

Синтез и противовирусная активность N-гетероциклических производных гидразонов камфоры и фенхона

Ксения С. Ковалева¹, Ольга И. Яровая^{1*}, Юрий В. Гатилов¹, Александр В. Слита², Яна Л. Есаулкова², Владимир В. Зарубаев², Надежда Б. Рудометова³, Надежда С. Щербакова³, Дмитрий Н. Щербаков³, Нариман Ф. Салахутдинов¹

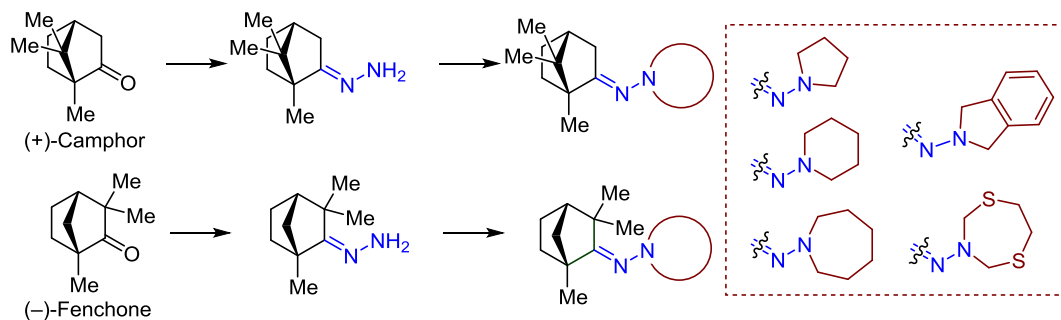
¹ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, пр. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090, Россия; e-mail: ooo@nioch.nsc.ru

² Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, ул. Мира, 14, Санкт-Петербург 197101, Россия

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, р. п. Кольцово 630559, Новосибирская обл., Россия

Поступило 4.12.2020

Принято 5.02.2021



Изучено алкилирование дигалогеналканами первичной аминогруппы гидразонов (+)-камфоры и (-)-фенхона, приводящее к получению новых азотсодержащих гетероциклических производных. Показано, что взаимодействие гидразонов с 1,2-этандитиолом в присутствии формальдегида с добавлением 5% $\text{Sn}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ приводит к образованию соединений с 1,5,3-дитиазепановым фрагментом. С использованием разработанного нами метода синтез гетероциклических производных на основе гидразонов проходит с использованием коммерчески доступных реагентов и с хорошими выходами. Проведенные исследования противовирусной активности показали, что N-гетероциклические соединения на основе камфоры могут рассматриваться в качестве перспективных агентов, обладающих активностью в отношении вируса гриппа А.

Ключевые слова: гетероциклы, гидразоны, камфора, фенхон, противовирусная активность.

Использование в качестве исходных структурных блоков терпеновых соединений в синтезе новых биологически активных соединений является одним из важных направлений современной медицинской химии.¹ Ранее нами были проведены систематические исследования по модификации монотерпеноидов с целью поиска эффективных противовирусных агентов широкого спектра действия. Так, было показано, что иминопроизводные (+)-камфоры являются эффективными ингибиторами вируса гриппа,^{2,3} соединением-лидер – продукт взаимодействия камфоры и аминокэтанола, названный нами камфецин, проявляет свою активность на ранней стадии вирусной репликации и является ингибитором гемагглютинаина вирусов гриппа

А и В.⁴ Важно отметить, что при возникновении резистентности у вируса к этому соединению патогенность вируса значительно снижается.⁵ Комбинация каркасного бициклического терпенового фрагмента с насыщенным N-гетероциклом, связанных сложноэфирным линкером, позволила нам обнаружить новый класс эффективных соединений, обладающих высокой активностью в отношении вирусов гриппа⁶ и вируса осповакцины.⁷ С использованием псевдовиральной системы, имеющей на своей поверхности гликопротеины филовирусов Марбург и Эбола, была обнаружена способность азотсодержащих гетероциклических сложноэфирных производных препятствовать входу вирусов Марбург и Эбола в клетку.⁸ С исполь-

зованием метода сайт-направленного мутагенеза выявлено предположительное место связывания данных соединений с поверхностным белком.⁹ Иминопроизводные камфоры с насыщенным N-гетероциклическим фрагментом, связанным с каркасным терпеновым остовом алифатическим линкером, проявили высокую активность в отношении вирусов гриппа А (H1N1).¹⁰ Серия циклических амидов, в том числе содержащих пиперидиновые и морфолиновые фрагменты, получена на основе камфорной кислоты, была изучена их активность в отношении флавивирусов.¹¹ Азотсодержащие каркасные соединения, полученные в реакциях камфорной кислоты с диаминами, проявляют активность в отношении широкого спектра вирусов гриппа.¹²

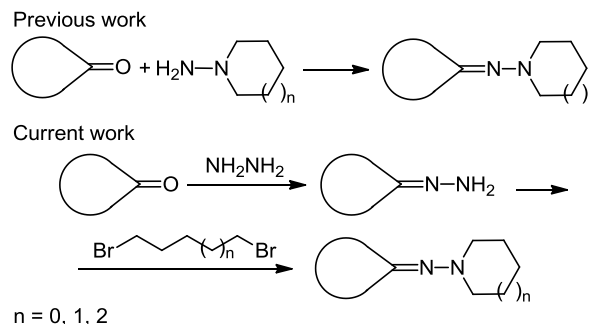
Значительные усилия химиков, работающих в области модификации природных соединений, направлены на синтез производных терпеноидов с различными насыщенными гетероциклическими фрагментами. Так, было показано, что производное рупестоновой кислоты, содержащее фенилпиперазиновый фрагмент, проявляет активность против вируса гриппа А (H1N1).¹³ Присоединение к лактонному фрагменту партенолида насыщенных N-гетероциклов увеличивает его противовирусную активность в отношении вируса герпеса первого типа.¹⁴ Химическая модификация производного бетулиновой кислоты бевиримата с введением пиперидинового фрагмента позволила получить соединение, активное в наномолярной концентрации в отношении ВИЧ-1.¹⁵

