На правах рукописи

СЕННИКОВА ВАЛЕРИЯ ВИКТОРОВНА

2*H*-1,2-БЕНЗОКСАФОСФИНИНЫ В СИНТЕЗЕ НОВЫХ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ СТРУКТУР И ФОСФАНЕОФЛАВОНОИДОВ

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленном структурном подразделении федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Научный руководитель:	**Бурилов Александр Романович,** доктор химических наук, профессор
Официальные оппоненты:	**Белоглазкина Елена Кимовна,** доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», лаборатория биологически активных соединений, заведующая; **Иевлев Михаил Юрьевич,** кандидат химических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», кафедра органической и фармацевтической химии, доцент.
Ведущая организация:	федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Защита диссертации состоится 13 октября 2023 года в 10 ч. на заседании диссертационного совета 24.2.312.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, зал заседаний Учёного совета, А-330.

С диссертаций можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте КНИТУ https://www.kstu.ru/servlet/contentblob?id=466680.

Отзыв на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, КНИТУ, учёному секретарю диссертационного совета 24.2.312.03 и по e-mail: dissovet69@mail.ru.

Автореферат разослан_____июня 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Терещенко Константин Алексеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Один из больших разделов органической химии связан с химией кислородсодержащих гетероциклических соединений. Это объясняется важной ролью этих соединений во многих биологических процессах, а также присутствием на фармацевтическом рынке свыше 70% лекарственных препаратов, содержащих в структуре гетероциклическое ядро.

Многие природные вещества, которые проявляют высокую биологическую активность широкого спектра действия, имеют в своей структуре α-пироновое кольцо. При его аннелировании с бензольным кольцом образуются несколько новых классов гетероциклических соединений: кумарины, флавоны и их производные (флавоноиды). В то же время соединения, в основе структуры которых лежит спирогетероциклическая система, часто встречаются в лекарственных противораковых препаратах природного и синтетического происхождения.

С другой стороны, фосфорорганические соединения, по-прежнему, привлекают пристальное внимание исследователей ввиду своей распространенности в биологических системах (нуклеиновые кислоты, АТФ в нуклеотидах) и большого скрытого потенциала использования в качестве лекарственных препаратов для лечения и диагностики различных заболеваний человека. Замена α-пиранилового атома углерода в кумаринах и флавоноидах на атом фосфора приводит к новому типу соединений – фосфоновым кислотам, образующим, соответственно, фосфакумарины (фосфинины) и фосфафлавоноиды. Учитывая высокую биологическую активность ряда фосфорсодержащих соединений, можно предположить, что аналоги кумаринов и флавоноидов – фосфакумарины и фосфанеофлавоноиды – также могут проявлять высокую и разнообразную биологическую активность. Однако основной проблемой для развития этого направления является отсутствие разработанных методов синтеза производных фосфакумаринов и фосфанеофлавоноидов. Таким образом, развитие новых методов синтеза указанных выше структур является **важным** и **актуальным** и позволит существенно расширить их библиотеку и исследовать биологическую активность с целью выявления перспективных структур-лидеров.

Степень разработанности темы исследования. К началу наших работ, химические свойства фосфакумаринов были представлены лишь единичными работами. Практически не было данных о реакциях, протекающих с участием эндоциклической углерод-углерод двойной связи. В некоторых литературных источниках рассмотрены примеры использования фосфининов в реакции циклоприсоединения или замещения при двойной связи, приводящие к образованию полициклических и полиароматических структур. Известны единичные работы авторского коллектива сотрудников лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова, обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН, по реакциям фосфининов с фенолами, приводящим к образованию фосфанеофлавоноидов. В литературе практически отсутствуют данные об исследовании биологической активности фосфакумаринов и фосфанеофлавоноидов. Таким образом, в данной диссертационной работе предстояло восполнить этот пробел: изучить реакции [3+2] циклоприсоединения фосфининов с различными 1,3-диполями, а также с фенолами,

содержащими функциональные заместители в ароматическом ядре, позволяющие получать новые фосфорсодержащие полициклические соединения, фосфанеофлавоноиды, каркасные фосфонаты несимметричного типа и исследовать их биологическую активность.

Цель работы заключается в синтезе новых полициклических азот-, фосфорсодержащих структур, фосфанеофлавоноидов, на платформе 2*H*-1,2-бензоксафосфининов и изучении их противоопухолевой активности.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Исследование реакций 1,3-диполярного циклоприсоединения различных диполей с 2*H*-1,2-бензоксафосфининами;
2. Синтез новых фосфанеофлавоноидов и изучение возможности их функционализации;
3. Синтез новых функциональнозамещенных каркасных фосфонатов несимметричного типа;
4. Изучение цитотоксичности в ряду синтезированных соединений.

Научная новизна. Впервые показано, что 2*H*-1,2-бензоксафосфинины вступают в реакцию [3+2] циклоприсоединения с участием различных 1,3-диполей (нитроном, азометинилидами) с образованием новых азот-, фосфорсодержащих полициклических структур со спиросочленением. Показана высокая стереоселективность реакции.

Впервые был изучен профиль реакции [3+2] циклоприсоединения фосфакумаринов с азометинилидами с использованием квантово-химических расчетов методом теории функционала плотности (DFT), и было показано, что регио- и диастереоселективность реакции обусловлена более быстрым образованием одного из изомеров, являющегося продуктом кинетического контроля.

В результате проведения оригинальной реакции 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с различными фенолами в трифторуксусной кислоте синтезированы новые функционализированные фосфанеофлавоноиды, содержащие в своей структуре атомы галогенов, кислотную и карбонильную группы, алифатические радикалы.

Впервые, по реакции Манниха, получены новые аминометилированные производные фосфанеофлавоноидов. Найдено, что в зависимости от природы амина и фосфанеофлавоноида образуются продукты, содержащие в структуре одну или две аминометильные группы.

Впервые получены дибромсодержащие производные фосфанеофлавоноидов в результате исчерпывающего бромирования фосфанеофлавоноидов элементным бромом.

В результате внутримолекулярной гетероциклизации соответствующих функционально замещенных фосфанеофлавоноидов получены новые каркасные фосфонаты несимметричного типа, содержащие терминальные функциональные группы: атомы галогенов, кислотную, карбонильную группу, алифатические радикалы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Научно обоснованы направления протекания реакции 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с различными 1,3-диполями, позволяющие целенаправленно получать сложные фосфорсодержащие полициклические структуры.

Разработан метод синтеза новых типов фосфанеофлавоноидов, позволяющий вводить в реакцию с 2-гидрокси-5,7,8-триметилбензоксафосфинином ранее неактивные фенолы (4-

метилрезорцин, 4-этилрезорцин, 4-гексилрезорцин, 4-хлор- и 4-бромрезорцин, β-резорциловую кислоту, 2,4-дигидроксибензальдегид).

В результате тестирования цитотоксичности некоторых из синтезированных соединений показано, что фосфорсодержащие полициклические соединения проявляют высокую противоопухолевую активность в отношении ряда клеточных линий (MCF-7, HuTu 80, M-HeLa). Среди всех исследуемых соединений было выявлено соединение-лидер 6a. Его цитотоксичность против HuTu 80 примерно в 2.6 раза выше препарата сравнения (25.1±1.9 против 65.2±5.6 мкМ соответственно), а по отношению к здоровым клеткам печени человека – более чем в 10 раз ниже, индекс селективности SI > 32. Для линий M-HeLa активность соединения 6a немного выше 5-фторурацила (52.6±4.1 против 62.0±4.7 мкМ соответственно), индекс селективности более SI > 15, а по отношению к MCF-7 цитотоксичность ниже препарата сравнения при достаточно высоком значении индекса селективности (SI > 10).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.4.3. Органическая химия (химические науки) по п.1. «Выделение и очистка новых соединений», п.3. «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», п.7. «Выявление закономерностей типа «структура – свойство».

Методология диссертационного исследования. Методологическая часть исследования состояла в разработке и оптимизации методов синтеза новых типов фосфорсодержащих полициклических соединений и фосфанеофлавоноидов. Целевые соединения были получены в результате оригинальных реакций 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с 1,3-диполями и различными фенолами, содержащими функциональные группы.

На защиту выносятся следующие положения

- Метод синтеза новых полициклических фосфорсодержащих соединений со спиросочленением, основанный на реакции [2+3] циклоприсоединения 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с 1,3-диполями (нитроном, азометинлидами).
- Метод синтеза функциональнозамещённых фосфанефлавоноидов, основанный на реакции 2-гидрокси-5,7,8-триметилбензоксафосфинина с 4-метилрезорцином, 4-этилрезорцином, 4-гексилрезорцином, 4-хлор- и 4-бромрезорцином, β-резорциловой кислотой, 2,4-дигидроксибензальдегидом.
- Метод синтеза новых каркасных фосфонатов несимметричного типа на базе замещённых фосфанеофлавоноидов путем внутримолекулярной циклизации.

Апробация работы. Материалы работы докладывались и обсуждались на научных конференциях различного уровня: Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы химии, технологии и фармации» (2020, Чебоксары); V Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (2021, Сочи); XXV всероссийская конференция молодых учёных-химиков (2022, Нижний Новгород); XXIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2022, Москва); The 6th International Conference “Advances in Synthesis and Complexing” (2022, Москва); Научная конференция Казанского национального исследовательского технологического университета по итогам 2022 года (2023, Казань).

