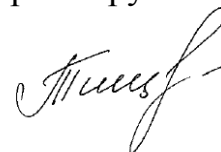


На правах рукописи



Тищенко Ксения Игоревна

**НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
2-ТИОКСО-ТЕТРАГИДРО-4*H*-ИМИДАЗОЛ-4-ОНОВ
И ИХ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКСЫ**

(02.00.03 – органическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный
руководитель: доктор химических наук
Белоглазкина Елена Кимовна

Официальные
оппоненты: доктор химических наук, профессор
Томилов Юрий Васильевич
заведующий лабораторией химии diaзосоединений
отдела химии нестабильных молекул и малых
циклов ФГБУН Институт органической химии им.
Н.Д.Зелинского РАН

доктор химических наук, профессор
Коротеев Михаил Петрович
профессор кафедры органической химии Института
биологии и химии ФГБОУ ВО «Московский
педагогический государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный технический
университет»

Защита состоится « 14 » апреля 2017 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.97 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, и на сайте Химического факультета: <http://www.chem.msu.ru>

Автореферат диссертации размещен на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: <http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан « 14 » февраля 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 501.001.97
кандидат химических наук



Синикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Известно, что производные 2-тиогидантоинов обладают различными видами фармакологической активности. Данные соединения проявляют антимикробную, противораковую, противосудорожную, противовирусную активность, обладают антипролиферативным эффектом, а также могут использоваться для лечения вируса иммунодефицита, против заболеваний щитовидной железы, туберкулеза. Актуальной задачей современной синтетической органической химии является разработка низкотоксичных и высокоэффективных агентов, способных подавлять развитие злокачественных опухолей, в том числе – металлсодержащих комплексов органических лигандов.

Осуществление синтетических процессов органической химии с эффективностью и селективностью, близким к реакциям, протекающим в живых системах, является важной задачей. Известно, что окислительно-восстановительные реакции в организмах катализируются металлоферментами, имеющими в своем составе атомы переходных металлов (медь, кобальт, железо и т.п.). Ион меди в таких металлоферментах обычно координирован донорными атомами азота и серы аминокислотных белковых фрагментов, поэтому синтез низкомолекулярных медьсодержащих координационных соединений с N,S-содержащими лигандами, моделирующими окружение металла в природных биокатализаторах, представляет актуальную задачу. Производные 2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (2-тиогидантоина) с заместителями различной природы, имеющие в составе экзоциклический атом серы и эндоциклические имидазольные атомы азота, являются перспективными лигандами для моделирования ферментативных систем.

Широко используемый в медицинской практике препарат цисплатин, являясь высокоэффективным агентом, также обладает рядом побочных эффектов и крайне токсичен. Поэтому в последние годы ведется интенсивная разработка новых органических структур и их координационных соединений с переходными металлами. Идея создания подобных соединений заключается в поиске альтернативных молекул, наряду с цисплатином обладающих высоким сродством к злокачественным образованиям, но имеющих более эффективные показатели в отношении заявленной пользы к возможному риску. Введение эндогенного металла (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) в органическую молекулу позволяет снизить токсичность, повысить селективность и, соответственно, биодоступность координационного соединения. Был протестирован ряд координационных соединений различных переходных металлов с разнообразными органическими

лигандами, в результате чего было выяснено, что наиболее перспективными аналогами цисплатина являются комплексы меди(II).

Ранее сотрудниками нашей научной группы была синтезирована серия органических лигандов – производных 2-тиогидантоина и их координационных соединений с Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , также проведены исследования биологической активности полученных лигандов и комплексов. Было показано, что при введении в положение 5 тиогидантоинового цикла заместителей, содержащих различные донорные атомы, значительно расширяются возможности синтеза координационных соединений. Исходя из геометрического строения 5-арилметилден-2-тиогидантоинов, а также электронных эффектов имеющихся в них заместителей, было предположено, что соединения данного класса, а также комплексы металлов на их основе, могут моделировать G-квадруплексы – особые структуры на концах теломер в молекуле ДНК, блокирующие активность теломеразы - фермента, избыточная активность которого создает благоприятные условия для перерождения нормальных клеток в раковые. В ходе предыдущих исследований найдено соединение-лидер — смешанновалентный хелатный комплекс меди на основе 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-она, блокирующий действие теломеразы и, следовательно, являющийся перспективным для дальнейшего изучения его терапевтической активности. Кроме того, показано, что биядерные координационные соединения меди с 5-пиридилметилден-2-тиогидантоинами способны эффективно катализировать реакции окисления органических соединений под действием кислорода воздуха и закиси азота. Перспективным представлялось получить новые структурно-подобные лиганды и координационные соединения меди, установить взаимосвязь структура–активность, изучить устойчивость получаемых соединений в условиях, моделирующих терапевтические, а также оценить возможность их применения как катализаторов окислительно-восстановительных реакций.