Химические модификации аминогруппы природных соединений могут приводить к созданию фармакологически ценных библиотек новых агентов, содержащих различные азотсодержащие фрагменты. В то же время коммерчески доступных соединений терпенового ряда с первичной аминогруппой практически нет. Ввести в остов терпенового соединения первичную аминогруппу можно восстановлением оксима соответствующего природного кетона, однако данный двухстадийный синтез зачастую проходит с низкими выходами или сопряжен с получением смеси изомеров. Взаимодействием гидразингидрата с доступными бициклическими кетонами каркасного строения можно легко и с отличными выходами синтезировать гидразоны, первичная аминогруппа которых будет вступать в реакции, присущие классическим аминам.

Одним из способов получения азотсодержащих гетероциклов из первичных аминов является циклоконденсация с дигалогеналканами или дитозилатами. Данный синтетический путь прост, эффективен и широко используется в органическом синтезе для получения азетидинов, пирролидинов, пиперидинов, азепанов и N-замещенных 2,3-1*H*-изоиндолов.¹⁶ Однако использование в подобных реакциях гидразонов ранее в литературе не было описано. Опубликованы немногочисленные примеры взаимодействия 1-аминопирролидина, 1-аминопиперидина и 1-аминоазепана с кетонами и альдегидами, приводящие к соединениям, содержащим соответствующие N-гетероциклы (схема 1).^{17,18} Указанные N-аминогетероциклы являются коммерческими

реагентами с достаточно высокой стоимостью. Нами было показано, что аналогичные гетероциклические производные терпеноидов можно получить взаимодействием гидразонов с алифатическими дигалогенидами, стоимость которых гораздо ниже. В представленной работе показан эффективный метод синтеза N-гетероциклических производных на основе гидразонов (+)-камфоры и (–)-фенхона и изучена противовирусная активность синтезированных соединений в отношении вируса гриппа А (H1N1) и псевдовирусов, имеющих на своей поверхности гликопротеины ВИЧ-1.

Схема 1

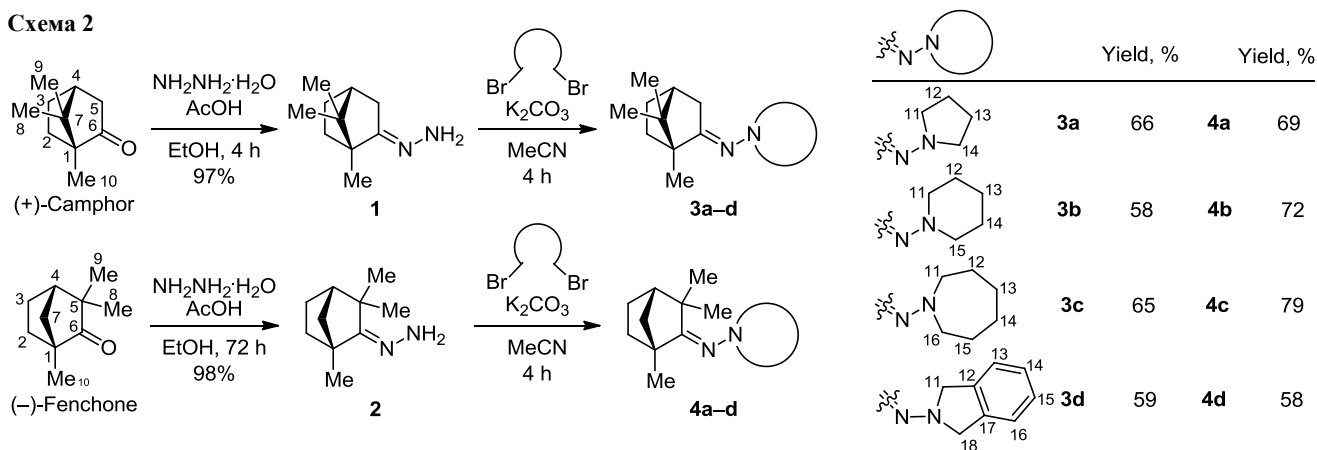


На первом этапе работы из (+)-камфоры и (–)-фенхона при взаимодействии с гидразингидратом в присутствии уксусной кислоты по известным методикам с выходами 97 и 98%^{19,20} были получены гидразоны **1** и **2** соответственно (схема 2). Наличие первичного атома азота в структуре предоставляет широкие возможности для модификации по этой функциональной группе. На основе гидразонов **1** и **2** нами был получен набор не описанных ранее гетероциклических производных. Так, было осуществлено взаимодействие гидразонов с различными дигалогеналканами и 1,2-бис(бромметил)-бензолом. Реакции представляют собой последовательное нуклеофильное замещение, в результате чего происходит замыкание цикла. Реакции проводились при кипячении в MeCN с добавлением K₂CO₃ в течение 4 ч. С использованием данного подхода нами были синтезированы и очищены методом колоночной хроматографии соединения, содержащие пирролидиновый (соединения **3a** и **4a**), пиперидиновый (соединения **3b** и **4b**), азепановый (соединения **3c** и **4c**) и изоиндолиновый фрагмент (соединения **3d** и **4d**) рядом с иминогруппой (схема 2).