Публикации. По материалам работы опубликовано 2 научные статьи, одна из них – в издании первого квартиля (Q1), в российских и международных научных журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертации, входящих в реферативную базу Web of Sciences, Scopus, а также 5 тезисов докладов на конференциях различного уровня.

Методы исследования и степень достоверности результатов. Достоверность результатов проведённых исследований подтверждается использованием комплекса современных физических методов исследования: масс-спектрометрии, в том числе высокого разрешения, ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, в том числе с использованием 2D-корреляций, а также элементного анализа и рентгеноструктурного анализа.

Работа выполнена на кафедре технологии основного органического и нефтехимического синтеза имени профессора Г.Х. Камая федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ») и в лаборатории элементоорганического синтеза им. А.Н. Пудовика Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Структура и объём диссертации. Настоящая диссертация изложена на 152 страницах, содержит 4 таблицы, 51 рисунок, 62 схемы и состоит из введения, трех глав, списка сокращений, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 154 наименования. В первой главе представлен литературный обзор по теме «Получение и свойства кумаринов, флавоноидов, а также их Р-содержащих аналогов», обобщающие материалы по основным методам синтеза и исследованию химических свойств кумаринов, флавоноидов и их фосфорсодержащих структурных аналогов. Во второй главе приведены результаты собственных исследований и обсуждение полученных результатов. Третья глава диссертационной работы содержит описание экспериментов и спектральные характеристики полученных соединений.

Личный вклад соискателя. Автором диссертационной работы самостоятельно проведён анализ литературных данных. Экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены автором лично или при его непосредственном участии. Соискатель принимал участие в постановке цели работы и составлении плана исследований, обсуждении результатов и формулировке выводов, подготовке статей и тезисов докладов.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.х.н., проф. А.Р. Бурилову, к.х.н., с.н.с. Ю.М. Садыковой, к.х.н., м.н.с. А.В. Залалтдиновой за помощь при проведении исследований. Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН. Автор благодарит профессора С.В. Бухарова и сотрудников кафедры ТООНС ФГБОУ ВО «КНИТУ». Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории ФХА и лаборатории радиоспектроскопии ИОФХ им. А.Е. Арбузова и лично д.х.н., г.н.с. А.Р. Хаматгалимову за проведение квантово-химических расчётов реакции 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с различными 1,3-диполями; сотрудникам лаборатории микробиологии и лично к.б.н. А.Д.

Волошиной. Автор благодарит к.х.н., с.н.с. лаборатории Химии координационных полиядерных соединений Института неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН Ю.К. Воронину и к.х.н., с.н.с. Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета Д.Р. Исламова.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Гетероциклические системы 2*H*-бензо[*e*]-1,2-оксафосфинины являются перспективным классом органических соединений, т.к. по своей структуре напоминают кумарины и α-хромены, обладающие широким спектром биологической активности. В литературном обзоре были представлены имеющиеся сведения о реакциях фосфининов, которые реализуются по атому четырёхкоординированного фосфора, по терминальному атому водорода углерод-углерод двойной связи гетероцикла. Кроме того, показаны единичные примеры реакций [2+2] и 1,3-диполярного циклоприсоединения, позволяющие получать полициклические фосфонаты. Ранее в лаборатории элементоорганического синтеза им. А.Н. Пудовика была найдена новая кислотно-катализируемая реакция фосфининов с некоторыми фенолами, открывающая большие синтетические возможности формирования фосфанеофлавоноидов (получено 4 примера), которые являются перспективными системами с высоким потенциалом биологической активности разного типа.

Как было отмечено в литературном обзоре, фосфанеофлавоноиды, являются мало изученным классом соединений. Этот факт обусловлен отсутствием разработанных методик их синтеза. Учитывая сходство в строении с природными флавоноидами, можно предположить, что фосфорсодержащие неофлавоноиды также могут обладать высокой биологической активностью. Поэтому представляется важным и актуальным дальнейшее развитие методов синтеза фосфанеофлавоноидов. Также важным является изучение их химических свойств: возможность функционализации (галогенирование, аминометилирование), реализация реакции гетероциклизации, позволяющая синтезировать неизвестные ранее несимметричные каркасные фосфонаты различного типа, впервые описанные в лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

1.1 Фосфакумарины в реакциях 1,3-диполярного циклоприсоединения

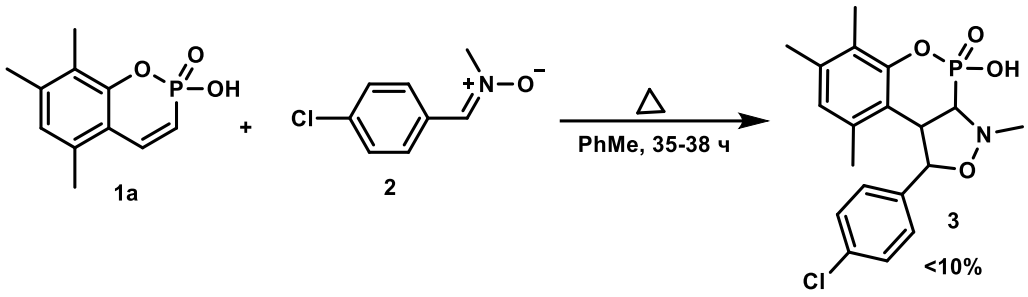
Наличие двойной связи в молекулах фосфининов позволяет им участвовать в реакциях 1,3-диполярного циклоприсоединения в виде диполярофила. В качестве объектов исследования выступили фосфинины с различными заместителями в ароматическом ядре, полученные ранее в лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика конденсацией 2-этоксивинилдихлорфосфоната с 2,3,5-триметилфенолом, 3-метоксифенолом, 2,4-дихлор-резорцином, β-нафтолом и 6-бром-нафтолом.

1.1.1 Реакция циклоприсоединения 2-гидрокси-5,7,8-триметилбензо[e][1,2]оксафосфинина с нитроном

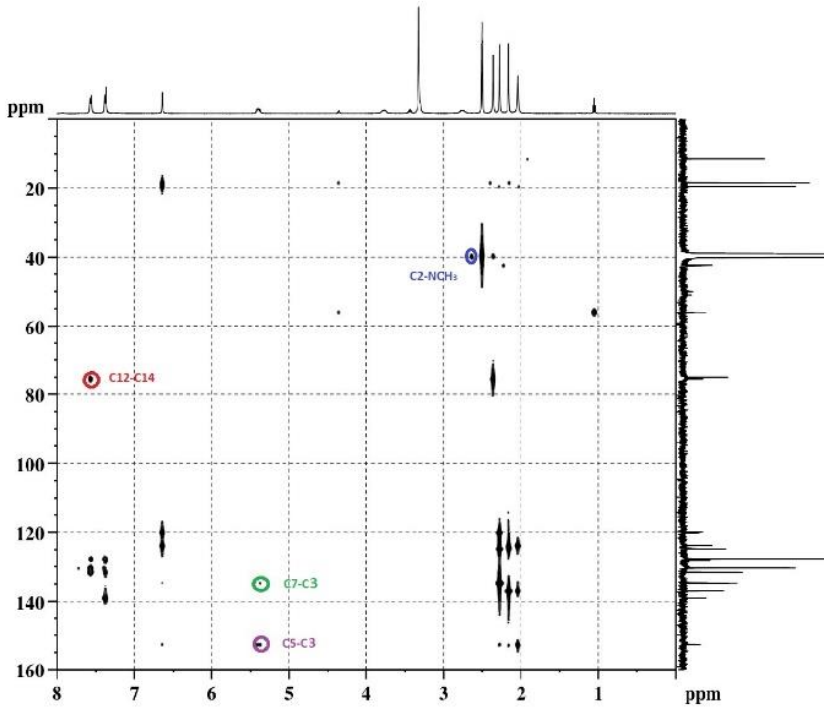
Взаимодействие фосфинина **1a** с нитроном (схема 1) протекало в толуоле, в котором при нагревании растворяются все компоненты реакционной смеси. Контроль за ходом реакции осуществляли при помощи спектроскопии ЯМР ^{31}P: через 2-3 часа после начала

кипения реакционной массы, появился сигнал с химическим сдвигом 17-19 м.д. По прошествии 35-38 часов конверсия исходного фосфинина **1a** составляла не более 40%. Однако, дальнейшее кипячение реакционной смеси приводило к разрушению диполя до исходного *п*-хлорбензальдегида, ввиду длительного воздействия высокой температуры. Продукт реакции был очищен при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с использованием смеси бензола и этанола. Соединение **3** обладает сходной хроматографической подвижностью с *п*-хлорбензальдегидом, но, в отличие от альдегида, не растворяется в бензоле. Поэтому с постепенным испарением спирта из совместной фракции, продукт циклоприсоединения выпал из элюента в виде серого порошка.

Схема 1



Дополнительно структура полученного соединения **3** подтверждена на основании данных двумерной корреляционной ЯМР-спектроскопии (^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC). На основании спектра ^{1}H-^{13}C HSQC однозначно идентифицированы углероды, непосредственно связанные с протонами. На рисунке 1 представлен ряд ^{1}H-^{13}C HMBC кросс-пиков между протонами и углеродами (2.04/137.0; 2.16/123.8; 2.36/134.8; 2.77/50.7; 3.78/75.5; 5.40/75.0; 6.64/124.8; 7.37/127.9; 7.56/130.4). Наличие связи между атомом фосфора и H2 и H3 протонами в ^{1}H-^{31}P HMBC-спектре, а также характеристичные спин-спиновые взаимодействия между атомами фосфора и углерода позволяют установить структуру молекулы.



