H, т, *J* = 10.0, 5-CH); 4.39 (1H, д, *J* = 11.4, 3-CH); 4.74 (1H, т, д, *J* = 10.8, *J* = 2.7, 4-CH); 5.39 (1H, с, 1-CH); 6.20 (1H, с, 1-CH); 7.21–7.65 (15H, м, H Ph). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C,  $\delta$ , м. д.: 23.2 (CH<sub>2</sub> пирролидин); 23.2 (CH<sub>2</sub> пирролидин); 54.1 (2CH<sub>2</sub> пирролидин); 58.9 (C-5); 47.5 (C-3(4)); 47.8 (C-4(3)); 126.0 (C-1); 126.7 (C Ph); 128.3 (C Ph); 128.4 (C Ph); 128.7 (C Ph); 129.0 (C Ph); 132.4 (C Ph); 133.1 (C Ph); 137.1 (C Ph); 138.0 (C Ph); 141.1 (C Ph); 149.0 (C Ph); 196.9 (C=O); 203.5 (C=O). Найдено, *m/z*: 424.2284 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>. Вычислено, *m/z*: 424.2271.

**2-Метилиден-4-(морфолин-1-илметил)-1,3,5-трифенилпентан-1,5-дион (6)**.<sup>9</sup> Выход 1.05 г (80%), белые кристаллы, т. пл. 122–124 °С.

**2-Метилиден-4-(пиперидин-1-илметил)-1,3,5-трифенилпентан-1,5-дион (7)**.<sup>9</sup> Выход 0.88 г (67%), бесцветные иглы, т. пл. 146–148 °С.

**2-Метилиден-4-(1,1-диметиламинометил)-1,3,5-трифенилпентан-1,5-дион (8)**.<sup>9</sup> Выход 0.82 г (68%), белые кристаллы, т. пл. 115–117 °С.

**2-Метилиден-4-(морфолин-1-илметил)-3-метил-1,5-дифенилпентан-1,5-дион (9)**.<sup>9</sup> Выход 0.71 г (63%), белые кристаллы, т. пл. 141–142 °С.

**2-Метилиден-4-(морфолин-1-илметил)-1,5-дифенилпентан-1,5-дион (10)**.<sup>9</sup> Выход 0.65 г (60%), белые кристаллы, т. пл. 109–111 °С.

**2-Метилиден-4-(пиперидин-1-илметил)-1,5-ди-(тиофен-2-ил)-3-фенилпентан-1,5-дион (11)**. Выход 0.87 г (65%), белый порошок, т. пл. 174–175 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1413 (тиофен), 1515 (Ph), 1649 (C=O). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H,  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 1.64–2.50 (10H, м, 5CH<sub>2</sub> пиперидин); 2.71–2.75 (2H, м, 5-CH<sub>2</sub>); 3.85 (1H, д, *J* = 11.4, 3-CH); 4.96 (1H, т, д, *J* = 11.9, *J* = 3.4, 4-CH); 5.61 (1H, с, 1-CH); 6.35 (1H, с, 1-CH); 6.66–7.99 (11H, м, H Ph, H тиофен). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C,  $\delta$ , м. д.: 36.1 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 43.2 (2CH<sub>2</sub> пиперидин); 53.7 (2CH<sub>2</sub> пиперидин); 46.5 (C-3(4)); 46.7 (C-4(3)); 57.6 (C-5); 126.4 (C-1); 126.8 (C Ar); 127.5 (C Ar); 127.9 (C Ar); 128.2 (C Ar); 129.2 (C Ar); 132.8 (C Ar); 133.3 (C Ar); 135.1 (C Ar); 135.8 (C Ar); 140.7 (C Ar); 143.3 (C Ar); 146.3 (C Ar); 194.4 (C=O); 196.4 (C=O). Найдено, *m/z*: 450.1549 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено *m/z*: 450.1556.

**Получение гидрохлоридов оснований Манниха 12–14** (общая методика). Через раствор 0.3 г оснований

Манниха 5–7 в 20–25 мл Et<sub>2</sub>O пропускают газообразный HCl, полученный добавлением концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> к NaCl, при температуре 20 °С в течение 20 мин. Выпавший осадок гидрохлоридов 12–14 отфильтровывают, промывают 5 мл Et<sub>2</sub>O.

**Гидрохлорид 2-метилиден-1,3,5-трифенил-4(пирролидин-1-ил)пентан-1,5-диона (12)**. Выход 0.28 г (86%), белый порошок, т. пл. 177–178 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1580, 1596 (Ph), 1657, 1679 (C=O), 2400–2630 (>N<sup>+</sup>-H). Найдено, %: C 75.73; H 6.31; N 3.05. C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>2</sub>·HCl. Вычислено, % C 75.72; H 6.57; N 3.04. Записать спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C гидрохлорида не удалось вследствие легкого превращения его в среде растворителя в спиросоли 15.