Взаимодействие камфоры с первичными аминами, описанное нами ранее,² приводит к образованию соответствующих иминопроизводных, в то время как реакции фенхона с первичными аминами не идут, по видимому, за счет пространственного затруднения, вызванного гем-диметильной группой. Таким образом, химические модификации остова фенхона путем введения аминогруппы реакцией с гидразоном значительно расширяет потенциал использования данного природного кетона.

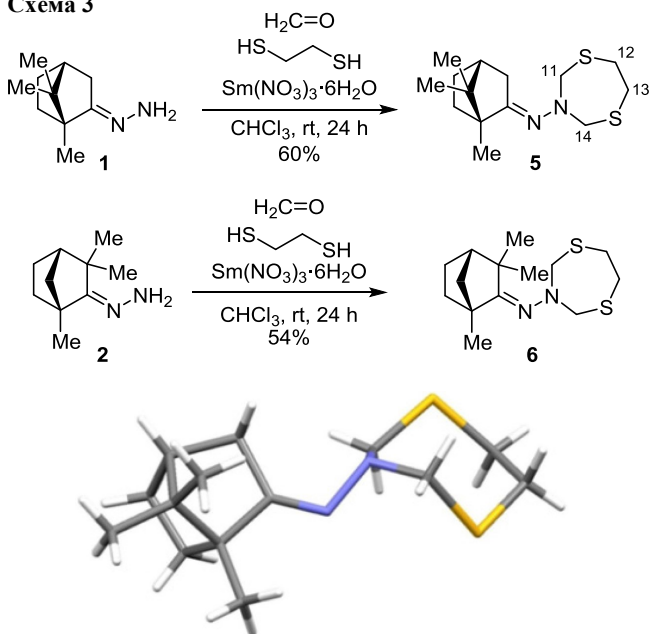
Ранее нами было показано, что взаимодействие первичных аминов с 2-меркаптоэтанолом и формальдеги-

Схема 2



дом в присутствии нитрата самария приводит к образованию неопisanного ранее 1,5,3-оксатиазепанового фрагмента.²¹ Проведение аналогичных превращений с гидразонами камфоры и фенхона не увенчалось успехом, выделение целевых продуктов методом колоночной хроматографии приводит к деградации продуктов. Однако в случае использования 1,2-этандитиола вместо 2-меркаптоэтанола конденсация гидразонов **1** и **2** в присутствии формальдегида в CHCl_3 с добавлением 5 моль. % катализатора $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ приводит к образованию гетероциклических соединений **5** и **6**, содержащих 1,5,3-дитазепановый фрагмент (схема 3). Синтезы соединений, содержащих 1,5,3-дитазепан, на основе первичных аминов описаны ранее,²² однако применение гидразонов в качестве субстратов ранее не исследовалось. Было показано, что продукты **5** и **6** возможно получать и без использования катализатора аналогично описанному ранее методу,²³ однако это приводит к увеличению времени реакции. Для 1,5,3-дитазепана **5** нам удалось получить кристалл, пригодный для проведения РСА (рис. 1).

Схема 3

Рисунок 1. Молекулярная структура соединения **5**.

Биологической активности соединений, полученных на основе гидразонов, посвящено достаточно много исследовательских работ²⁴ и обзоров.²⁵ Как правило, для синтеза целевых соединений используются разнообразные ароматические и гетероароматические альдегиды и кетоны, на основе которых и образуются гидразоны хорошо известными методами. В связи с тем, что ранее нами были выявлены выраженные противовирусные свойства у соединений на основе терпеноидов, имеющих N-гетероциклический фрагмент, в данной работе нами было проведено тестирование синтезированных агентов в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и в отношении псевдовирюсов, имеющих на своей поверхности гликопротеины ВИЧ-1 (табл. 1). Тестирование соединений в отношении вируса гриппа проводилось с использованием клеток MDCK, в отношении env-псевдовиральной системы – на клеточной линии Tzm-bl. В качестве препаратов сравнения использовали противо-

Таблица 1. Противовирусная активность синтезированных соединений **3a–d**, **4a–d**, **5**, **6**

Соединение	Вирус гриппа А (H1N1)			ВИЧ-1 (подтип В)	
	CC ₅₀ ,* мкМ	IC ₅₀ ,** мкМ	SI***	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ
3a	145 ± 4	12 ± 0.6	12	100	NA* ⁴
3b	803 ± 9	58 ± 2.1	13	220	NA
3c	704 ± 51	63 ± 2.5	11	350	NA
3d	>1119	NA* ⁴	–	525	NA
4a	704 ± 46	NA	–	195	NA
4b	>1119	NA	–	1000	NA
4c	550 ± 7	NA	–	400	NA
4d	233 ± 9	NA	–	240	NA
5	158 ± 4	NA	–	40	NA
6	145 ± 7	NA	–	32	NA
Римантадин	286 ± 10	55 ± 7	5	–	–
Маравирик	–	–	–	>10	0.002

* CC₅₀ – 50% цитотоксическая концентрация, при которой разрушается 50% клеток в инфицированном монослое.