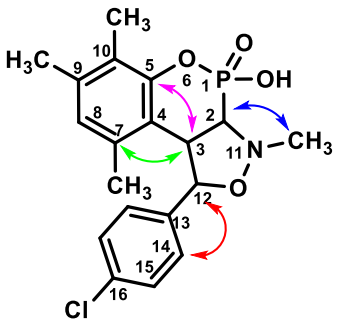


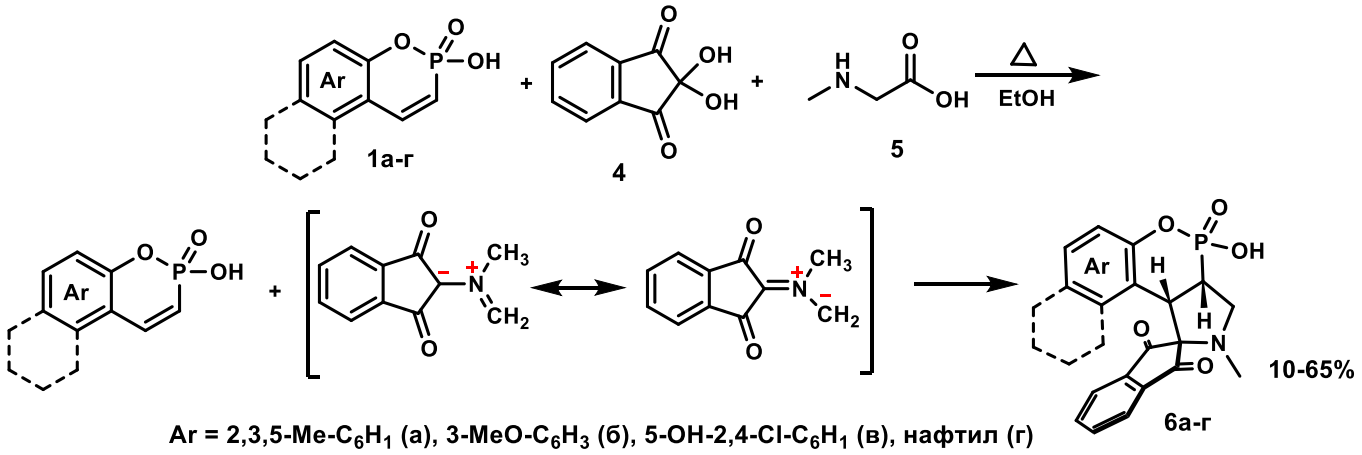
Рисунок 1 – ^{1}H-^{13}C HMBC-спектр соединения **3**

1.1.2 Реакции циклоприсоединения фосфининов с 1,3-диполем на основе нингидрина и саркозина

Как было отмечено выше, 1,3-диполь на основе нитрона обладает низкой реакционной способностью и приводит к небольшому выходу конечного полициклического соединения. На следующем этапе нашей работы мы ввели в реакцию с фосфинином в качестве 1,3-диполя азометинилид на основе нингидрина и саркозина, генерирующийся *in situ* и не требующий очистки, что позволило сократить время проведения эксперимента. Кроме того, замена диполя позволила использовать в качестве растворителя этанол, что привело к снижению температуры проведения реакции.

Фосфинины **1а-г** с различными заместителями в ароматическом кольце взаимодействовали с нингидрином и саркозином в кипящем этаноле 7-20 часов с образованием полициклических соединений **6а-г** (схема 2).

Схема 2



Ar = 2,3,5-Me-C_6H_1 (а), 3-MeO-C_6H_3 (б), 5-OH-2,4-Cl-C_6H_1 (в), нафтил (г)

Все полученные соединения очищены при помощи колоночной хроматографии с конечным выходом 10-65%. Важно подчеркнуть, что все соединения в ряду **6а-г** растворимы в воде, что делает их весьма перспективными для дальнейшего изучения их биологической активности.

Окончательно строение молекулы **6а** подтверждено методом РСА (рис. 2)

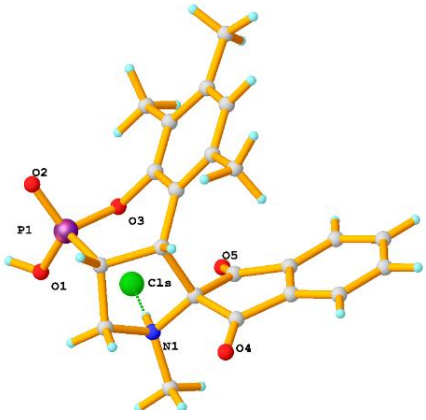


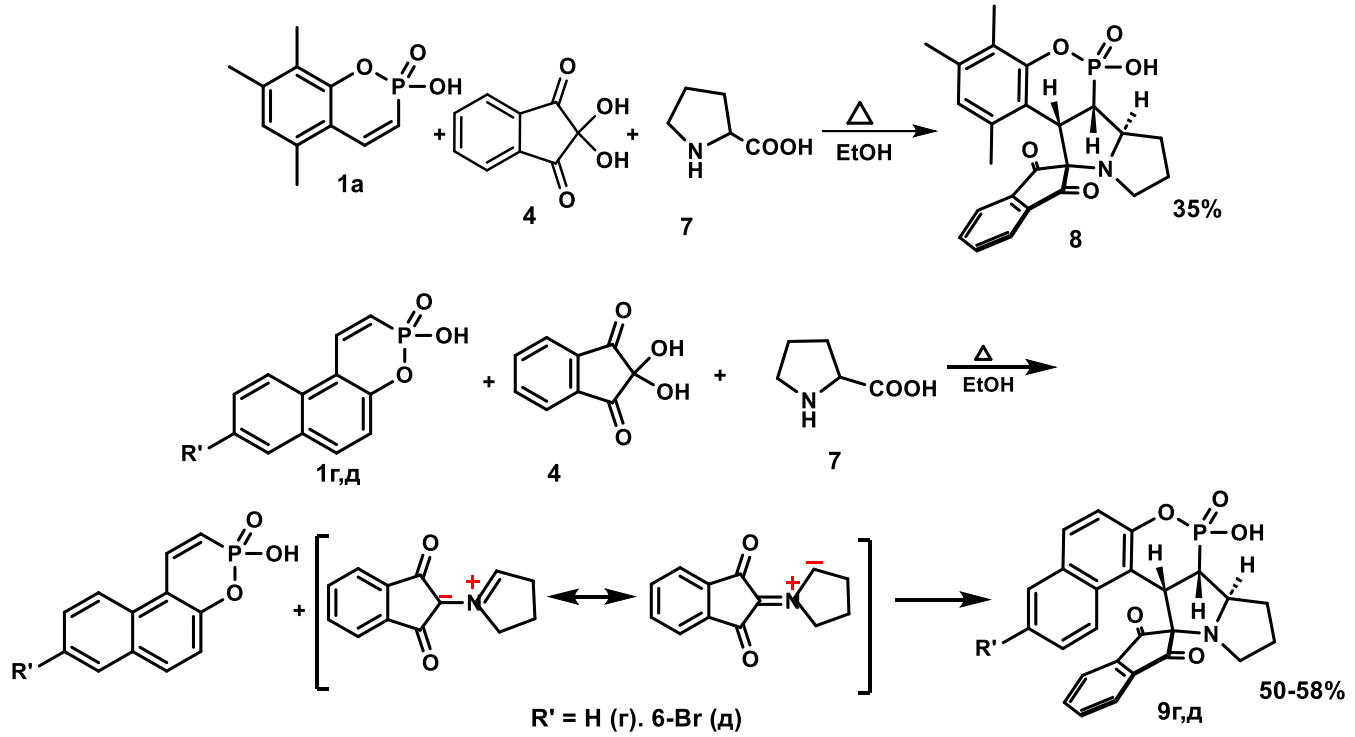
Рисунок 2– Геометрия молекулы **6а** в кристалле

1.1.3 Реакции циклоприсоединения фосфининов с нингидридом и L-пролином

Для расширения ряда новых полициклических соединений были исследованы реакции фосфининов **1а**, **1г** и **1д** с 1,3-диполем на основе нингидрина и L-пролина. С целью повышения выхода целевого соединения мы модифицировали его метод синтеза.

Экспериментальные условия были отработаны на фосфинине **1а.** К кипящему раствору фосфинина **1а** в этаноле порциями добавляли нингидрин и L-пролин. В результате этого время реакции сократилось с 7-20 часов до 45-60 минут (схема 3). С выходом 35% был выделен полициклический фосфонат **8**, который выпадает из реакционной смеси в индивидуальном виде и не требует дальнейшей очистки.

Схема 3



Оптимизированную методику мы применили к фосфининам **1г** и **1д**, содержащим аннелированный нафтильный фрагмент. В результате проведенной реакции были выделены с выходом 50-58% соединения **9г** и **9д**, которые, как и в ранее описанном случае, также выпадали из реакционной смеси в индивидуальном виде и не требовали очистки колоночной хроматографией.

Соединения **9г** и **9д** ввиду наличия сильного межмолекулярного взаимодействия между ароматическими кольцами имеют очень плохую растворимость в большинстве органических растворителей, что делает их крайне мало перспективными для изучения биологической активности.

Строение молекул **6в** и **9д** дополнительно подтверждено методом РСА.

Соединение **6в** кристаллизуется как координированная соль с гекса-аквакристаллом магния и сольватируется тремя молекулами воды (рис. 3). Соединение **9д** представляет собой кристаллический сольват с ацетонитрилом и двумя молекулами воды (рис. 3).