**Гидрохлорид 2-метилиден-1,3,5-трифенил-4(морфолин-1-ил)пентан-1,5-диона (13)**.<sup>9</sup> Выход 0.29 г (91%), белые кристаллы, т. пл. 170–172 °С.

**Гидрохлорид 2-метилиден-1,3,5-трифенил-4(пиперидин-1-ил)пентан-1,5-диона (14)**.<sup>9</sup> Выход 0.29 г (88%), белые кристаллы, т. пл. 184–186 °С.

**Получение спиросолой 15–21** (общая методика). Раствор 0.002 моль основания Манниха 5–11, 1 мл (0.004 моль) 36.5% HCl в 20 мл EtOH и 10 мл H<sub>2</sub>O кипятят в течение 2 ч. Растворитель отгоняют при пониженном давлении, остаток перекристаллизовывают из EtOH. При получении спиросоли 16b вместо HCl добавляют 0.24 мл 85% HClO<sub>4</sub> (0.004 моль), при получении спиросоли 16c добавляют 0.87 г (0.004 моль) сульфосалициловой кислоты, при получении спиросоли 16d – 0.68 г (0.004 моль) *para*-толуолсульфокислоты.

**Хлорид 7,9-добензоил-8-фенил-5-азониаспиро[4.5]декана (15)** получают из основания Манниха 5. Выход 0.64 г (70%), белый порошок, т. пл. 227–229 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1496, 1580, 1596 (Ph), 1679 (C=O), 3410 (H<sub>2</sub>O). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H,  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 2.20–2.25 (4H, м, 2CH<sub>2</sub> пирролидин); 3.71 (1H, т, *J* = 11.6, 3-CH); 3.96–4.05 (8H, м, 1,5-CH<sub>2</sub>, 2CH<sub>2</sub> пирролидин); 5.00–5.06 (2H, м, 2,4-CH); 6.46 (2H, д, *J* = 7.51, H-2,6 PhC); 6.90–7.04 (3H, м, H PhC); 7.46–7.63 (7H, м, H Ph); 7.94–7.96 (4H, м, H-2,6 PhCO). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C,  $\delta$ , м. д.: 20.5 (CH<sub>2</sub> пирролидин); 21.4 (CH<sub>2</sub> пирролидин); 55.7 (2CH<sub>2</sub> пирролидин); 39.7 (C-8); 43.1 (C-7(9)); 43.3 (C-9(7)); 59.1 (C-5(6)); 67.9 (C-6(5)); 127.6 (2C Ph); 127.8 (2C Ph); 128.3 (4C Ph); 128.7 (4C Ph); 129.3 (C Ph); 133.6 (2C Ph); 134.9 (C Ph); 135.3 (C Ph); 135.5 (C Ph); 197.7 (2C=O). Найдено, *m/z*: 424.2282 [M]<sup>+</sup>. C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>. Вычислено, *m/z*: 424.2271.

**Хлорид 8,10-добензоил-9-фенил-3-окса-6-азониаспиро[5.5]ундекана (16a)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 6. Выход 0.9 г (95%), белые кристаллы, т. пл. 223–224 °С (т. пл. 224 °С<sup>8</sup>).

**Перхлорат 8,10-добензоил-9-фенил-3-окса-6-азониаспиро[5.5]ундекана (16b)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 6. Выход 0.82 г (76%), белые кристаллы, т. пл. 234–235 °С (т. пл. 235 °С<sup>8</sup>).

**4-Гидрокси-3-карбоксібенолсульфонат 8,10-добензоил-9-фенил-3-окса-6-азониаспиро[5.5]ундекана (16c)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 6. Выход 0.9 г



(69%), белые кристаллы, т. пл. 240–242 °С (т. пл. 242 °С<sup>8</sup>).

**4-Метилбензолсульфонат 8,10-дibenzoил-9-фенил-3-окса-6-азониаспирос[5,5]ундекана (16d)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 6. Выход 0.93 г (76%), белые кристаллы, т. пл. 220–222 °С (т. пл. 222 °С<sup>8</sup>).

**Хлорид 2,4-дibenzoил-3-фенил-6-азониаспирос[5,5]ундекана (17)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 7. Выход 0.83 г (87%), белые кристаллы, т. пл. 201–202 °С (т. пл. 202 °С<sup>8</sup>).

**Хлорид 3,5-дibenzoил-1,1-диметил-4-фенилпиперидина (18)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 8. Выход 0.81 г (93%), белые кристаллы, т. пл. 249–250 °С (т. пл. 250 °С<sup>8</sup>).

**Хлорид 8,10-дibenzoил-9-метил-3-окса-6-азониаспирос[5,5]ундекана (19)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 9. Выход 0.78 г (95%), белые кристаллы, т. пл. 229–231 °С (т. пл. 231 °С<sup>8</sup>).