Для решения этой задачи было необходимо проведение многопланового исследования, включающего разработку методов синтеза исходных органических лигандов, получение их координационных соединений и изучение физико-химических и биологических свойств синтезированных молекул, позволяющее оценить возможность их дальнейшего изучения в качестве катализаторов окислительно-восстановительных реакций и противораковых препаратов.

Цель работы – установить характер наличия и положения линкерного фрагмента в 2-тиогидантоинах и 2-алкилтиоимидазолоновых лигандах на состав и структуру

образующихся координационных соединений в реакциях с хлоридом меди(II), а также физико-химические свойства и цитотоксичность этих комплексов металлов.

Задачи работы. (1) Разработка синтетических подходов к получению новых классов производных моно- и бис-5-(2-пиридилметил)-замещенных 2-тиогидантоинов; (2) Получение координационных соединений меди с лигандами – производными 2-алкилтиоимидазололин-4-онов и 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов; (3) Оценка устойчивости полученных координационных соединений, определение констант устойчивости комплексов; (4) Оценка цитотоксичности и возможности каталитического использования полученных комплексов меди.

Научная новизна.

- Предложены новые и оптимизированы ранее описанные методы синтеза производных моно- и бис-5-(2-пиридилметил)-замещенных 2-тиогидантоинов.
- Впервые получена серия бис-(5-(2-пиридилметил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов) с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми и диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между имидазолоновыми фрагментами.
- Впервые исследована стабильность координационных соединений меди с 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонами в водно-органической среде; измерены константы устойчивости комплексов меди 3-х различных структурных типов.
- Изучены каталитические свойства биядерных координационных соединений меди - производных 5-(2-пиридилметил)-замещенного 2-тиогидантоина, являющихся низкомолекулярными моделями медьсодержащих ферментов типа Cu₂.

Теоретическая и практическая значимость.

- Разработаны методы синтеза нового класса органических лигандов - производных 5-(2-пиридилметил)-замещенных 2-тиогидантоинов, соединенных линкерами различной природы между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов.
- Изучено комплексообразование полученных лигандов с хлоридом меди(II) с получением биядерных координационных соединений.
- Изучена цитотоксическая активность полученных координационных соединений меди с бис-(5-(2-пиридилметил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онами).

- Впервые определены константы устойчивости координационных соединений меди с органическими лигандами – производными 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов.
- Исследована каталитическая активность биядерных комплексов меди с лигандами на основе 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолона. Показано, что полученные комплексы представляют собой низкомолекулярные модели фермента N₂O-редуктазы.
- Изучена адсорбция органических производных 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов и их координационных соединений меди с этими производными на поверхности золота.

Положения, выносимые на защиту.

- Оптимизированные методы синтеза производных 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов, 2-алкилтиоимидазолонов и их моно- и биядерных координационных соединений меди с этими производными.
- Разработка методов получения производных бис-5-(2-пиридилметил)-замещенных 2-тиогидантоинов с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми и диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов и их координационных соединений с меди(II) с ними.
- Определение констант устойчивости координационных соединений меди с полученными лигандами различных структурных типов и оценка их цитотоксичности.

Достоверность полученных результатов: все полученные соединения проанализированы с применением современных физико-химических методов установления структуры (спектроскопия ЯМР ¹H и ИК, электронная спектроскопия в УФ и видимой области, данные рентгеноструктурного анализа), состав ранее не описанных соединений подтвержден данными элементного анализа.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2010" (Москва, 2010), III Международной конференции "Химия гетероциклических соединений", посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Николаевича Коста, (Москва, 2010), Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Суздаль, 2011), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной

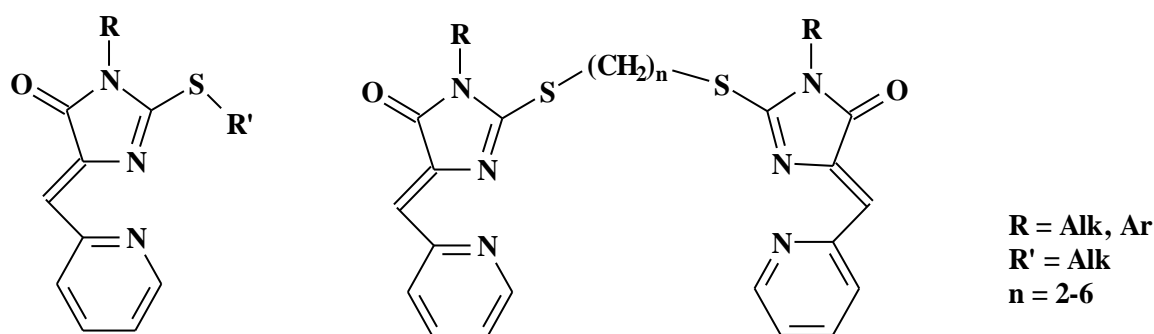
международному году химии «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, 2011), I Всероссийской молодёжной школе-конференции «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, 2016).