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

*** SI – индекс селективности, отношение CC₅₀/IC₅₀.

*⁴ NA – нет активности.

вирусные средства римантадин и маравирик, активные на ранней стадии вирусной репликации соответствующих вирусов.

Как видно из представленных данных, только соединения **3a–c**, синтезированные нами на основе гидразона камфоры **1**, проявили активность в отношении вируса гриппа H1N1. Среди них наибольшую активность показало соединение **3a**, содержащее пирролидиновый фрагмент (IC₅₀ 12 мкМ, SI 12). Соединения **3b,c** в отношении вируса гриппа проявили меньшую активность, чем соединения **3a**, однако они являются менее токсичными, что приводит к сравнимым индексам селективности. Аналогичные гетероциклические производные с фенхоновым остовом активности не проявили вовсе. Соединения **5** и **6**, содержащие 1,3,5-дизазепановый фрагмент, были более токсичными по отношению к обеим линиям клеток. Активность в отношении псевдовирусных систем, содержащих гликопротеин ВИЧ-1, обнаружена нами не была.

Таким образом, нами показано, что химические модификации гидразонов камфоры и фенхона могут приводить к синтезу новых гетероциклических производных, а первичная аминогруппа устойчивых гидразонов каркасных кетонов вступает в реакции, присущие классическим аминам. С использованием разработанного нами метода синтез гетероциклических производных на основе гидразонов проходит с хорошими выходами и с использованием коммерчески доступных реагентов. Проведенные исследования противовирусной активности показали, что N-гетероциклические соединения на основе камфоры могут рассматриваться в качестве перспективных агентов, обладающих выраженной активностью в отношении вируса гриппа А.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C зарегистрированы на спектрометре AV-400 (400 и 100 МГц) в CDCl₃, в качестве внутренних стандартов использованы сигналы CDCl₃ (7.24 м. д. для ядер ¹H, 76.9 м. д. для ядер ¹³C). Строение полученных соединений установлено на основе анализа спектров ЯМР ¹H и ¹³C с привлечением двумерных спектров гомоядерной ¹H–¹H корреляции (¹H–¹H COSY) и двумерных спектров гетероядерной ¹H–¹³C корреляции на прямых (¹H–¹³C COSY, ¹J_{CH} = 160.0 Гц) и дальних KCCB (COLOC, ^{2,3}J_{CH} = 10.0 Гц). Масс-спектры высокого разрешения записаны на спектрометрах DFS ThermoScientific и Agilent 7200 Accurate Mass Q-TOF в режиме полного сканирования в диапазоне *m/z* 0–500, ионизация ЭУ (70 эВ) при прямом вводе образца. Температуры плавления определены на столике Кофлера. Разделение и выделение продуктов реакций проведено с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60–200 мкм, Macherey-Nagel). Нумерация атомов при отнесении сигналов в спектрах ЯМР ¹H и ¹³C не совпадает с нумерацией атомов по номенклатуре ИЮПАК.

Синтез соединений 3a–d и 4a–d (общая методика). В 30 мл MeCN растворяют 0.5 г (0.003 моль) гидразона камфоры (**1**) или гидразона фенхона (**2**), добавляют

0.5 г K₂CO₃ и эквимолярное количество (0.003 моль) соответствующего диалогеналкана или 1,2-бис(бромметил)бензола. Реакционную смесь кипятят в течение 4 ч в колбе с обратным холодильником, после чего смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют. Фильтрат упаривают, продукты в индивидуальном виде выделяют с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюент CHCl₃–MeOH, градиент 0–20%.

N-((1R,2E,4R)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)пирролидин-1-амин (3a). Выход 0.44 г (66%), желтое масло. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.74 (3H, с, CH₃); 0.87 (3H, с, CH₃); 0.93 (3H, с, 10-CH₃); 1.13–1.23 (1H, м, 3-CH₂); 1.30–1.40 (1H, м, 2-CH₂); 1.59–1.70 (1H, м, 2-CH₂); 1.74–1.82 (5H, м, 3,12,13-CH₂); 1.83–1.87 (1H, м, 4-CH); 1.90 (1H, д, *J* = 17.2, 5-CH₂); 2.42 (1H, д, т, *J* = 17.2, *J* = 3.7, 5-CH₂); 2.88–2.99 (4H, м, 11,14-CH₂). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 11.6 (C-10); 18.8 (C-8(9)); 19.4 (C-9(8)); 23.1 (C-12,13); 27.3 (C-3); 32.8 (C-2); 36.7 (C-5); 44.1 (C-4); 47.3 (C-7); 52.3 (C-1); 55.1 (C-11,14); 172.0 (C-6). Найдено, *m/z*: 220.1935 [M]⁺. C₁₄H₂₄N₂. Вычислено, *m/z*: 220.1934.

