

Алкалоидоподобные аннелированные пирано[4,3-*b*]пирролы: противовирусная активность и гидролиз

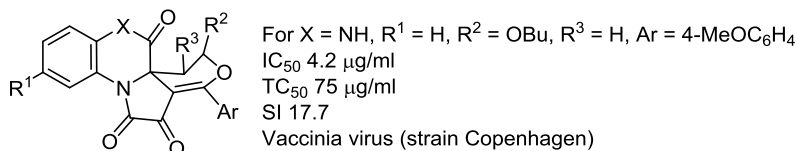
Екатерина Е. Храмова^{1*}, Максим В. Дмитриев¹, Николай И. Бормотов²,
Ольга А. Серова², Лариса Н. Шишкина², Андрей Н. Масливец^{1*}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Букирева, 15, Пермь 614990, Россия; e-mail: caterina.stepanova@psu.ru, koh2@psu.ru

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово 630559, Новосибирская обл., Россия

Поступило 26.11.2020

Принято 15.01.2021



Алкалоидоподобные ангулярные 6/6/5/6-аннелированные пирано[4,3-*b*]пирролы (аналоги претацеттина) содержат химически лабильные группы, которые могут взаимодействовать с водой при комнатной температуре. Исследована их противовирусная активность в отношении вируса осповакцины и склонность к гидролизу. Наибольшую противовирусную активность проявили соединения, которые были более устойчивы к гидролизу.

Ключевые слова: пирано[4,3-*b*]пирролы, гетеро-реакция Дильса–Альдера, гидролиз, ортопоксвирусы, противовирусная активность.

Претацеттин – амариллисовый алкалоид, обладающий выраженной противовирусной (подавляет синтез белка, связывается с ДНК, связывается с обратной транскриптазой онкогенных вирусов) и противораковой активностью.¹ В его структуру входит пентациклический ангулярный 5/6/6/5/6-аннелированный спирокаркас, содержащий пирано[2,3-*c*]пиррольный остов. Интересной особенностью этого алкалоида является его химическая лабильность, обеспечиваемая наличием в его структуре полуацетального фрагмента в положении С-11. Известно, что претацеттин легко превращается в тацеттин в процессе очистки с применением основных добавок (схема 1).² При этом, тацеттин не проявляет такой же высокой биологической активности, как претацеттин.^{1а} Вероятно, наличие выраженной биологической активности у претацеттина

связано с наличием в его структуре химически лабильной группы, взаимодействующей с биологическими мишенями.

Недавно взаимодействием гетарено[*e*]пиррол-2,3-дионов **1a–j** с полярными олефинами **2a–d** нами были синтезированы аналоги претацеттина – ангулярные 6/6/5/6-аннелированные пирано[4,3-*b*]пирролы **3a–k** и их нециклический аналог **3l** (схема 2, табл. 1).³ Интересной особенностью соединений **3a–k** является наличие в их структуре химически лабильного 3,4-дигидро-2*H*-пиранового фрагмента с легко варьируемым заместителем R² (схема 2).

Принимая во внимание сходство структур аннелированных пирано[4,3-*b*]пирролов **3a–k** и претацеттина, в том числе наличия в их структурах химически лабильных фрагментов, нами была исследована

Схема 1

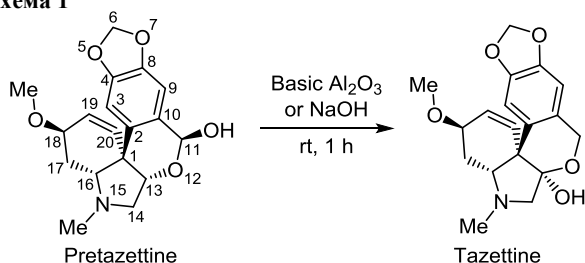


Схема 2

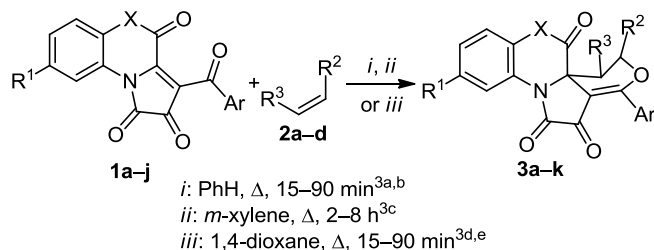


Таблица 1. Противовирусная активность соединений 3a–l в отношении вируса осповакцины