Структуры полициклических соединений **6в** и **9д** почти идентичны за исключением положения нингидринового фрагмента с двумя карбонилами. Это объясняется разностью в конформациях пятичленного цикла, в результате которой атом С3 выходит из плоскости бициклического фрагмента на 0.162 и 0.179 Å в соединениях **6в** и **9д** соответственно. Азотсодержащий пятичленный цикл находится в конформации конверта с отклонением атома азота (N1) от плоскости на 0.269Å в соединении **6в** и 0.241Å в соединении **9д.** Гекса-аквамагниевый катион в кристалле **6в** и молекулы воды связаны с основной субстанцией

при помощи классических O-H…O и N-H…O водородных связей, а молекула ацетонитрила с соединением **9д** - за счёт C-H…O взаимодействия.

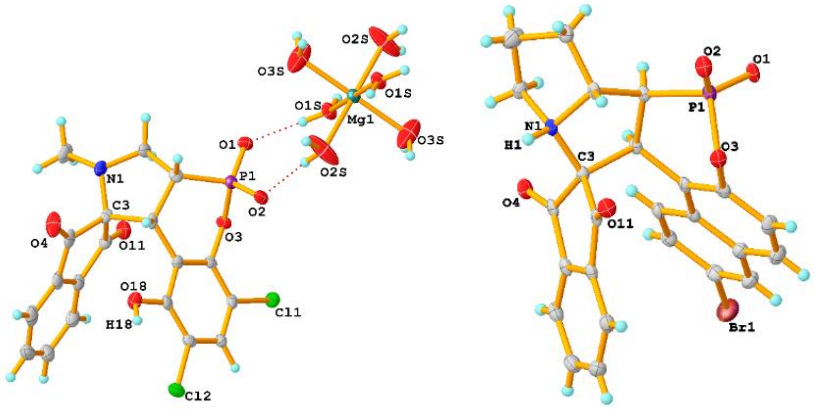


Рисунок 3 – Молекулярная структура соединений **6в** и **9д**

Молекулярная упаковка в кристаллах образована в основном за счёт классических водородных связей и представлена бесконечными слоям, параллельными к оси b0c. Трёхмерная система образована слабыми C-H…π и C-H…O взаимодействиями (рис. 4).

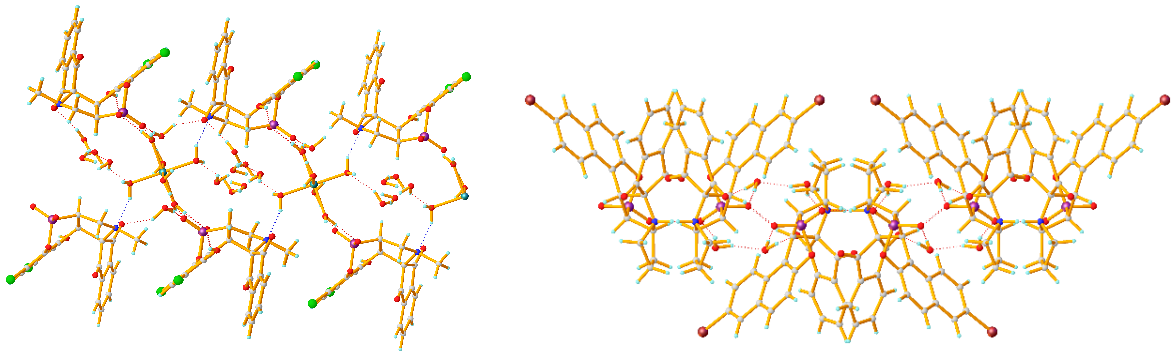


Рисунок 4 – Фрагменты упаковки молекул **6в** и **9д**

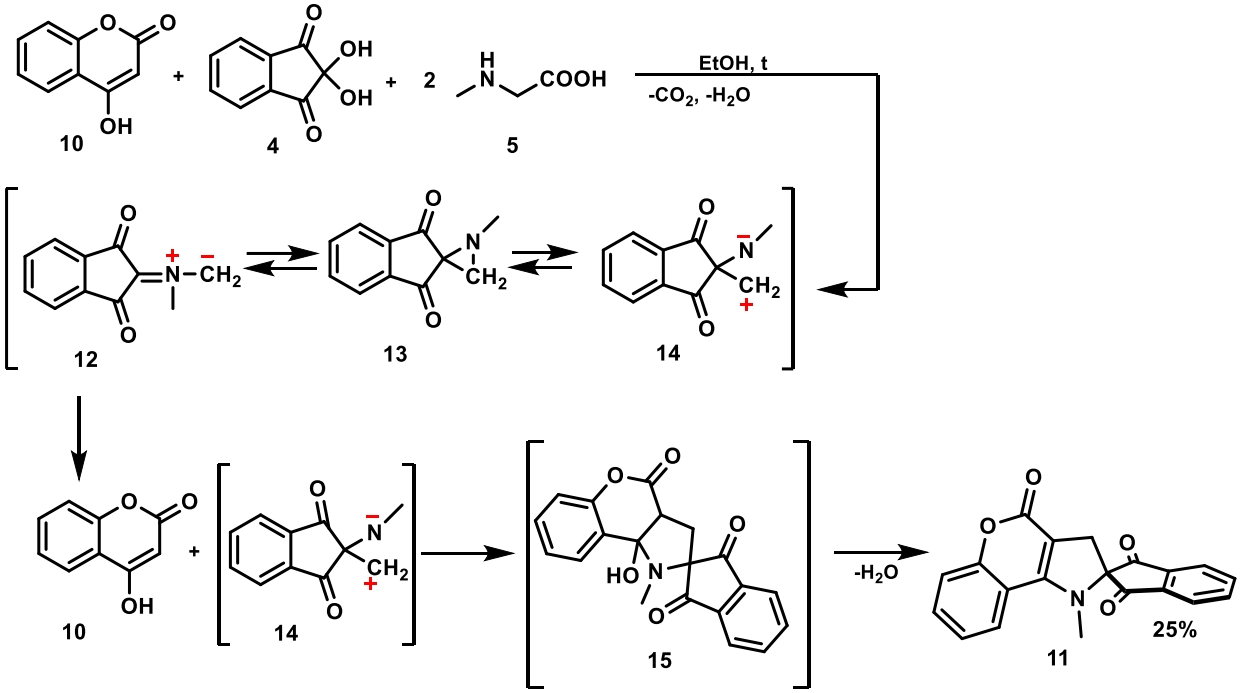
1.1.4 Реакция циклоприсоединения 4-гидроксикумарина с нингидрином и саркозином

Для исследования влияния атома фосфора в пироновом кольце диполярофила, была проведена реакция 4-гидроксикумарина **10** с 1,3-диполем на основе нингидрина и саркозина (схема 4). Синтез проходил в кипящем этаноле в течение 36 ч. После упаривания растворителя было получено масло, которое, в свою очередь, разделили на несколько фракций: растворимая в воде, в этаноле, в хлористом метилене и нерастворимый осадок. При помощи ИК-спектроскопии была выявлена фракция, в которой присутствовали характеристичные полосы карбонильных групп нингидринового фрагмента. Данную фракцию (в хлористом метилене) разделили колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смесей этилацетата, гексана, хлористого метилена и этанола в качестве элюента. В результате было получено в индивидуальном виде с выходом 25% соединение **11**.

Структура соединения **11** (рис. 5) отличается от строения полученных ранее полициклических соединений. Поскольку, 4-гидроксикумарин имеет реакционную

способность ниже относительно фосфининов **1а-д**, реакция идёт дольше. Из литературы известно, что нингидрин и саркозин способны к образованию азиридина **13** при длительном взаимодействии. Следовательно, в реакцию циклоприсоединения вступает 1,3-диполь **14** другого строения. На первом этапе, предположительно, образуется гидроксипирролидин **15**, дальнейшая дегидратация которого приводит к образованию пирролина **11**.

Схема 4



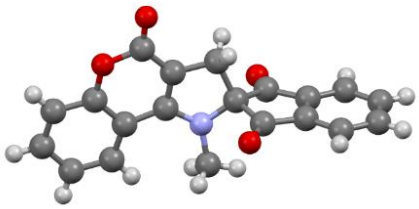


Рисунок 5 – Геометрия молекулы **11** в кристалле

1.1.5 Изучение реакции 1,3-диполярнорго циклоприсоединения методом квантово-химических расчётов

Для более детального изучения реакции фосфакумаринов с азометинилидами были проведены квантово-химические исследования методом теории функционала плотности (DFT). В качестве модельного соединения использовался незамещенный фосфинин (рис. 6).

Первая стадия реакции – образование азометинилида **AMY** из нингидрина и саркозина – на настоящий момент хорошо изучена, и поэтому не представляла интереса для квантово-химического моделирования.

На второй стадии происходит [3+2]-диполярное циклоприсоединение образовавшегося интермедиата **AMY** к соединению **C** с образованием двух возможных региоизомеров (рис. 6А). Если учесть, что каждый из них может существовать в виде двух диастереомеров, в результате циклоприсоединения возможно образование таким образом четырех конечных продуктов. Поэтому, для идентифицирования наиболее предпочтительного региоизомера исследуемой реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения, были проведены квантово-химические расчеты исходных реагентов

C и **AMY**, возможных продуктов **P**, а также соответствующих переходных состояний реакции **TS**. Учитывая участие в реакции заряженных частиц (азометинилид), расчеты проводились в рамках модели сольватации поляризуемого континуума CPCM, поскольку присутствие в реакции протонного растворителя (этанола) играет ключевую роль в стабилизации интермедиатов и продуктов [3+2]-циклоприсоединения (табл. 1).