N-((1R,2E,4R)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)пиперидин-1-амин (3b). Выход 0.41 г (58%), желтое масло. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.72 (3H, с, CH₃); 0.86 (3H, с, CH₃); 0.95 (3H, с, 10-CH₃); 1.11–1.20 (1H, м, 3-CH₂); 1.27–1.35 (1H, м, 2-CH₂); 1.35–1.42 (2H, м, 13-CH₂); 1.55–1.67 (5H, м, 2,12,14-CH₂); 1.71–1.79 (1H, м, 3-CH₂); 1.79–1.84 (1H, м, 4-CH); 1.97 (1H, д, *J* = 18.0, 5-CH₂); 2.50 (1H, д, т, *J* = 18.0, *J* = 3.8, 5-CH₂); 2.56 (4H, т, *J*_{11–12} = 5.4, 11,15-CH₂). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 11.4 (C-10); 18.7 (C-8(9)); 19.3 (C-9(8)); 23.8 (C-13); 25.3 (C-12,14); 27.2 (C-3); 32.3 (C-2); 35.4 (C-5); 43.7 (C-4); 47.2 (C-7); 52.0 (C-1); 55.6 (C-11,15); 179.0 (C-6). Найдено, *m/z*: 234.2090 [M]⁺. C₁₅H₂₆N₂. Вычислено, *m/z*: 234.2091.

N-((1R,2E,4R)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)азепан-1-амин (3c). Выход 0.48 г (65%), желтое масло. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.72 (3H, с, CH₃); 0.87 (3H, с, CH₃); 0.94 (3H, с, 10-CH₃); 1.12–1.19 (1H, м, 3-CH₂); 1.28–1.35 (1H, м, 2-CH₂); 1.51–1.58 (4H, м, 13,14-CH₂); 1.59–1.69 (5H, м, 2,12,15-CH₂); 1.72–1.81 (1H, м, 3-CH₂); 1.81–1.84 (1H, м, 4-CH); 1.89 (1H, д, *J* = 17.5, 5-CH₂); 2.44 (1H, д, т, *J* = 17.5, *J* = 3.9, 5-CH₂); 2.86 (4H, т, *J* = 6.0, 11,16-CH₂). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 11.5 (C-10); 18.7 (C-8(9)); 19.4 (C-9(8)); 26.6 (C-13,14); 27.2 (C-12,15); 27.3 (C-3); 32.4 (C-2); 36.1 (C-5); 43.9 (C-4); 47.2 (C-7); 52.0 (C-1); 58.2 (C-11,16); 174.1 (C-6). Найдено, *m/z*: 248.2248 [M]⁺. C₁₆H₂₈N₂. Вычислено, *m/z*: 248.2247.

N-((1R,2E,4R)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-амин (3d). Выход 0.47 г (59%), темно-коричневое масло. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.81 (3H, с, 9-CH₃); 0.92 (3H, с, 8-CH₃); 1.00 (3H, с, 10-CH₂); 1.20–1.31 (1H, м, 3-CH₂); 1.37–1.49 (1H, м, 2-CH₂); 1.64–1.76 (1H, м, 2-CH₂); 1.77–1.89 (1H, м, 3-CH₂); 1.90–1.95 (1H, м, 4-CH); 2.00 (1H, д, *J* = 17.2, 5-CH₂); 2.53 (1H, д, т, *J* = 17.2, *J* = 3.6, 5-CH₂); 4.30–4.44 (4H, м, 11,18-CH₂); 7.18 (4H, уш. с, H-13–16). Спектр

ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 11.6 (C-10); 18.8 (C-8); 19.4 (C-9); 27.4 (C-3); 32.9 (C-2); 36.7 (C-5); 44.2 (C-4); 47.3 (C-7); 52.4 (C-1); 61.1 (C-11,18); 122.1 (C-13,16); 126.7 (C-14,15); 138.4 (C-12,17); 171.9 (C-6). Найдено, m/z : 268.1932 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2$. Вычислено, m/z : 268.1934.

***N*-((1*R*,2*Z*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)пирролидин-1-амин (4а).** Выход 0.46 г (69%), желтое масло. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 1.19 (3H, с, 10- CH_3); 1.21 (3H, с, 8- CH_3); 1.27 (3H, с, 9- CH_3); 1.24–1.37 (2H, м, 6- CH_2); 1.42–1.57 (2H, м, 5,7- CH_2); 1.60–1.67 (1H, м, 5- CH_2); 1.69–1.83 (6H, м, 4-CH, 7,12,13- CH_2); 2.50–2.64 (4H, с, 11,14- CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.5 (C-10); 22.5 (C-12,13); 23.9 (C-9); 24.8 (C-8); 25.2 (C-5); 33.7 (C-6); 42.8 (C-7); 45.1 (C-3); 48.5 (C-4); 50.5 (C-1); 55.8 (C-11,14). Найдено, m/z : 220.1932 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2$. Вычислено, m/z : 220.1934.

***N*-((1*R*,2*Z*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)пиперидин-1-амин (4б).** Выход 0.51 г (72%), желтое масло. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 1.19 (3H, с, CH_3); 1.21 (3H, с, CH_3); 1.28 (3H, с, 9- CH_3); 1.30–1.43 (2H, м, 6- CH_2); 1.45–1.55 (2H, м, 5,7- CH_2); 1.55–1.67 (7H, м, 5,12–14- CH_2); 1.68–1.79 (2H, м, 4-CH, 7- CH_2); 2.36–2.50 (4H, с, 11,15- CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.5 (C-10); 23.2 (C-9); 24.3 (C-8); 24.8 (C-13); 25.1 (C-12,14); 25.2 (C-5); 33.5 (C-6); 42.7 (C-7); 44.9 (C-3); 48.4 (C-4); 50.3 (C-1); 56.3 (C-11,15). Найдено, m/z : 234.2089 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2$. Вычислено, m/z : 234.2091.