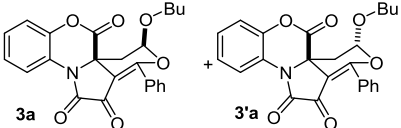
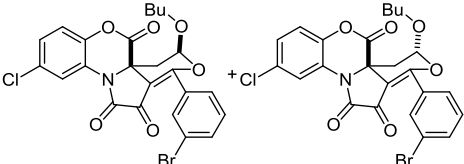
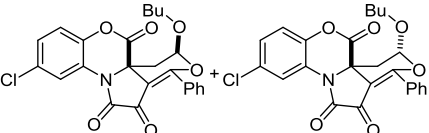
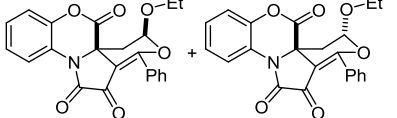
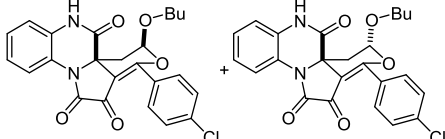
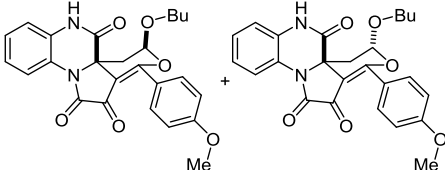
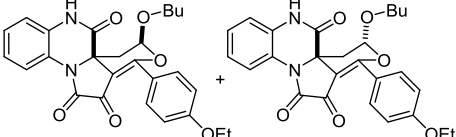
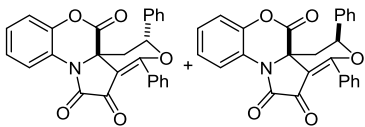
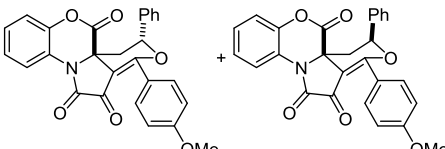
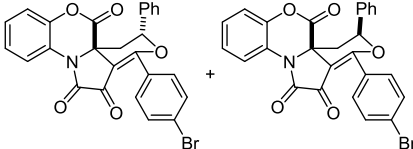
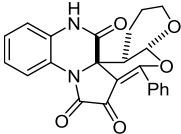
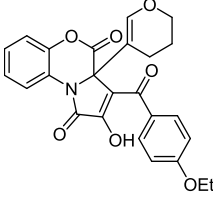
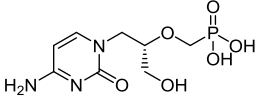
	Соединение	TC ₅₀ ,*	Ингибирующая концентрация	SI***	dr** ⁴
		мкг/мл	IC ₅₀ ,** мкг/мл (Vaccinia)		
	1	2	3	4	5
3a ^{3a}		99.4	NA* ⁵	–	100:10
3b ^{3a}		40.9	37.4	1.1	100:48
3c ^{3a}		>100	NA	–	100:33
3d ^{3a}		53.7	NA	–	100:0
3e ^{3d}		40.9	NA	–	100:12
3f ^{3d}		75.0	4.2	17.7	100:211
3g ^{3d}		>100	NA	–	100:398
3h ^{3c}		77.0	NA	–	100:44
3i ^{3c}		>100	NA	–	100:43
3j ^{3c}		29.6	NA	–	100:73

Таблица 1 (окончание)

	1	2	3	4	5
3k ^{3e}		83.0	46.0	1.8	–
3l ^{3b}		>100	NA	–	–
Цидофовир		137.2	10.8	12.7	–

* TC₅₀ – 50% цитотоксическая концентрация – концентрация, при которой разрушаются 50% клеток в неинфицированном монослое.

** IC₅₀ – 50% вирусингибирующая концентрация – концентрация, при которой сохраняются жизнеспособными 50% клеток в инфицированном монослое.

*** SI – индекс селективности, отношение TC₅₀/IC₅₀.

⁴ *dr* – соотношение диастереомеров согласно данным ЯМР ¹H спектров образцов, исследованных на противовирусную активность.

⁵ NA – нет активности.

противовирусная активность соединений **3a–k** и их нециклического аналога **3l** (табл. 1), а также возможность протекания гидролиза данных соединений.

Для оценки потенциала применения соединений **3a–l** в качестве противовирусных агентов изучена их цитотоксическая и противовирусная активность *in vitro*. В качестве модельного вируса был использован типичный представитель ортопоксвирусов – вирус осповакцины (штамм Копенгаген), в качестве препарата сравнения – коммерчески доступный препарат Цидофовир, проявляющий антиортопоксвирусную активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (табл. 1).⁴

По данным, приведенным в табл. 1, видно, что соединение **3f** не уступает по противовирусному действию в отношении вируса осповакцины известному препарату Цидофовир. Дальнейший поиск среди соединений этого класса может быть более перспективным, так как даже небольшие структурные изменения значительно влияют на их токсичность и активность.

Для исследования возможности протекания гидролиза соединений **3a–l** (использованы смеси диастереомеров, приведенные в табл. 1) растворы 1 мг этих соединений в 1 мл растворителя (PhMe, 1,4-диоксана, MeCN, ДМСО, смеси ДМСО – культуральная среда в соотношении 1:4) с добавлением 50 мкл дистиллированной H₂O выдерживали при комнатной температуре в течение 2 сут. Полученные реакционные смеси исследовали методом ультраВЭЖХ–УФ–МС (с внутренним стандартом).