**Хлорид 8,10-дibenzoил-3-окса-6-азониаспирос[5,5]ундекана (20)**<sup>8</sup> получают из основания Манниха 10. Выход 0.62 г (85%), белый порошок, т. пл. 225–227 °С.

**Хлорид 3-фенил-2,4-бис(тиофен-2-илкарбонил)-6-азониаспирос[5,5]ундекана (21)** получают из основания Манниха 11. Выход 0.80 г (83%), т. пл. 239–240 °С. ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1413 (тиофен), 1515, 1605 (Ph), 1652 (C=O). 3433.0 (OH). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H,  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 1.55–1.57 (2H, м), 1.84–1.86 (4H, м) и 3.55–3.60 (4H, м, CH<sub>2</sub> пиперидин); 3.63 (1H, т, *J* = 11.4, 3-CH); 4.10–4.13 (4H, м, 1,5-CH<sub>2</sub>); 4.56–4.59 (2H, м, 2,4-CH); 6.94 (1H, т, *J* = 7.3, H-4 Ph); 7.03 (2H, т, *J* = 7.8, H-3,5 Ph); 7.17 (2H, т, *J* = 4.8, H тиофен); 7.43 (2H, д, *J* = 7.3, H-2,6 Ph); 8.00 (2H, д, *J* = 3.5, H тиофен); 8.03 (2H, д, *J* = 3.6, H тиофен). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C,  $\delta$ , м. д.: 18.9 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 19.0 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 21.2 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 56.0 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 58.7 (CH<sub>2</sub> пиперидин); 43.7 (2C-2(4)); 47.2 (C-3); 64.4 (2C-1(5)); 127.4 (C Ar); 128.1 (2C Ar); 128.6 (2C Ar); 129 (2C Ar); 135.2 (2C Ar); 137.2 (2C Ar); 137.6 (C Ph); 143.0 (2C тиофен); 190.2 (2C=O). Найдено, *m/z*: 450.1557 [M]<sup>+</sup>. C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, *m/z*: 450.1556.

**Антибактериальная активность полученных соединений** определена методом диффузии в агар<sup>12</sup> с использованием лунок для веществ, растворимых в H<sub>2</sub>O (соединения 15, 18) и H<sub>2</sub>O–DMCO, 85:15 (соединения 12, 13), и с использованием бумажных дисков для веществ, растворимых в EtOH (все остальные соединения). Концентрация 20 мг/мл. В качестве тестеров для определения антибактериальной активности использованы грамположительные бактериальные культуры *Bacillus subtilis* (КММ 430), *Staphylococcus aureus* (ATCC 21027) и грамотрицательные бактериальные культуры *Pseudomonas aeruginosa* (КММ 433) и *Escherichia coli* (VKPM (B-8208) M-17). В чашках Петри застывшую поверхность питательной среды АГВ засевают равномерным газоном клеток тест-культуры в изотоническом растворе NaCl. Затем на твердую поверхность агара помещают диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, предварительно нанеся на каждый 10  $\mu$ л раствора

испытуемого соединения в EtOH. Контролем служит чистый диск фильтровальной бумаги с предварительно нанесенным EtOH. Для проделывания лунок на поверхности агара используют пробойник, диаметр пробойного отверстия 8 мм. В лунку помещают 50  $\mu$ л раствора соединения в H<sub>2</sub>O или смеси H<sub>2</sub>O–DMCO. В качестве контроля используют лунку с чистым растворителем. Далее чашки термостатируют в течение 24 ч при температуре 37 °С. Вокруг диска и лунки на поверхности питательной среды имеется сплошная зона роста клеток тест-культуры. Антибактериальная активность соединений определяется по наличию зоны подавления роста клеток тест-культуры вокруг бумажного диска или лунки с испытуемым соединением. Для каждого образца высчитывали среднее арифметическое значение из 3 значений диаметра.

**Механизм антибактериального действия.** 1  $\mu$ л 5 мг/мл раствора эритромицина (Ery), 50  $\mu$ г/мл левофлоксацина (Lev) и 1  $\mu$ л 10 мг/мл тестируемого раствора помещали на газон репортерного штамма (*E. coli* *AtolC-pDualrep2*), после 18 ч инкубации при температуре 37 °С детектируют флуоресцентный сигнал в двух каналах 553/574 нм (для TurboRFP) и 588/633 нм (Katushka2S) при помощи системы документации ChemiDoc (Bio-Rad), результат представляют в виде совмещения двух сигналов, используя псевдоцвета – зеленый для TurboRFP и красный для Katushka2S. Индукция экспрессии белка Katushka2S запускается ингибиторами трансляции, тогда как белок TurboRFP активируется за счет индукции SOS-ответа, в первую очередь при повреждении ДНК.