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, отвечающих требованиям Высшей аттестационной комиссии, и 5 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

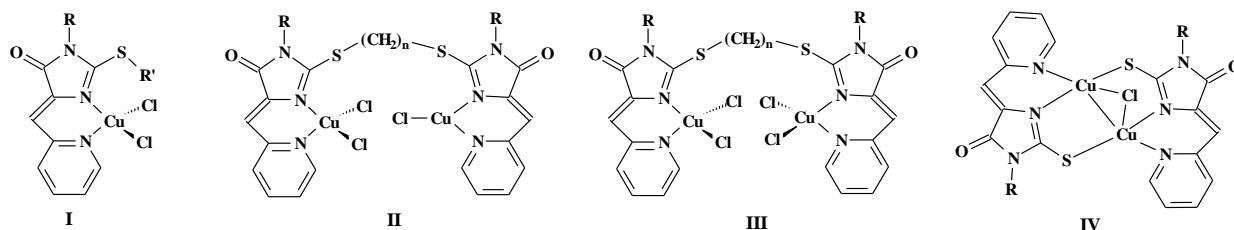
Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, посвященного медьсодержащим ферментам и их известным низкомолекулярным моделям, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 128 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц, 66 рисунков. Библиография насчитывает 192 ссылки.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Предпосылками к этой работе, определившими выбор ее объектов, послужили результаты исследований, проводимых ранее в нашей научной группе и направленных на изучение возможностей синтеза 5-пиридилметилден-моно- и бис-имидазол-4-онов показанных ниже структурных типов



и координационных соединений меди с ними, типы I-IV:



Некоторые из последних показали каталитическую активность в реакциях окисления, а также высокую цитотоксичность по отношению к раковым клеткам. Однако к началу этой работы не проводились исследования устойчивости получаемых координационных соединений, оставалась нерешенной проблема низкой растворимости лигандов и комплексов в водных средах, и не были известны бис-5-пиридилметилден-имидазолоновые лиганды, в которых имидазольные циклы соединялись бы линкерами не через атомы серы.

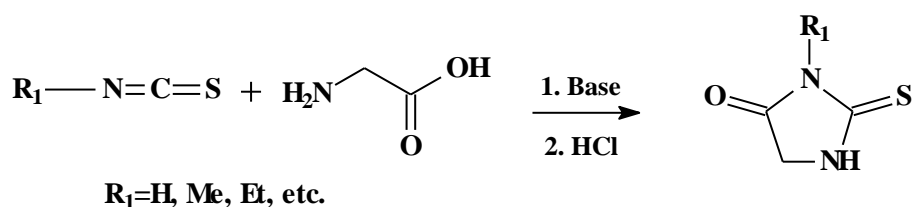
В рамках этой работы были синтезированы новые органические лиганды с гидрофильными и гидрофобными заместителями при атомах азота или серы, в том числе лиганды, в которых два хелатирующих 5-(2-пиридилметил)-2-алкилтиоимидазолоновых фрагмента соединены линкерными фрагментами через атомы N(3), и их медьсодержащие координационные соединения.

1. Синтез органических лигандов

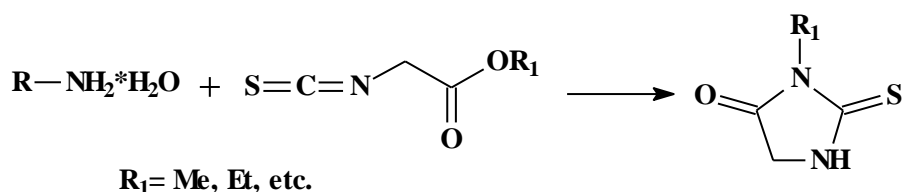
1.1. Синтез производных 2-тиогидантоина, незамещенных в 5-м положении

Для получения 5-незамещенных 2-тиогидантоинов в работе использованы два различных препаративно удобных подхода.