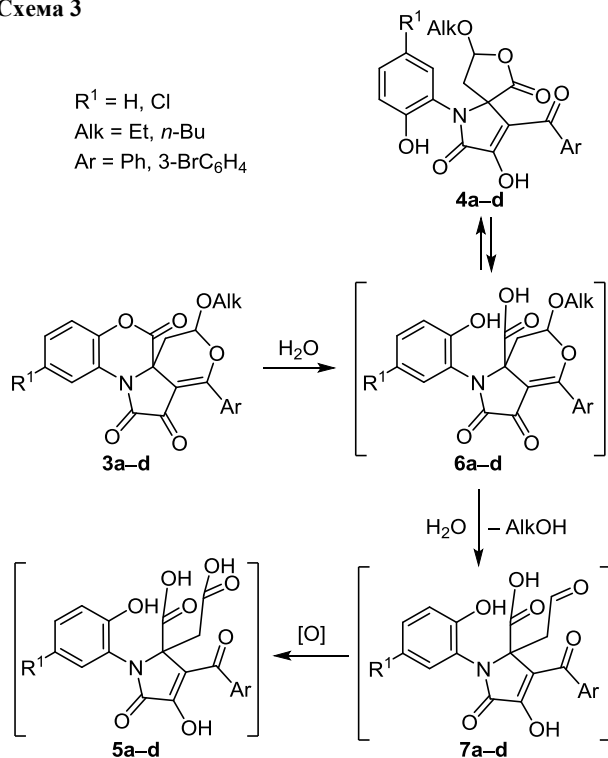
В соединениях **3a–j** направление протекания гидролиза зависит от заместителей R² и X. Гидролиз соединений **3a–d** (R² = OAlk, X = O) происходит с образованием двух рядов продуктов **4a–d** и **5a–d** (табл. 2). Предполагаемая схема гидролиза отображена на схеме 3. Первоначально, по-видимому, происходит гидролиз лактонной карбонильной группы соединений **3a–d** с образованием лабильных интермедиатов **6a–d**, которые претерпевают одно из двух возможных превращений: внутримолекулярную циклизацию (что характерно для таких соединений)⁵ по ацетальной группе с образованием спиросоединений **4a–d** или гидролиз ацетальной группы с последующим отщеплением молекулы спирта и образованием лабильных альдегидов **7a–d**, окисляющихся до соединений **5a–d**. Структуры соединений **4a–d** были установлены методами ЯМР и ИК спектроскопии на примере соединения **4a**, которое удалось выделить в чистом виде. Масс-спектры соединений **4a–d** содержали отчетливые сигналы, характерные для их молекулярных ионов (табл. 2). Структуры соединений **5a–d** были предположительно установлены лишь на основании данных масс-спектров (табл. 2). Стоит отметить, что масс-спектры соединений **5a–d** не содержали интенсивных сигналов молекулярных ионов. Наиболее

довали методом ультраВЭЖХ–УФ–МС (с внутренним стандартом).

Таблица 2. Масс-спектрометрические характеристики продуктов гидролиза соединений **3a–d**

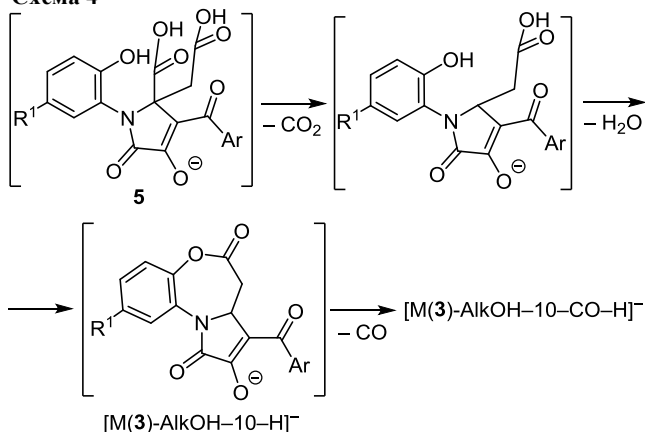
Соединение	Интенсивные сигналы в масс-спектрах продуктов 4a–d , <i>m/z</i>			Соединение	Интенсивные сигналы в масс-спектрах продуктов 5a–d , <i>m/z</i>	
	[M(3)+H ₂ O+H] ⁺	[M(3)+H ₂ O+Na] ⁺	[M(3)+H ₂ O–H] [–]		[M(3)–AlkOH–10–H] [–]	[M(3)–AlkOH–10–CO–H] [–]
4a	438	460	436	5a	334	306
4b	550, 552	572, 574	548, 550	5b	448, 450	430, 432
4c	472	494	470	5c	368	340
4d	410	432	408	5d	334	306

Схема 3



интенсивными были сигналы $[\text{M}(3)\text{-AlkOH-10-H}]^-$ и $[\text{M}(3)\text{-AlkOH-10-CO-H}]^-$ ($\text{M}(3)$ – молекулярная масса соответствующего соединения **3**), образующиеся в результате фрагментации их молекулярных ионов. Предполагаемый механизм фрагментации соединений **5** в масс-спектрах с ионизацией электрораспылением отображен на схеме 4.