***N*-((1*R*,2*Z*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)азепан-1-амин (4с).** Выход 0.59 г (79%), желтое масло. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 1.18 (3H, с, CH_3); 1.22 (3H, с, CH_3); 1.29 (3H, с, 9- CH_3); 1.34–1.46 (2H, м, 6- CH_2); 1.46–1.54 (2H, м, 5,7- CH_2); 1.54–1.74 (9H, м, 5,12–15- CH_2); 1.74–1.87 (2H, м, 4-CH, 7- CH_2); 2.53–2.62 (4H, м, 11,16- CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.7 (C-10); 23.6 (C-9); 24.6 (C-8); 25.2 (C-5); 26.3 (C-13,14); 26.5 (C-12,15); 33.5 (C-6); 42.7 (C-7); 44.7 (C-3); 48.6 (C-4); 50.4 (C-1); 59.7 (C-11,16). Найдено, m/z : 248.2250 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2$. Вычислено, m/z : 248.2247.

***N*-((1*R*,2*Z*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)-1,3-дигидро-2*H*-изоиндол-2-амин (4д).** Выход 0.47 г (58%), светло-коричневый порошок, т. пл. 75°C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 1.25 (3H, с, 8- CH_3); 1.28 (3H, с, 10- CH_3); 1.30–1.42 (2H, м, 2,3- CH_2); 1.34 (3H, с, 9- CH_3); 1.52–1.61 (2H, м, 3,7- CH_2); 1.67–1.75 (1H, м, 2- CH_2); 1.75–1.85 (2H, м, 4-CH, 7- CH_2); 3.95–4.10 (4H, м, 11,18- CH_2); 7.17 (4H, уш. с, H-13–16). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.2 (C-10); 23.8 (C-8); 24.6 (C-9); 24.9 (C-3); 33.4 (C-2); 42.5 (C-7); 45.0 (C-5); 48.3 (C-4); 50.5 (C-1); 61.1 (C-11,18); 121.7 (C-13,16); 126.2 (C-14,15); 139.4 (C-12,17). Найдено, m/z : 268.1936 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2$. Вычислено, m/z : 268.1934.

Синтез 1,5,3-дигиазепанов 5 и 6 (общая методика). В круглодонной колбе 0.25 мл (0.003 моль) этандитиола растворяют в 30 мл CHCl_3 , приливают 0.5 мл водного раствора формальдегида (30%) и добавляют 0.07 г $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Перемешивают на магнитной мешалке в течение 15 мин, затем по каплям добавляют раствор 0.5 г (0.003 моль) гидразона камфоры (1) или гидразона фенхона (2) в 20 мл CHCl_3 . Перемешивают в течение

24 ч, промывают H_2O , экстрагируют CHCl_3 (3 \times 10 мл). Органический слой упаривают на ротационном испарителе. Очищают методом колоночной хроматографии, элюент гексан– EtOAc , градиент 0–20%.

***N*-((1*R*,2*E*,4*R*)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)-1,5,3-дигиазепан-3-амин (5).** Выход 0.51 г (60%), белый порошок, т. пл. 81°C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 0.72 (3H, с, 9- CH_3); 0.88 (3H, с, 8- CH_3); 0.96 (3H, с, 10- CH_3); 1.11–1.20 (1H, м, 3- CH_2); 1.28–1.38 (1H, м, 2- CH_2); 1.60–1.70 (1H, м, 2- CH_2); 1.74–1.83 (1H, м, 3- CH_2); 1.84–1.88 (1H, м, 4-CH); 1.92 (1H, д, *J* = 17.7, 5- CH_2); 2.42–2.51 (1H, м, 5- CH_2); 2.96 (4H, с, 12,13- CH_2); 4.27 (4H, с, 11,14- CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 11.5 (10- CH_3); 18.8 (8(9)- CH_3); 19.5 (9(8)- CH_3); 27.4 (C-3); 32.4 (C-2); 36.6 (C-5); 37.6 (C-12,13); 43.9 (C-4); 47.5 (C-7); 52.9 (C-1); 59.6 (C-11,14); 180.6 (C-6). Найдено, m/z : 284.1376 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S}_2$. Вычислено, m/z : 284.1375.

***N*-((1*R*,2*Z*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-илиден)-1,5,3-дигиазепан-3-амин (6).** Выход 0.46 г (54%), белый порошок, т. пл. 64°C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (*J*, Гц): 1.18 (6H, с, 8,10- CH_3); 1.24 (3H, с, 9- CH_3); 1.26–1.34 (2H, м, 6- CH_2); 1.45–1.55 (2H, м, 5,7- CH_2); 1.59–1.65 (1H, м, 5- CH_2); 1.68–1.76 (2H, м, 4-CH, 7- CH_2); 2.94 (4H, с, 12,13- CH_2); 4.15 (4H, с, 11,14- CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 17.4 (C-10); 23.7 (C-9); 24.6 (C-8); 25.1 (C-5); 33.4 (C-6); 37.5 (C-12,13); 42.7 (C-7); 45.2 (C-3); 48.5 (C-4); 51.1 (C-1); 60.3 (C-11,14). Найдено, m/z : 284.1374 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S}_2$. Вычислено, m/z : 284.1375.