Таблица 1 – Относительные энергии возможных продуктов модельной реакции для газовой фазы (B3LYP/6– 31+G*) и CPCM-модели (PW6B95D/def2- TZVPD)

	RR/SS-11		***SR/RS-12***		***RR/SS-21***		***SR/RS-22***	
	Газовая фаза	CPCM-модель	Газовая фаза	CPCM-модель	Газовая фаза	CPCM-модель	Газовая фаза	CPCM-модель
TS	18.76	12.19	80.27	85.00	11.71	5.71	63.95	56.83
P	-11.65	-21.52	-12.42	-21.95	-11.21	-21.51	-12.00	-22.02

По результатам полученных данных, исследуемая реакция является экзотермической (термические эффекты реакции - 21.5-22.0 ккал/моль для всех возможных путей реакции), при этом относительная энергия продукта **SR/RS-P22** оказалась наименьшей среди всех четырех возможных продуктов реакции (рис. 6 и табл. 2).

Таблица 2 – Относительные энергии (ΔE, ккал/моль), энтальпии (ΔH, ккал/моль), энергии Гиббса (ΔG, ккал/моль) и ВЗМО-НВМО интервалы (эВ) возможных региоизомеров продукта, полученные квантово-химическими расчётами (B3LYP/6–31+G*, Gaussian16)

Изомеры	**ΔE**	**ΔH**	**ΔG**	**ВЗМО-НВМО**
***RR/SS*-P11**	0.77	0.54	1.19	3.84
***SR/RS*-P12**	0.00	0.00	0.00	3.43
***RR/SS*-P21**	1.22	0.96	1.54	3.64
***SR/RS*-P22**	0.42	0.31	0.68	3.35

Это немного противоречило нашим ожиданиям, поскольку очевидно, что изомеры **RR/SS-P21** и **SR/RS-P22** будут наименее вероятными из-за стерических факторов, обусловленных влиянием молекулы нингидрина. Тем не менее, разница значений относительных энергий возможных изомеров продуктов реакции составляет всего лишь 0.1-0.5 ккал/моль. Таким образом, из результата квантово-химического расчета только продуктов реакции очевидно, что предпочтительное образование изомера **RR/SS-P21** невозможно объяснить его термодинамической стабильностью и необходимо было провести исследование механизма реакции.

Рассчитанные значения относительных энергий переходных состояний уже значительно отличаются для всех возможных путей реакции (рис. 6). Относительные энергии переходных состояний для SR/RS-диастереомеров оказались значительно выше, чем у противоположных им SS/RR-диастереомеров. Учитывая разницу между ними в 51-73 ккал/моль, можно определенно утверждать, что энергетический барьер для образования диастереомеров SR/RS является достаточно высоким. С другой стороны, барьер образования **SS/RR-P21** примерно на 7 ккал/моль ниже, чем у **SS/RR-P11**-диастереомера. Согласно уравнению Аррениуса, разница в энергии активации 1 ккал/моль приводит к более

чем шестикратной разнице в скоростях реакции при комнатной температуре. Таким образом, образование соединения **SS/RR-P21** гораздо предпочтительнее.

Полученные квантово-химические результаты полностью согласуются с экспериментальными данными. Высокая регио- и диастереоселективность реакции может быть обусловлена более быстрым образованием изомера **SS/RR-P21**, указывая на то, что этот изомер является продуктом кинетического контроля.

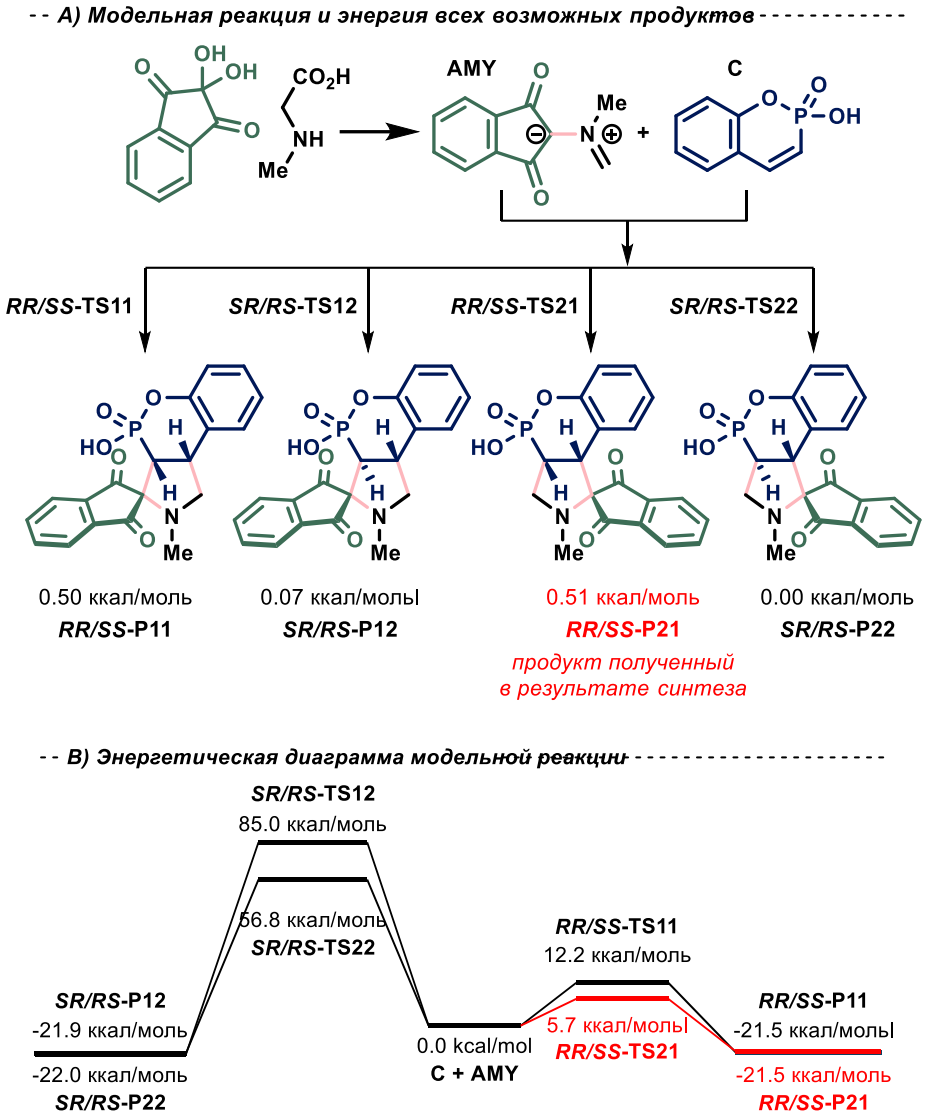


Рисунок 6 – (A) Модельная реакция [3+2]-циклоприсоединения фосфакумарина **C** к производным нингидрина азометинилиду **AMY** вместе с относительными энергиями возможных изомерных продуктов (ΔE, ккал/моль); (B) Энергетическая диаграмма (ΔE, ккал/моль), построенная по результатам квантово-химических расчетов методом DFT (PW6B95D/def2-TZVPD//B3LYP/6–31+G*, Gaussian16). Сумма полных энергий реагентов (**C + AMY**) принята за ноль.

1.2 Реакции 2-гидрокси-5,7,8-триметилбензо[e][1,2]оксафосфинин-2-оксида с C^4-замещенными производными резорцинов

Ранее в лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова была обнаружена новая, неизвестная ранее реакция фосфининов с различными фенолами, которая

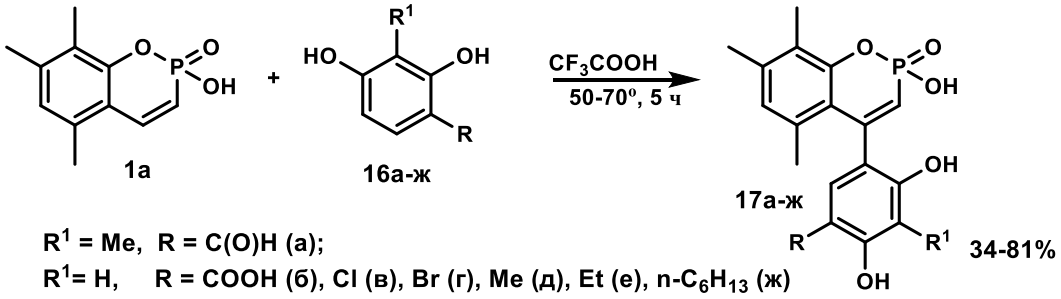
позволила в одну стадию получать с высокими выходами фосфанеофлавоноиды. Наличие фенольного фрагмента в этих структурах позволяет их модифицировать путём введения в ароматическое ядро фенола функциональных групп.

Представлялось интересным расширить ряд таких соединений и исследовать реакции фосфининов с фенолами, содержащими в своей структуре такие функциональные группы как альдегидная, кислотная, атомы галогенов (хлор, бром), а также алкильные радикалы (метил, этил, н-гексил).

Опираясь на предыдущие исследования, нами была модифицирована методика синтеза. Количество трифторуксусной кислоты было увеличено с каталитического/эквимолярного количества до использования кислоты в реакционной системе в качестве растворителя. Данное изменение позволило ввести в синтез фенолы с низкой реакционной способностью и получить ранее недоступные фосфанеофлавоноиды. Реакция проходила при нагревании до 50-70°С за 5 ч. Целевое соединение выпадает из реакционной массы в виде белого порошка.