Схема 4



Степень и направление гидролиза соединений **3a-d** зависят от растворителя, в котором проводились реакции. Данные соединения проявили устойчивость к гидролизу в PhMe, а в 1,4-диоксане и MeCN они частично гидролизались (конверсия 7–40%) с преимущественным образованием продуктов **4a-d**. В ДМСО соединения **3a-d** гидролизались с образованием продуктов **4a-d** и **5a-d** (конверсия 40–100%), в смеси ДМСО – культуральная среда – с образованием смеси продуктов **4a-d** и **5a-d** (конверсия 85–100%).

Кроме того, для пары диастереомеров **3a, 3'a** аналогичным образом изучены закономерности протекания гидролиза минорного диастереомера **3'a** (использован индивидуальный диастереомер **3'a^{3a}**) (табл. 1). Установлено, что соединение **3'a** устойчиво к гидролизу в PhMe, а в 1,4-диоксане и MeCN данное соединение гидролизуется с образованием продукта **4a** (конверсия 90%). В ДМСО и в смеси ДМСО – культуральная среда соединение **3'a** полностью гидролизовалось с образованием двух продуктов **4a** и **5a**. Эти данные свидетельствуют о том, что относительная конфигурация атома углерода при заместителе R^2 в соединениях **3** также влияет на их склонность к гидролизу.

Далее нами был исследован гидролиз соединения **4a** в аналогичных условиях. В результате найдено, что соединение **4a** устойчиво к гидролизу в PhMe, MeCN, 1,4-диоксане и ДМСО. В смеси ДМСО – культуральная среда соединение **4a** частично превращалось в соответствующее производное **5a** (конверсия 40%), что свидетельствует о возможной обратимости образования соединений **4** (схема 3).

Соединения **3e-g** ($R^2 = \text{OAlk}$, $X = \text{NH}$) гидролизуются с образованием продуктов **8e-g**. Мы предполагаем, что происходит гидролиз ацетальной группы соединений **3e-g** с образованием полуацеталей **9e-g**, в которых происходит отщепление молекулы спирта и образование лабильных альдегидов **8e-g** (схема 5). Структуры соединений **8** были предположительно установлены лишь на основании данных их масс-спектров (табл. 3).

Как упомянуто выше, для соединений **3a-d**, как и для соединений **3e-g**, степень гидролиза также зависит от растворителя, в котором проводились исследования. Соединения **3e-g** продемонстрировали устойчивость к гидролизу в PhMe, 1,4-диоксане и MeCN конверсия

Схема 5

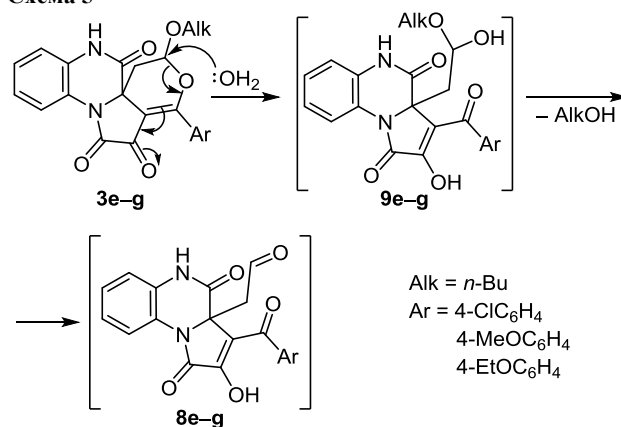


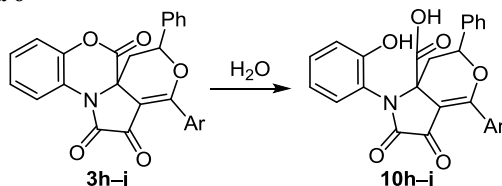
Таблица 3. Масс-спектрометрические характеристики продуктов гидролиза соединений **3e-g**

Соединение	Интенсивные сигналы в масс-спектрах продуктов 8e-g , m/z	
	$[\text{M}(3)+\text{H}_2\text{O}-\text{AlkOH}-\text{H}]^-$	$[\text{M}(3)+\text{H}_2\text{O}-\text{AlkOH}+\text{H}]^+$
8e	395	397
8f	391	393
8g	405	407

составляла всего 1–3%, а в ДМСО соединения **3f,g** практически не гидролизывались (конверсия 1–3%), в свою очередь соединение **3e** гидролизывалось с образованием соответствующего производного **8e** (конверсия 50%). В смеси ДМСО – культуральная среда соединения **3e–g** частично гидролизывались (конверсия 2–30%).