Биологическое тестирование. Изучение активности полученных соединений 3а–д, 4а–д, 5 и 6 в отношении вируса гриппа. Для определения противовирусной активности полученных соединений готовят серию последовательных разведений от 300 до 4 мкг/мл на среде для культивирования клеток с добавлением 1 мкг/мл трипсина и вносят в культуру клеток за 1 ч до инфицирования их вирусом. Клетки инкубируют при 36°C в атмосфере 5% CO_2 . Инфицирование клеток проводят вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при множественности заражения 0.01 TCID₅₀ на клетку в течение 1 ч при 4°C. После этого проводят отмывку несвязавшихся вирионов и инкубируют планшеты 24 ч при 36°C. После окончания эксперимента из надосадочной жидкости делают серию десятикратных разведений (10^{-3} – 10^{-8}), которые наносят на свежую культуру клеток и инкубируют в течение 48 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносят в лунки круглодонного планшета для иммунологических реакций, после чего добавляют равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Учет результатов проводят через 1 ч инкубации при 20°C. За титр вируса принимают значение, обратное наибольшему разведению вируса, способному вызвать положительную реакцию гем-агглютинации, и выражают в дозе вируса, инфицирующей 50% клеток культуры ткани (50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀), на 0.2 мл (TCID₅₀/0.2 мл). На основании полученных данных рассчитывают значение

IC₅₀, то есть концентрацию соединения, снижающую титр вируса вдвое по сравнению с контролем.

Для оценки токсичности в опытах на клеточной культуре из исследуемых соединений готовят серию двукратных разведений в концентрации от 300 до 4 мкг/мл на поддерживающей среде Игла MEM. Разведения соединений вносят в лунки планшетов. Клетки инкубируют в течение 48 ч при 36°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Затем проводят микротетразолиевый (МТТ) тест на 96-луночных планшетах.²⁶ Клетки промывают 2 раза физиологическим раствором (0.9% NaCl) и добавляют по 100 мкл/лунку раствора МТТ (бромид 3-(4.5-диметилтиазол-2)-2.5-дифенилтетразолия) в концентрации 0.5 мкг/мл в поддерживающей среде Игла MEM. Планшеты инкубируют в течение 1 ч при 36°C, после чего жидкость удаляют и добавляют в лунки по 0.1 мл ДМСО. Оптическую плотность ячеек измеряют на спектрофотометре Thermo Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 540 нм. На основании полученных данных рассчитывают CC₅₀, то есть концентрацию препарата, разрушающую 50% клеток в культуре. На основании полученных данных для каждого соединения рассчитывают индекс селективности (SI), представляющий собой отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Изучение активности полученных соединений 3a–d, 4a–d, 5 и 6 в отношении псевдовирюсов, содержащих гликопротеин ВИЧ-1. Для определения цитотоксической концентрации тестируемых соединений, за день до внесения соединений в 96-луночные культуральные планшеты засевают клетки Tzm-bl в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (10⁴ клеток на каждую лунку) и помещают в CO₂-инкубатор. На следующий день, после 24 ч инкубации к культуре клеток Tzm-bl методом раститровки добавляют исследуемые соединения в различных концентрациях (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 и 15.6 мкМ). Каждую концентрацию тестируют в трех повторах. В контрольные лунки добавляют ДМСО в концентрации не более 1%. Конечный объем среды в лунке – 200 мкл. Планшет с внесенными соединениями инкубируют в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂. После 72 ч инкубации клеточной линии Tzm-bl с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносят по 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубируют еще 2 ч в условиях CO₂-инкубатора. Через 2 ч планшеты достают из CO₂-инкубатора и заменяют среду в каждой лунке на раствор ДМСО (50 мкл/лунка). Планшеты аккуратно встряхивают для растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного фотометра определяют оптическую плотность каждой лунки при 570 нм. Выживаемость клеток Tzm-bl в присутствии исследуемого соединения рассчитывают по формуле: (ОП опытных лунок – ОП среды) / (ОП контрольных лунок – ОП среды) × 100%, где ОП – оптическая плотность. Концентрацию, вызывающую гибель 50% клеток (CC₅₀), определяют на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.

Анализ нейтрализации проводят с использованием env-псевдовирюсов на основе штаммов ВИЧ-1 SF162.LS и QH0692, которые относятся к подтипу В и входят в международную референсную панель псевдовирюсов ВИЧ-1. Нейтрализацию псевдовирюсов тестируемыми соединениями проводят в 96-луночных культуральных планшетах по ранее описанной методике.²⁷ В ростовой среде DMEM готовят серийные двукратные разведения образцов тестируемых соединений, затем вносят по 200 TCID₅₀ псевдовирюса в каждую лунку и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем вносят по 20 мкл трипсинизированной суспензии клеток TZM-bl в количестве 1·10⁶ кл/мл с добавлением ДЭАЭ-декстрана в концентрации 30 мкг/мл суспензии. Планшеты инкубируют при 37°C и 5% CO₂. Через 48 ч проводят учет сигнала люминесценции. Процент нейтрализации каждого образца вычисляют как отношение между значениями относительных единиц света тестовых лунок (тестируемый образец + псевдовирюс + клетки) и контролем вируса (псевдовирюс + клетки). Статистическую обработку данных и вычисление IC₅₀ проводят с применением программы GraphPad Prism 6, используя метод нелинейной регрессии.

Рентгеноструктурное исследование соединения 5 проведено на дифрактометре Bruker Карра Apex II. Полные кристаллографические данные соединения 5 депонированы в Кембриджском банке структурных данных (депонент CCDC 2048275).

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР ¹H и ¹³C всех синтезированных соединений, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 18-03-00271, 19-44-540008) и в рамках работы над государственным заданием Министерства науки и образования (№ 0238-2021-0003).

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования "Химический сервисный центр СО РАН" за проведение спектральных и аналитических исследований.