На схеме 5 представлено взаимодействие фосфинина **1a** с 4-замещенным резорцином **16а-ж,** протекающее в 8 мл трифторуксусной кислоты при 50-70°С с образованием соединений **17а-ж** в индивидуальном виде с выходами 34-81%.

Схема 5

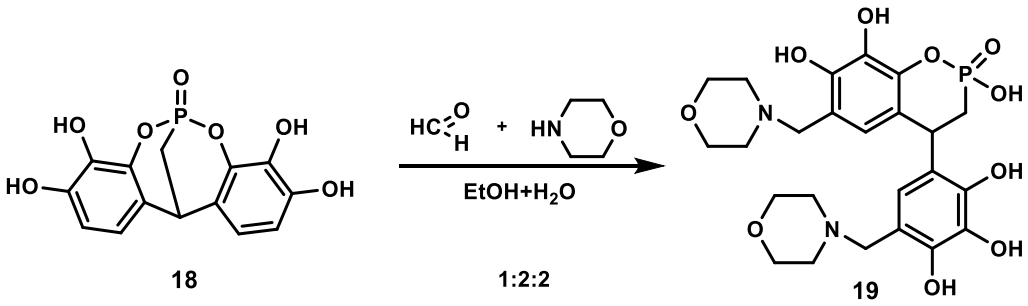


1.3 Фосфанеофлавоноиды в реакции Манниха

Присутствие в молекулах фосфанеофлавоноидов реакционноспособного фенольного фрагмента предполагает возможность их дальнейшей функционализации путем введения в ароматическое ядро фенола аминометильных групп с использованием реакции Манниха.

Ранее в лаборатории ЭОС им. А.Н. Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова было исследовано аминометилирование по реакции Манниха бициклического симметричного каркасного фосфоната (схема 6).

Схема 6



Стоит отметить, что реакция Манниха также используется для синтеза лекарственных препаратов, в том числе, противораковых. Поэтому полученное основание Манниха было

исследовано на цитотоксичность в отношении раковых и нормальных клеточных линий относительно препарата сравнения 5-фторурацила. В результате было установлено, что соединение **19** проявило высокую активность в отношении опухолевых линий и продемонстрировало умеренную цитотоксичность в отношении линии нормальных клеток печени. Стоит особенно отметить, что оно в 2.6 раза превосходит препарат сравнения 5-фторурацил в отношении линии клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека (HuTu 80). Индекс селективности (SI) равен 3.0 (в ~3 раза превосходит по селективности референтный препарат 5-фторурацил).

С учетом этих данных были изучены реакции синтезированных ранее фосфанеофлавоноидов с параформом и морфолином, что позволило получить целевые соединения **21**, **22б** и **22в** с умеренными выходами 44, 32 и 51% соответственно. В зависимости от строения исходного фосфанеофлавоноида продуктами реакции являются либо соединение **21** с двумя аминометильными группами, либо соединения **22б** и **22в** с одной аминометильной группой (схема 7).

Схема 7

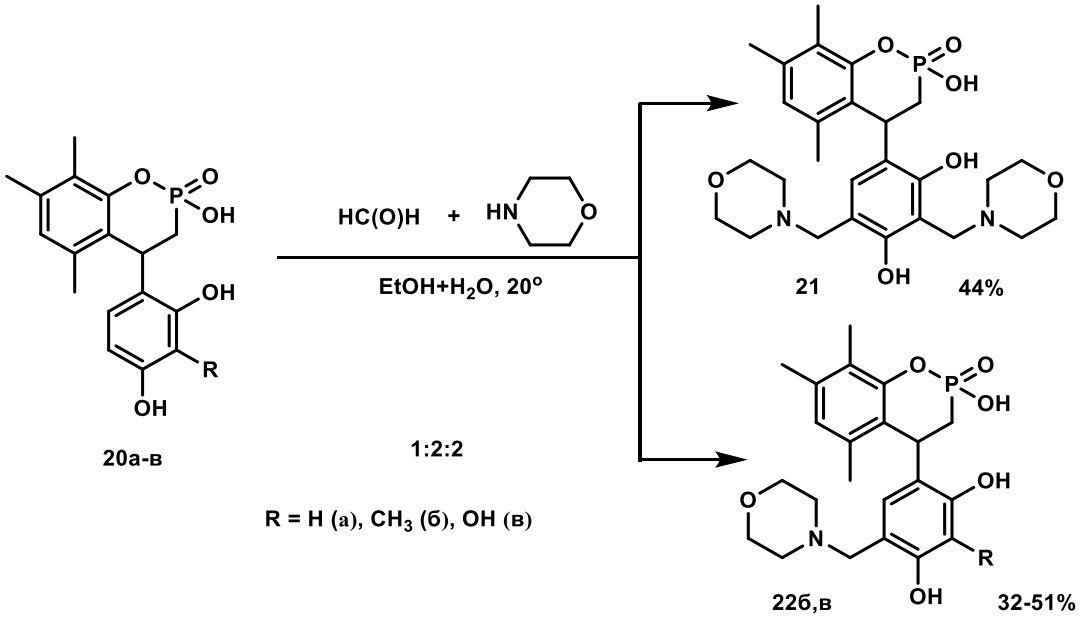
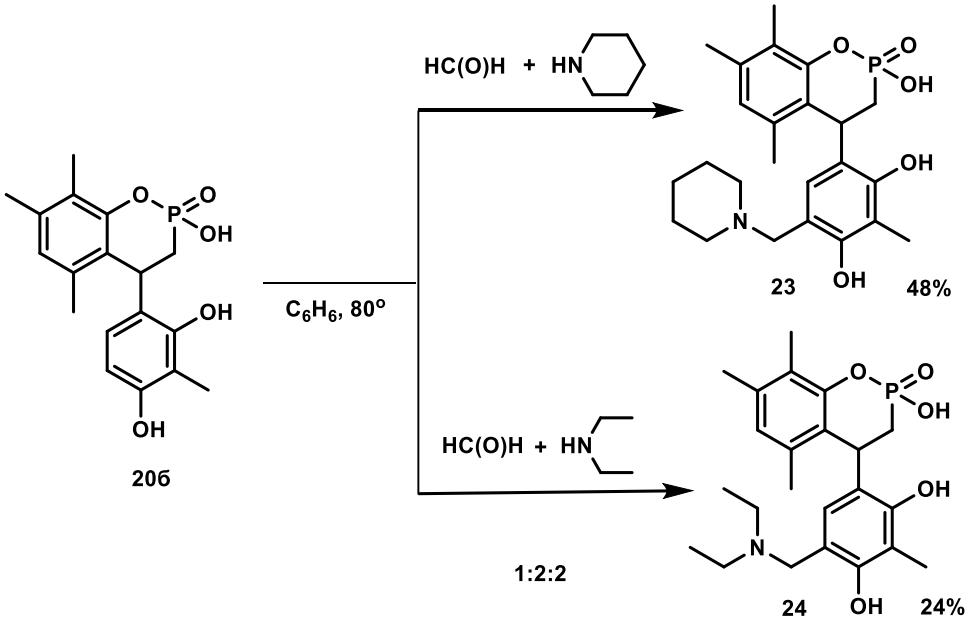


Схема 8



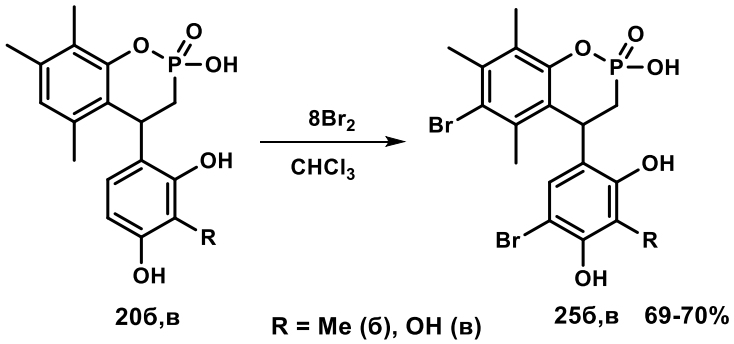
Реакции фосфанеофлавоноида **20б** с пиперидином или диэтиламином в присутствии параформа осуществляли в других экспериментальных условиях (кипящий бензол, насадка Дина-Старка, 16 ч до прекращения выделения воды), что позволило получить новые аминоалкилированные производные **23** и **24** с выходами 48 и 24% соответственно (схема 8). Следует отметить, что полученные соединения **22в**, **23**, **24** имеют плохую растворимость в растворителях, используемых при проведении цитотоксических исследований, поэтому в дальнейшем мы не проводили их тестирование. Данные по изучению противоопухолевой активности соединений **21** и **22б** приведены в разделе 1.7.

1.4 Реакции бромирования фосфанеофлавоноидов

Реакция бромирования является фундаментальным процессом в современной синтетической химии и одной из важнейших реакций функционализации С-Н связи в ароматическом кольце. Бромированные ароматические соединения являются удобными прекурсорами для получения органометаллических соединений, а также играют важную роль в реакциях кросс-сочетания, среди которых наиболее востребована реакция Сузуки.