В результате гидролиза лактонной карбонильной группы соединений **3h–j** было отмечено образование одного ряда продуктов **10h–j** (схема 6). Соединения **10h–j**, в сравнении с их аналогами **6a–d**, не претерпевают дополнительных превращений. Структура соединения **10j**, которое удалось выделить в чистом виде, была установлена методами ЯМР и ИК спектроскопии, а также РСА (рис. 1). Вероятно, остальные представители ряда соединений **10h–j** имеют аналогичную структуру. Масс-спектры этих соединений содержали отчетливые сигналы, характерные для их молекулярных ионов (табл. 4).

Схема 6



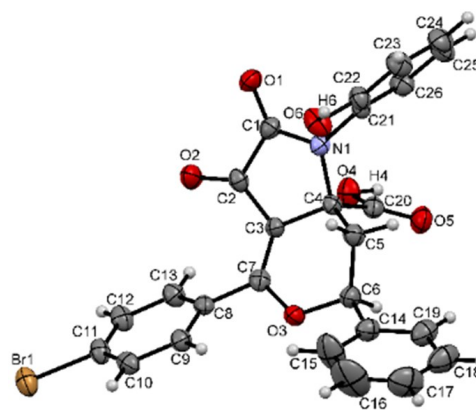
Степень гидролиза соединений **3h–j** также зависела от растворителя, в котором проводились исследования. Эти соединения продемонстрировали устойчивость к гидролизу в PhMe. В 1,4-диоксане, MeCN и ДМСО соединения **3h–j** гидролизывались почти полностью (конверсия 70–85%). В смеси ДМСО – культуральная среда соединения **3h–j** гидролизывались почти полностью (конверсия 85–100%).

Согласно данным РСА, соединение **10j** кристаллизуется в виде сольвата с MeCN в соотношении 1:1. Кристалл содержит молекулы только одной пары энантиомеров с *транс*-расположением карбоксильной группы и фенильного заместителя. Длины связей и валентные углы в молекуле лежат в интервале ожидаемых значений.

Во всех исследованных условиях соединение **3k** проявило устойчивость к гидролизу, по-видимому из-за комбинации химически устойчивого хиноксалинового фрагмента и стерических препятствий, создаваемых тетрагидропирановым циклом, что делало дигидропирановый цикл недоступным для атаки H₂O. Соединение **3l** гидролизывалось полностью с образованием

Таблица 4. Масс-спектрометрические характеристики продуктов гидролиза соединений **3h–j**

Соединение	Интенсивные сигналы в масс-спектрах продуктов 10h–j , <i>m/z</i>		
	[M(3)+H ₂ O+H] ⁺	[M(3)+H ₂ O+Na] ⁺	[M(3)+H ₂ O–H] ⁺
10h	442	464	440
10i	472	494	470
10j	520, 522	542, 544	518, 520

Рисунок 1. Молекулярная структура соединения **10j** в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 30% вероятностью.

большого числа трудноидентифицируемых продуктов, по-видимому, из-за наличия в его молекуле стерически доступного дигидропиранового фрагмента с электроноакцепторной группой при атоме С-3, увеличивающего его реакционную способность в сравнении с незамещенным 3,4-дигидро-2H-пираном.

Обобщая и сравнивая данные исследований гидролиза соединений **3** (табл. 5) и их противовирусной активности (табл. 1), можно заметить, что лучшие результаты противовирусной активности показали соединения **3f,k**, которые были наиболее устойчивыми к гидролизу.

Таблица 5. Влияние растворителя на гидролиз соединений **3a–l**

Соединение	Продукты гидролиза соединения 3 (степень конверсии* соединения 3 , %)				
	PhMe	MeCN	1,4-Диоксан	ДМСО	Смесь ДМСО и культуральной среды, 1:4
3a	NR**	4 (7)	4 (7)	4 и 5 (40)	4 и 5 (100)
3'a	NR	4 (90)	4 (90)	4 и 5 (100)	4 и 5 (100)
3b	NR	4 (33)	4 (30)	4 и 5 (100)	4 и 5 (85)
3c	NR	4 (35)	4 (40)	4 и 5 (94)	4 и 5 (96)
3d	NR	4 (15)	4 (17)	4 и 5 (86)	4 и 5 (94)
3e	NR	8 (3)	8 (3)	8 (50)	8 (30)
3f	NR	8 (1)	8 (1)	8 (3)	8 (25)
3g	NR	8 (1)	8 (1)	8 (1)	8 (2)
3h	NR	10 (82)	10 (83)	10 (85)	10 (98)
3i	NR	10 (70)	10 (75)	10 (79)	10 (85)
3j	NR	10 (85)	10 (85)	10 (85)	10 (100)
3k	NR	NR	NR	NR	NR
3l	NS*** (80)	NS (100)	NS (100)	NS (100)	NS (100)

* По данным ультраВЭЖХ–УФ–МС.