**Рентгеноструктурный анализ соединения 16b** выполнен на дифрактометре Bruker Smart 1000 CCD при 170(2) К. Кристаллы моноклинные, *a* 16.2512(12), *b* 13.5999(10), *c* 13.0960(8) Å;  $\beta$  113.640(3)°; *Z* 4; пространственная группа *P2<sub>1</sub>/c*; *d*<sub>выч</sub> 1.353 г/см<sup>3</sup>;  $\mu$  0.193 мм<sup>-1</sup>; *F*(000) 1136;  $\theta \leq 28.0^\circ$ . Всего собрано 17253 отражений, из них 6402 независимых, *R*-фактор 0.0380. Все расчеты по определению и уточнению структуры выполнены с использованием программ SHELXTL/PC.<sup>16</sup> Полные рентгенструктурные данные соединения 16b депонированы в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 1880812).

Файл сопроводительной информации, содержащий спектры ИК, ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (с экспериментом DEPT-135) соединений 5, 11, 12, 15, 21, а также данные PCA соединения 16b (таблицы координат атомов и геометрические параметры), доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

*Чистые тест-культуры микроорганизмов хранятся и поддерживаются в коллекции морских микроорганизмов (КММ) Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РФФИ (грант 18-34-20055 (для Ильи А. Остермана) и 19-04-00697а).*

### Список литературы

1. (a) Zhou, H.-m.; Sun, W.-j.; Li, J. *J. Cent. South Univ.* **2015**, 22, 2435. (b) Yu, X.; Ruan, D.; Wu, C.; Wang, J.; Shi, Z. *J. Power Sources* **2014**, 265, 309. (c) Marino, M. G.; Kreuer, K. D. *ChemSusChem* **2015**, 8, 513. (d) DeRosa, D.; Higashiya, S.; Schulz, A.; Rane-Fondacaro, M.; Halder, P. *J. Power Sources* **2017**, 360, 41.
2. Lin, S.-W.; Sun, Q.; Ge, Z.-M.; Wang, X.; Ye, J.; Li, R.-T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 940.
3. Salama, P.; Meunier, J.-F.; Lafreniere, J.; Wang, Y.; Liu, L. W. EP Patent 1625116A1. (b) Bielawski, K.; Leszczyńska, K.; Kałuża, Z.; Bielawska, A.; Michalak, O.; Daniluk, T.; Staszewska-Krajewska, O.; Czajkowska, A.; Pawłowska, N.; Gornowicz, A. *Drug. Des., Dev. Ther.* **2017**, 11, 2015.
4. Merce-Vidal, R.; Frigola-Constansa, J. US Patent 6303608.
5. Collibee, S.; Yang, Z.; Ashcraft, L.; Bergnes, G.; Morgan, B. P.; Morgans, D. J., Jr.; Wang, J. US Patent 7572814B2.
6. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. WHO, 2014. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillance-report/en/>
7. Roman, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 743.
8. Bukreev, A. V.; Bagrina, N. P. *Russ. J. Org. Chem.* **2016**, 52, 1518. [Журн. орган. химии **2016**, 52, 1527.]
9. Павел, Г. В. Дис. канд. хим. наук; Владивосток, 1968.
10. Meng, T.-J.; Huang, X.-Q.; He, Q.-P.; Wang, J.-Y. *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.* **2008**, E64, 0853.
11. Piovesan, D.; Minervini, G.; Tosatto, S. C. E. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, 367.
12. Билай, В. И. *Методы экспериментальной микологии*; Наукова Думка: Киев, 1982.
13. Osterman, I. A.; Komarova, E. S.; Shiryaev, D. I.; Komiltsev, I. A.; Khven, I. A.; Lukyanov, D. A.; Tashlitsky, V. N.; Serebryakova, M. V.; Efremenkova, O. V.; Ivanenkov, Y. A.; Bogdanov, A. A.; Sergiev, P. V.; Dontsova, O. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 7481.
14. (a) Акимова, Т.; Высоцкий, В. И. Слабко, О. В. кн. *1,5-Дикарбонильные соединения в органическом синтезе*; Высоцкий, В. И.; Новиков, В. Л., Ред.; Дальневосточный федеральный университет: Владивосток, 2014, с. 368. (b) Акимова, Т.; Высоцкий, В. И. Слабко, О. В. кн. *1,5-Дикарбонильные соединения в органическом синтезе*; Высоцкий, В. И.; Новиков, В. Л., Ред.; Дальневосточный федеральный университет: Владивосток, 2014, с. 377.
15. Denisenko, M. V.; Pavel', G. V.; Tilichenko, M. N. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1981**, 17, 580. [Химия гетероцикл. соединений **1981**, 17, 789.]
16. Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, A64, 112.