Доступность ключевых бромзамещенных ароматических соединений определяет молекулярную структуру конечного продукта в реакции Сузуки. Поэтому мы исследовали реакции бромирования фосфанеофлавоноидов **20б** и **20в** избытком молекулярного брома в хлороформе при комнатной температуре (схема 9). В результате с выходом 69-70% были получены новые бромсодержащие фосфанеофлавоноиды **25б** и **25в**.

Схема 9

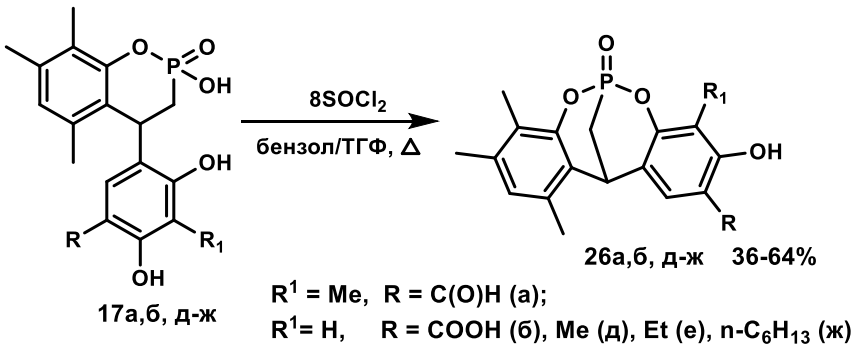


1.5 Циклизация фосфанеофлавоноидов

Одним из важнейших свойств фосфанеофлавоноидов является их способность к внутримолекулярной циклизации. В качестве экспериментальных условий мы взяли описанные ранее методики: реакция протекает в присутствии восьмикратного избытка тионилхлорида в кипящем бензоле или ТГФ.

На основе фосфанеофлавоноидов **17а-ж** в кипящем бензоле за 10-35 ч получены каркасные фосфонаты **26а-ж** в индивидуальном виде с умеренным выходом 36-40%. (схема 10). Фосфонаты **26а, б, д-ж,** содержащие в терминальном положении активные группы (альдегидная, кислотная, алифатический радикал), обладают большим потенциалом для дальнейшего получения на их основе пинцерных и макроциклических структур (например, лигандов для металлокомплексного катализа).

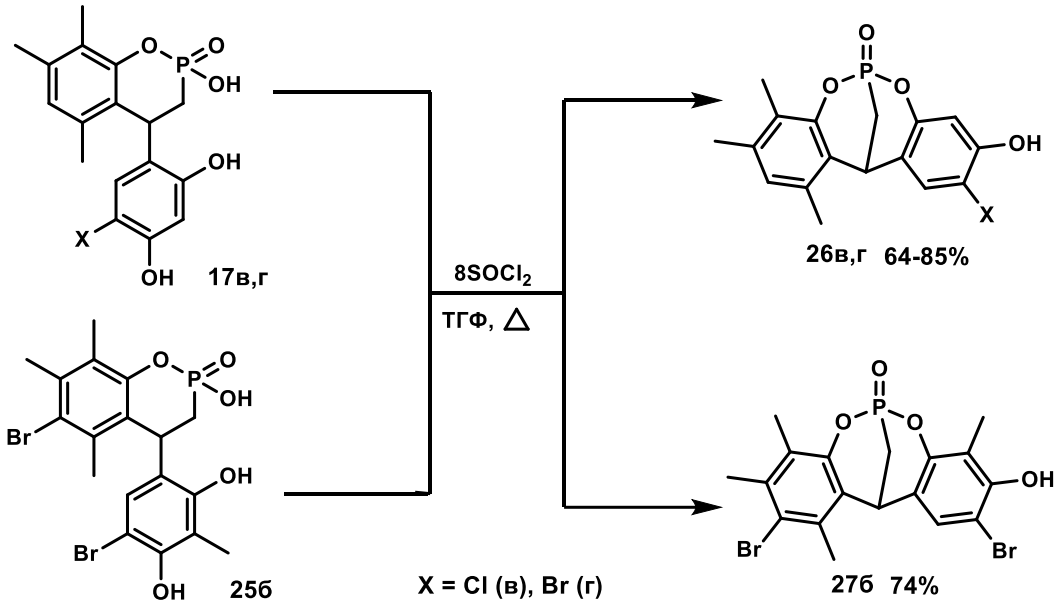
Схема 10



1.6 Получение функциональнозамещённых каркасных фосфонатов

Галогенированные каркасные фосфонаты, в свою очередь, тоже представляют особый интерес ввиду перспективности их использования в реакциях кросс-сочетания Сузуки. Внутримолекулярной циклизацией в кипящем ТГФ в присутствии восьмикратного избытка тионилхлорида получены моно- (**26в, 26г**) и дигалогензамещенные (**27б**) каркасные фосфонаты на основе фосфанеофлавоноидов **17в, 17г** и **25б** с выходами 64-85% (схема 11).

Схема 11

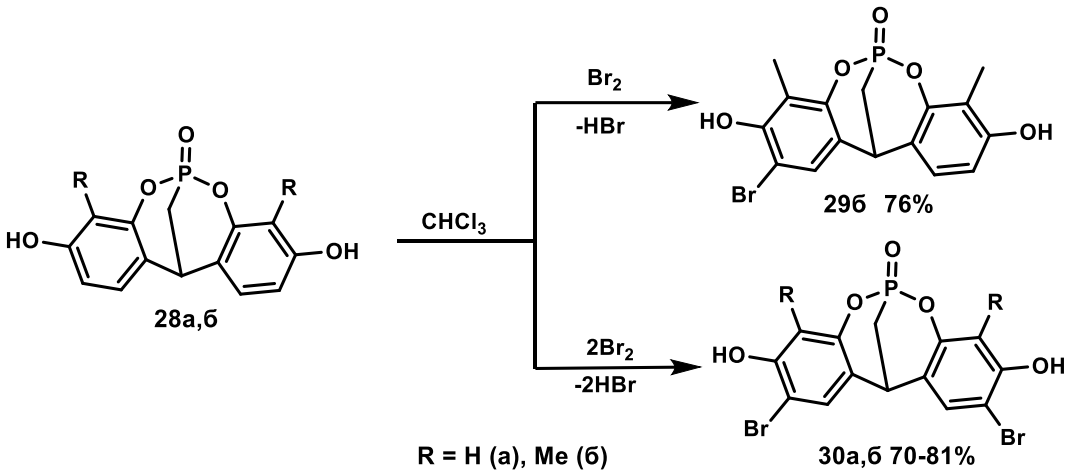


Представлялось интересным исследовать возможность прямой функционализации каркасных структур. Поэтому мы провели реакции бромирования известных каркасных фосфонатов под действием молекулярного брома в хлороформе. В зависимости от соотношения исходных реагентов были получены моно- (**29б**) и дибромзамещенные (**30а** и **30б**) каркасные фосфонаты, которые могут служить удобными платформами для создания на их основе макроциклических соединений. Протекание реакции контролировали методами ЯМР ^{1}H, масс-спектрометрии (MALDI-TOF) реакционной массы (осадка и раствора).

Введение в реакцию с каркасными фосфонатами **28а**, **28б** молекулярного брома в соотношении 1:1 приводит к образованию продуктов монобромирования. В индивидуальном виде нам удалось выделить только монобромзамещенный каркасный фосфонат **29б** на основе 2-метилрезорцина. Исчерпывающее бромирование каркасных

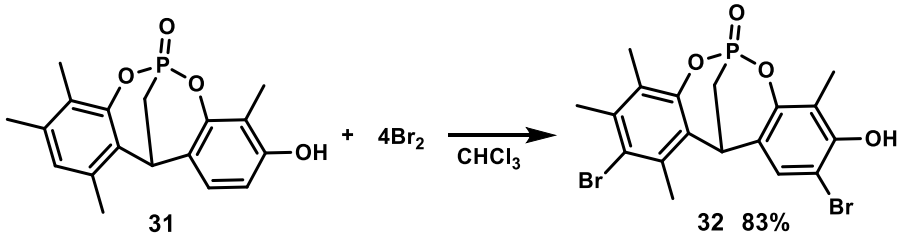
фосфонатов **28а** и **28б** при соотношении реагентов 4:1 позволяет ввести в молекулу два атома брома и получить соединения с высокими выходами (70 и 81% соответственно.) (схема 12)

Схема 12



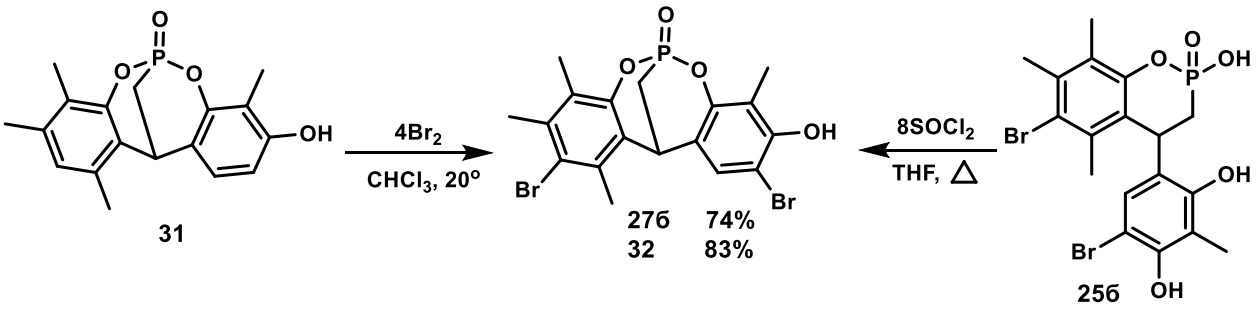
Реакция несимметричного каркасного фосфоната **31** с молекулярным бромом протекает при соотношении реагентов 1:4 в среде хлороформа и приводит к образованию соединения **32** с выходом 83% (схема 13).