** NR – реакция не протекала.

*** NS – реакция протекала неселективно с образованием большого числа трудноидентифицируемых продуктов.

В заключение стоит отметить, что исследованные алкалоидоподобные ангулярные 6/6/5/6-аннелированные пирано[4,3-*b*]пирролы способны гидролизаться, причем на их склонность к гидролизу и направление его протекания влияют заместители Ar, R², R³ и X, а также относительная конфигурация атома углерода при R². Лучшие результаты противовирусной активности показали соединения, которые были наиболее устойчивыми к гидролизу. Таким образом, исследования гидролиза ангулярно 6/6/5/6-аннелированных пирано[4,3-*b*]пирролов подтверждают наличие в их структуре лабильных химических групп, а из сопоставления данных противовирусной активности и склонности к гидролизу этих соединений можно сделать вывод, что данные соединения обладают противовирусной активностью и поэтому представляют интерес для дальнейшего изучения их биологической активности.

Экспериментальная часть

ИК спектры зарегистрированы на фурье-спектрометре PerkinElmer Spectrum Two в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C (400 и 100 МГц соответственно) записаны на спектрометре Bruker Avance III HD 400 в ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт – остаточные сигналы растворителя (2.50 м. д. для ядер ¹H, 39.5 м. д. для ядер ¹³C). Исследование продуктов гидролиза проведено методом ультраВЭЖХ–УФ–МС (хроматографическое разделение на приборе Waters ACQUITY UPLC I-Class: колонка Acquity UPLC BEH C18 1.7 мкм, подвижные фазы – MeCN–H₂O, скорость потока 0.6 мл/мин; УФ детектирование: диодно-матричный детектор ACQUITY UPLC PDA eλ Detector (спектральный диапазон 230–780 нм); масс-спектрометрическое детектирование: масс-детектор Xevo TQD, ионизация пробы электрораспылением в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов, температура источника 150°C, напряжение на капилляре 3500–4000 В, напряжение на конусе 20–70 В, температура испарения 200°C). Элементный анализ выполнен на анализаторе varioMICROcube. Температуры плавления определены на аппарате Mettler Toledo MP70. Контроль за чистотой соединений осуществлен методом ТСХ на пластинах Merck Silicagel 60 F₂₅₄, элюенты – PhMe, EtOAc, PhMe–EtOAc, 5:1, проявление в парах иода и УФ свете (254 нм).

Пирано[4,3-*b*]пирролы **3a–k** и их нециклический аналог **3l** синтезированы по описанным ранее методикам взаимодействием гетарено[*e*]пиррол-2,3-дионов **1a–j** с полярными олефинами **2a–d**.³ Олефины **2a–d** приобретены в Acros Organics и Alfa Aesar, перед использованием соединения **2a–d** дополнительно очищены перегонкой. Растворители для синтеза и очистки соединений **3a–l** перегнаны над натрием. Для исследования гидролиза соединений **3a–l** использована культуральная среда DMEM D5796 (Sigma). Остальные растворители и реактивы получены из коммерческих источников и были использованы без дополнительной очистки.

(5*R**,8*S**)- и (5*R**,8*R**)-4-Бензоил-8-бутокси-3-гидрокси-1-(2-гидроксифенил)-7-окса-1-азаспиро[4.4]нон-3-ен-2,6-дион (**4a**). Раствор 100 мг (0.24 ммоль) соединения **3'a** в смеси 2 мл MeCN и 0.2 мл H₂O

выдерживают при комнатной температуре при перемешивании в течение 2 сут (контроль ультраВЭЖХ–УФ–МС). Затем добавляют в реакционную смесь 3 мл PhMe. MeCN упаривают при пониженном давлении. Образовавшийся твердый продукт отфильтровывают. Выход 75 мг (71%), белый порошок, т. пл. 167–169°C (с разл.). ИК спектр, ν, см⁻¹: 3311; 1791; 1748; 1714; 1663. Спектр ЯМР ¹H (соотношение диастереомеров (5*R**,8*S**):(5*R**,8*R**) = 1:0.27), δ, м. д. (*J*, Гц): (5*R**,8*S**)-диастереомер: 0.77 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 1.06–1.10 (2H, м, CH₂CH₃); 1.22–1.26 (2H, м, CH₂Et); 2.29 (1H, д, *J* = 15.1, *J* = 4.2, H-9); 2.91 (1H, д, *J* = 15.1, *J* = 6.4, H-9); 3.42–3.48 (2H, м, OCH₂Pr); 5.65 (1H, д, *J* = 6.4, *J* = 4.2, H-8); 6.86–7.01 (3H, м, H Ar); 7.27–7.33 (1H, м, H Ar); 7.49–7.53 (2H, м, H Ar); 7.61–7.64 (1H, м, H Ar); 7.76–7.78 (2H, м, H Ar); 9.95 (1H, с, OH); 12.68 (1H, уш. с, OH); (5*R**,8*R**)-диастереомер: 0.82 (3H, т, *J* = 7.5, CH₃); 1.22–1.26 (2H, м, CH₂CH₃); 1.40–1.45 (2H, м, CH₂Et); 2.47 (1H, д, *J* = 14.9, *J* = 6.1, H-9); 2.80 (1H, д, *J* = 14.9, *J* = 6.1, H-9); 3.42 (1H, м, OCH₂Pr); 3.61–3.67 (1H, м, OCH₂Pr); 4.81 (1H, т, *J* = 6.1, H-8); 6.86–7.09 (3H, м, H Ar); 7.33–7.38 (1H, м, H Ar); 7.49–7.53 (2H, м, H Ar); 7.61–7.64 (1H, м, H Ar); 7.76–7.78 (2H, м, H Ar); 10.17 (1H, с, OH); 12.68 (1H, уш. с, OH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: диастереомер (5*R**,8*S**) : 13.4; 18.2; 30.7; 40.2; 68.6; 69.0; 102.1; 114.4; 116.7; 119.4; 126.5; 127.9; 128.7; 129.7; 130.3; 131.8; 132.3; 138.0; 154.6; 169.9; 176.3; 193.7. Найдено, %: C 65.66; H 5.34; N 3.19. C₂₄H₂₃NO₇. Вычислено, %: C 65.90; H 5.30; N 3.20.