Список литературы

- Salakhutdinov, N. F.; Volcho, K. P.; Yarovaya, O. I. *Pure Appl. Chem.* **2017**, *89*, 1105.
- Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Shernyukov, A. V.; Gatilov, Y. V.; Razumova, Y. V.; Zarubaev, V. V.; Tretiak, T. S.; Pokrovsky, A. G.; Kiselev, O. I.; Salakhutdinov, N. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *105*, 263.
- Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Baev, D. S.; Shernyukov, A. V.; Shtro, A. A.; Zarubaev, V. V.; Salakhutdinov, N. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 661.
- Zarubaev, V. V.; Garshinina, A. V.; Tretiak, T. S.; Fedorova, V. A.; Shtro, A. A.; Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Salakhutdinov, N. F. *Antiviral Res.* **2015**, *120*, 126.
- Zarubaev, V. V.; Pushkina, E. A.; Borisevich, S. S.; Galochkina, A. V.; Garshinina, A. V.; Shtro, A. A.; Egorova, A. A.; Sokolova, A. S.; Khursan, S. L.; Yarovaya, O. I.; Salakhutdinov, N. F. *Virology* **2018**, *524*, 69.

6. Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Semenova, M. D.; Shtro, A. A.; Orshanskaya, I. R.; Zarubaev, V. V.; Salakhutdinov, N. F. *MedChemComm* **2017**, 8, 960.
7. Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Bormotov, N. I.; Shishkina, L. N.; Salakhutdinov, N. F. *Chem. Biodivers.* **2018**, 15, e1800153.
8. Kononova, A. A.; Sokolova, A. S.; Cheresiz, S. V.; Yarovaya, O. I.; Nikitina, R. A.; Chepurnov, A. A.; Pokrovsky, A. G.; Salakhutdinov, N. F. *MedChemComm* **2017**, 8, 2233.
9. Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Zybkina, A. V.; Mordvinova, E. D.; Shcherbakova, N. S.; Zaykovskaya, A. V.; Baev, D. S.; Tolstikova, T. G.; Shcherbakov, D. N.; Pyankov, O. V.; Maksyutov, R. A.; Salakhutdinov, N. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 207, 112726.
10. Yarovaya, O. I.; Sokolova, A. S.; Mainagashev, I. Y.; Volobueva, A. S.; Lantseva, K.; Borisevich, S. S.; Shtro, A. A.; Zarubaev, V. V.; Salakhutdinov, N. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 126745.
11. Chernyshov, V. V.; Yarovaya, O. I.; Peshkov, R. Yu.; Salakhutdinov, N. F. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2020**, 56, 763. [Химия гетероцикл. соединений **2020**, 56, 763.]
12. Chernyshov, V. V.; Yarovaya, O. I.; Fadeev, D. S.; Gatilov, Y. V.; Esaulkova, Y. L.; Muryleva, A. S.; Sinegubova, K. O.; Zarubaev, V. V.; Salakhutdinov, N. F. *Mol. Diversity* **2020**, 24, 61.
13. Zhao, J.; Aisa, H. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 2321.
14. Hwang, D.-R.; Wu, Y.-S.; Chang, C.-W.; Lien, T.-W.; Chen, W.-C.; Tan, U.-K.; Hsu, J. T. A.; Hsieh, H.-P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 83.
15. Urano, E.; Ablan, S. D.; Mandt, R.; Pauly, G. T.; Sigano, D. M.; Schneider, J. P.; Martin, D. E.; Nitz, T. J.; Wild, C. T.; Freed, E. O. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 190.
16. Kovaleva, K. S.; Yarovaya, O. I.; Shernyukov, A. V.; Zarubaev, V. V.; Shtro, A. A.; Orshanskaya, Y. R.; Salakhutdinov, N. F. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2017**, 53, 364. [Химия гетероцикл. соединений **2017**, 53, 364.]
17. Ghiglieri-Bertez, C.; Coquelet, C.; Alazet, A.; Bonne, C. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, 22, 147.
18. Li, L.; Li, Z.; Wang, K.; Liu, Y.; Li, Y.; Wang, Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 474.
19. Mikle, G.; Boros, B.; Kollár, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, 27, 377.
20. Perera, S. D.; Shaw, B. L.; Thornton-Pett, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 713.
21. Kovaleva, K. S.; Yarovaya, O. I.; Fadeev, D. S.; Salakhutdinov, N. F. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 1868.
22. Makhmudiyarova, N. N.; Prokofev, K. I.; Mudarisova, L. V.; Ibragimov, A. G.; Dzhemilev, U. M. *Russ. J. Org. Chem.* **2013**, 49, 658. [Журн. орган. химии **2013**, 67, 677.]
23. Kletskov, A. V.; Frontera, A.; Sinelshchikova, A. A.; Grigoriev, M. S.; Zaytsev, V. P.; Grudova, M. V.; Bunev, A. S.; Presnukhina, S.; Shetnev, A.; Zubkov, F. I. *Synlett* **2020**, 1067.
24. Kaplánek, R.; Havlík, M.; Dolenský, B.; Rak, J.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Králová, J.; Král, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1651.
25. Rollas, S.; Küçükgülzel, S. *Molecules* **2007**, 12, 1910.
26. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
27. Legnani, L.; Colombo, D.; Venuti, A.; Pastori, C.; Lopalco, L.; Toma, L.; Mori, M.; Grazioso, G.; Villa, S. *MedChemComm* **2017**, 8, 422.