Схема 13



Спектральные характеристики данного фосфоната **32** (химические сдвиги ядер атомов фосфора, углерода и протона, величина констант спин-спинового взаимодействия, характеристические полосы в ИК-спектре, пики ионов в масс-спектре ESI) полностью совпадают со значениями для соединения **27б**. Следовательно, дибромзамещенный каркасный фосфонат асимметричного строения можно получить двумя способами: внутримолекулярной циклизацией бромированного фосфанеофлавоноида **25б** и прямым бромированием фосфоната **31** (схема 14).

Схема 14



1.7 Изучение цитотоксичности полученных соединений

Полициклические соединения **6а-г**, **8** и **11** и основания Манниха **21** и **22б** были изучены на биологическую активность на культуре живых клеток (*in vitro*). Исследования

проведены сотрудниками лаборатории микробиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

Цитотоксичность по отношению к нормальным и раковым клеткам человека была исследована в концентрациях 1-100 ммоль. Соединения **9г**, **9д**, **22в**, **23** и **24** были исключены из-за их очень плохой растворимости в воде. В таблице 3 можно увидеть, что все исследуемые соединения показывают низкую цитотоксичность по отношению к линиям MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека). В тоже время, активность по отношению к опухолевым линиям M-HeLa (карцинома шейки матки человека) на уровне препарата сравнения (5-фторурацил). Также цитотоксичность по отношению к линиям HuTu 80 (аденокарцинома двенадцатиперстной кишки человека) немного ниже или на уровне 5-фторурацила. Стоит отметить, что соединения **6а**, **21** и **22б** нетоксичны к здоровым клеткам (линии клеток печени человека).

Таблица 3 – Цитотоксичность полученных соединений

Исследуемое соединение	Линии раковых клеток						Линии нормальных клеток
	[a]M-HeLa		[b]MCF-7		[c]HuTu 80		[d]Chang liver
	IC_{50} μM	SI	IC_{50} μM	SI	IC_{50} μM	SI	IC_{50} μM
6а	52.6±4.1	>15	82.3±7.5	>10	25.1±1.9	>32	>800
6б	59.7±4.6	1	>100	-	53.4±4.2	1.2	62.0±5.5
6в	>100	-	77.6±6.2	-	100±8.4	-	>100
6г	60±5.4	-	92.2±8.3	-	82.6±7.6	-	57.0±4.3
8	>100	-	>100	-	>100	-	>100
11	>100	-	74.8±5.8	-	48.7±3.8	>2	>100
21	100±8.2	1.8	>100	-	>100	-	177±14
22б	96.7±7.6	>2	>100	-	88.2±7.1	>2	>200
5-фторурацил	62.0±4.7	1.4	16.7±1.3	5	65.2±5.6	1.3	86.3±6.5

[a]M-HeLa - эпителиоидная карцинома шейки матки; [b]MCF-7 - аденокарцинома молочной железы человека; [c]HuTu 80 - аденокарцинома двенадцатиперстной кишки человека; [d]Chang liver - клетки печени человека. Результаты представлены, как средние значения ±SD; Эксперименты повторяли три раза; - невозможно рассчитать SI

Среди всех исследуемых соединений было выявлено соединение-лидер **6а**. Его цитотоксичность против HuTu 80 примерно в 2.6 раз превышает препарат сравнения, а по отношению к здоровым клеткам – более чем в 10 раз ниже. Индекс селективности (SI) выше 32. Для линий M-HeLa активность соединения **6а** немного выше 5-фторурацила (52.6±4.1 против 62.0±4.7 соответственно), с индексом селективности более 15. А по отношению к MCF-7 цитотоксичность ниже препарата сравнения при достаточно высоком значении индекса селективности 10.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. Впервые найдено, что 2*H*-1,2-бензоксафосфинины вступают в реакцию [3+2] циклоприсоединения с участием различных 1,3-диполей (нитрона, азометинилидов), с образованием новых азот-, фосфорсодержащих полициклических структур со спиросочленением. Показана высокая стереоселективность реакции.
2. Впервые была изучена реакция [3+2] циклоприсоединения фосфакумаринов с азометинилидами с использованием квантово-химических расчетов методом теории функционала плотности (DFT). Было показано, что регио- и диастереоселективность реакции обусловлена более быстрым образованием одного из изомеров, являющегося продуктом кинетического контроля.
3. Предложен оригинальный метод синтеза новых функционализированных фосфанеофлавоноидов, содержащих в своей структуре атомы галогенов, кислотную, карбонильную группу, алифатические радикалы, базирующийся на использовании трифторуксусной кислоты в качестве растворителя в реакциях 2*H*-1,2-бензоксафосфининов с различными фенолами.
4. Впервые на основе фосфанеофлавоноидов в результате реакции Манниха получены новые аминометилированные производные. Показано, что в зависимости от природы вторичного амина и фосфанеофлавоноида образуются продукты, содержащие в структуре одну или две аминометильные группы.
5. Впервые осуществлено бромирование фосфанеофлавоноидов элементным бромом и показано, что в результате реакции образуются новые дибромсодержащие производные фосфанеофлавоноидов.
6. Получены новые каркасные фосфонаты несимметричного типа, содержащие терминальные функциональные группы: атомы галогенов, кислотную, карбонильную группу, алифатические радикалы, в результате внутримолекулярной гетероциклизации соответствующих функционально замещенных фосфанеофлавоноидов.
7. Установлено, что некоторые из синтезированных фосфорсодержащих полициклических соединений проявляют высокую противоопухолевую активность в отношении ряда клеточных линий (MCF-7, HuTu 80, M-HeLa). Среди всех исследуемых соединений было выявлено соединение-лидер 6a. Его цитотоксичность против HuTu 80 примерно в 2.6 раз превышает препарат сравнения (25.1±1.9 против 65.2±5.6 мкМ соответственно), а по отношению к здоровым клеткам – более чем в 10 раз ниже, индекс селективности SI > 32. Для линий M-HeLa активность соединения 6a немного выше 5-фторурацила (52.6±4.1 против 62.0±4.7 мкМ соответственно), с индексом селективности более SI > 15, а по отношению к MCF-7 цитотоксичность ниже препарата сравнения при достаточно высоком значении индекса селективности (SI > 10).

Дальнейшее развитие научного направления, представленного в настоящей диссертационной работе, позволит получить новые фосфорсодержащие полициклические и каркасные структуры, имеющие перспективу использования при создании новых эффективных, малотоксичных лекарственных противоопухолевых препаратов. Другим важным направлением развития данной работы является возможность использования функционализированных каркасных фосфонатов несимметричного типа в качестве

органокатализаторов, лигандов металлокомплексов для проведения стереоселективного органического синтеза.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций:

1. Садыкова, Ю.М. Новые бромзамещенные симметричные и несимметричные каркасные фосфонаты / Ю. М. Садыкова, В. В. Сенникова, А. В. Залалтдинова, А. Р. Бурилов, М. А. Пудовик // Журнал общей химии. – 2022. – Т. 92, № 7. – С. 1081-1084.
2. Sennikova, V.V. Diastereoselective Synthesis of Novel Spiro-Phosphacoumarins and Evaluation of Their Anti-Cancer Activity / V.V. Sennikova, A.V. Zalaltdinova, Y.M. Sadykova, A.R. Khamatgalimov, A.S. Gazizov, A.D. Voloshina, A.P. Lyubina, S.K. Amerhanova, J.K. Voronina, E.A. Chugunova, N.O. Appazov, A.R. Burilov, M.A. Pudovik // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – Article 14348.

Тезисы докладов:

1. Залалтдинова, А.В. Синтез фосфорсодержащих каркасных соединений – платформ с разнообразными синтетическими свойствами / А.В. Залалтдинова, Ю.М. Садыкова, А.К. Смаилов, Л.М. Трофимова, В.В. Сенникова, А.Р. Бурилов, М.А. Пудовик // Современные проблемы химии, технологии и фармации: сб. материалов. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2020. – С. 70-73.
2. Сенникова, В.В. Реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения в ряду оксафосфоринов – путь к созданию новых полициклических структур / В.В. Сенникова, Ю. М. Садыкова, Ю. К. Воронина, А.Р. Бурилов // V Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (KOST-2021): сборник тезисов. – Сочи, 2021. – С. 276.
3. Сенникова, В.В. Синтез новых биологически активных полициклических соединений на основе фосфоринов / В.В. Сенникова, Ю. М. Садыкова, Ю. К. Воронина, А.Р. Бурилов // XXV Всероссийская конференция молодых ученых-химиков: сборник тезисов. – Нижний Новгород, 2022. – С. 141.
4. Сенникова, В.В. Синтез полициклических производных оксафосфоринов, проявляющих биологическую активность / В.В. Сенникова, Ю. М. Садыкова, Ю. К. Воронина // XXIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2022»: сборник тезисов. – Москва, 2022. – С. 589.
5. Sennikova, V.V. Synthesis of novel polycyclic compounds based on phosphorinines and their antitumor activity/ V.V. Sennikova, Yu. M. Sadykova, J. K. Voronina, A. R. Burilov // Международная конференция «The 6th International Conference “Advances in Synthesis and Complexing»: сборник материалов. – Москва, 2022. – С. 117.