(6*R**,7*aR**)-4-(4-Бромфенил)-1-(2-гидроксифенил)-2,3-диоксо-6-фенил-2,3,6,7-тетрагидропирано[4,3-*b*]пиррол-7а(1*H*)-карбоновая кислота (**10j**). Раствор 100 мг (0.20 ммоль) соединения **3j** в 2 мл MeCN и 0.2 мл H₂O выдерживают при комнатной температуре при перемешивании в течение 2 сут (контроль ультраВЭЖХ–УФ–МС). Затем в реакционную смесь добавляют 3 мл PhMe. MeCN упаривают при пониженном давлении. Образовавшийся твердый продукт отфильтровывают. Выход 81 мг (78%), желтый порошок, т. пл. 261–263°C (с разл.). ИК спектр, ν, см⁻¹: 3180; 1744; 1716; 1680. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 2.35–2.41 (2H, м, CH₂); 5.56 (1H, д, *J* = 12.0, *J* = 2.8, H-6); 6.85–6.94 (2H, м, H Ar); 7.04–7.06 (1H, м, H Ar); 7.23–7.27 (1H, м, H Ar); 7.41–7.65 (5H, м, H Ar); 7.75–7.78 (4H, м, H Ar); 9.81 (1H, с, OH); 14.15 (1H, уш. с, OH). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 62.3; 78.8; 106.9; 109.9; 119.4; 121.5; 125.6; 126.4; 128.2; 128.9; 130.1; 130.3; 130.8; 131.2; 131.7; 132.2; 138.6; 139.2; 154.1; 162.2; 171.5; 179.3. Найдено, %: C 60.23; H 3.73; N 5.03. C₂₆H₁₈BrNO₆·MeCN. Вычислено, %: C 59.91; H 3.77; N 4.99.

Рентгеноструктурное исследование соединения 10j. Набор экспериментальных отражений получен на монокристалльном дифрактометре Xcalibur Ruby с CCD-детектором по стандартной методике (MoKα-излучение, 295(2)K, ω-сканирование с шагом 1°). Поглощение учтено эмпирически с использованием алгоритма SCALE3 ABSPACK.⁶ Структура расшифрована с помощью программы Superflip⁷ и уточнена полно-матричным МНК по *F*² в анизотропном приближении для всех неводородных атомов с помощью программы

SHELXL⁸ с графическим интерфейсом OLEX2.⁹ При уточнении положения атомов водорода использована модель "наездник". Положения атомов Н групп ОН уточнены независимо в изотропном приближении. Кристаллы соединения **10j** (C₂₆H₁₈BrNO₆·MeCN, M 561.38) моноклинной сингонии, пространственная группа P2₁/n; a 14.114(3), b 11.089(2), c 16.823(7) Å; β 105.39(3)°; V 2538.4(13) Å³; Z 4; d_{выч} 1.469 г/см³; μ 1.665 мм⁻¹. Окончательные параметры уточнения: R₁ 0.0650 (для 2775 отражений с I > 2σ(I)), wR₂ 0.1957 (для всех 6021 независимого отражения, R_{int} 0.0657), S 1.016. Результаты PCA депонированы в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 2046501).

Исследование цитотоксичности и противовирусной активности соединений 3a–1 проводят в культуре клеток почки африканской зеленой марышки (Vero) из коллекции Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора. В качестве модельного вируса – типичного представителя ортопоксвирусов – используют вирус осповакцины (штамм Копенгаген), полученный из коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора. Монослой клеток Vero выращивают в лунках 96-луночных планшетов в среде DMEM (ООО "БиолоТ", Россия) в присутствии 2% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США) с добавлением гентамицина (40 МЕ/мл) и амфотерицина В (5 мкг/мл). При культивировании клеток с вирусом используют поддерживающую питательную среду такого же состава. Из исследуемых соединений готовят растворы в ДМСО с концентрацией 20 мг/мл, а затем делают их 3(5)-кратные разведения в культуральной питательной среде DMEM. Эти разведения вносят в лунки планшетов с монослоем клеток, затем в половину лунок планшета вносят вирус в дозе 1000 БОЕ/лунку (бляшкообразующих единиц на лунку), а вторую половину используют для оценки токсичности соединений. При этом начальная концентрация соединений в лунках планшета составляет 100 мкг/мл. Токсическую активность соединений определяют по гибели клеток под воздействием соединений в лунках планшета, в которые вирус не вносят. В качестве контроля используют монослой клеток в лунках планшета, в которые вносят вирус без соединений (контроль вируса), и монослой клеток в лунках, в которые не вносят ни вируса, ни соединений (контроль клеток). В качестве препарата сравнения используют коммерчески доступный препарат Цидофовир (cidofovir, Vistide) производства Gilead Sciences Inc. (США).

После инкубации клеток в течение 4 сут в лунки добавляют витальный краситель нейтральный красный, который активно поглощается живыми клетками.¹⁰ В лунках, где клетки были разрушены вирусом или повреждены в результате токсического воздействия соединения, поглощения красителя не происходит. Монослой клеток отмывают от непоглощенного красителя физиологическим раствором и вносят в лунки лизирующий буфер, в котором растворяется краситель, поглощенный клетками. Оптическую

плотность (ОП) растворов в лунках планшетов измеряют при помощи планшетного спектрофотометра E-Max (Molecular Devices, США) при длине волны 490 нм. ОП является величиной, пропорциональной количеству жизнеспособных клеток, и в сравнении с контролем вируса отражает противовирусную активность соединения, а в сравнении с контролем клеток – его токсичность. Результаты обрабатывают с помощью программы Soft Max Pro 4.0, которая высчитывает значения 50% токсической концентрации (ТС₅₀ в мкг/мл) и 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀ в мкг/мл) соединений. По соотношению 50% токсической и ингибирующей концентраций определяют индекс селективности (SI) препаратов: SI = ТС₅₀/IC₅₀.

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР ¹H и ¹³C соединений **4a** и **10j**, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSNF-2020-0008). Вирусологические работы выполнены в рамках Государственного задания Государственному научному центру вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора.

Список литературы

- (a) Bastida, J.; Berkov, S.; Torras, L.; Pigni, N. B.; de Andrade, J. P.; Martínez, V.; Codina, C.; Viladomat, F. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*; Muñoz-Torrero, D., Ed.; Transworld Research Network: Trivandrum, 2011, p. 65. (b) Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K.-M.; Cang, X.-X.; Kou, Z.-N.; Xiao, W.; Zhu, J.-B. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2017**, *19*, 53. (c) Cahliková, L.; Vaněčková, N.; Šafratová, M.; Breiterová, K.; Blunden, G.; Hulcová, D.; Opletal, L. *Molecules* **2019**, *24*, 4238.
- Wildman, W. C.; Bailey, D. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5514.
- (a) Stepanova, E. E.; Aliev, Z. G.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2013**, *49*, 1762. [*Журн. орган. химии* **2013**, *49*, 1781.] (b) Stepanova, E. E.; Dmitriev, M. V.; Slepukhin, P. A.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2017**, *53*, 74. [*Журн. орган. химии* **2017**, *53*, 78.] (c) Stepanova, E. E.; Dmitriev, M. V.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2017**, *53*, 1851. [*Журн. орган. химии* **2017**, *53*, 1816.] (d) Kasatkina, S. O.; Titov, M. S.; Stepanova, E. E.; Dmitriev, M. V.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, *54*, 626. [*Журн. орган. химии* **2018**, *54*, 624.] (e) Kasatkina, S. O.; Stepanova, E. E.; Dmitriev, M. V.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, *54*, 1055. [*Журн. орган. химии* **2018**, *54*, 1049.]
- (a) Kern, E. R.; Hartline, C.; Harden, E.; Keith, K.; Rodriguez, N.; Beadle, J. R.; Hostetler, K. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 991. (b) Israely, T.; Paran, N.; Lustig, S.; Erez, N.; Politi, B.; Shafferman, A.; Melamed, S. *Virology J.* **2012**, *9*, 119.
- Tutyina, N. M.; Racheva, N. L.; Maslivets, V. A.; Aliev, Z. G.; Maslivets, A. N. *Russ. J. Org. Chem.* **2013**, *49*, 95. [*Журн. орган. химии* **2013**, *49*, 101.]
- CrysAlisPro, Version 1.171.37.33*; Agilent Technologies.
- Palatinus, L.; Chapuis, G. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 786.
- Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.* **2015**, *C71*, 3.
- Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339.
- Baker, R. O.; Bray, M.; Huggins, J. W. *Antivir. Res.* **2003**, *57*, 13.