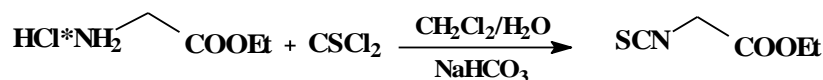
Первый подход представляет собой реакцию арил- или алкилизотиоцианата и аминокислоты. В присутствии основания в реакции образуется замещенная тиомочевина, которая при дальнейшей обработке раствором соляной кислоты образует замещенный 2-тиогидантоин:



Второй подход - это взаимодействие изотиоцианата, получаемого из аминокислоты, с амином. Данный метод является наиболее простым и препаративно значимым, так как позволяет выбирать широкий круг аминов для получения разнообразных производных 2-тиогидантоинов:

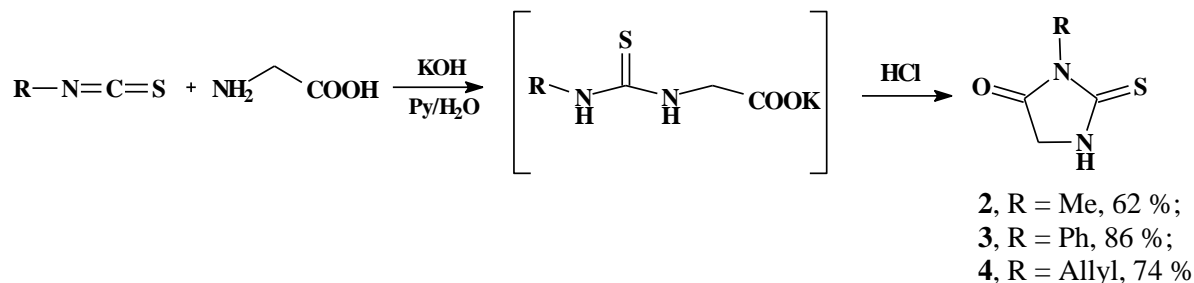


В качестве исходного соединения для синтеза по этому методу получен изотиоцианатэтилацетат **1** по реакции гидрохлорида этилового эфира глицина с тиофосгеном:

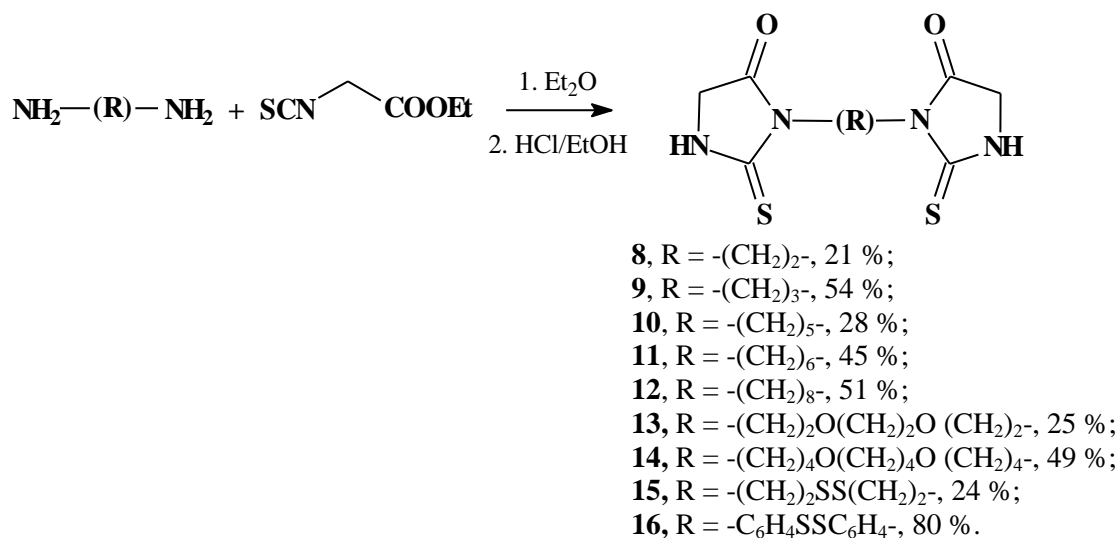
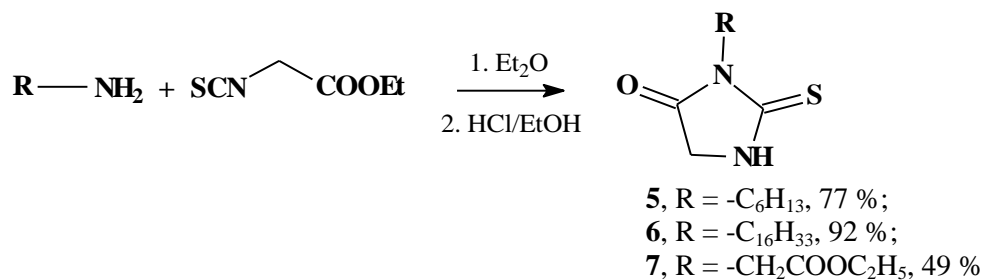


1, 90 %

Реакция алкил- или арилизоотиоцианата с глицином в смеси пиридин-вода в присутствии гидроксида натрия приводила к образованию замещенной тиомочевины, которую затем без выделения циклизовали в целевые продукты **2-4** действием концентрированной соляной кислоты:



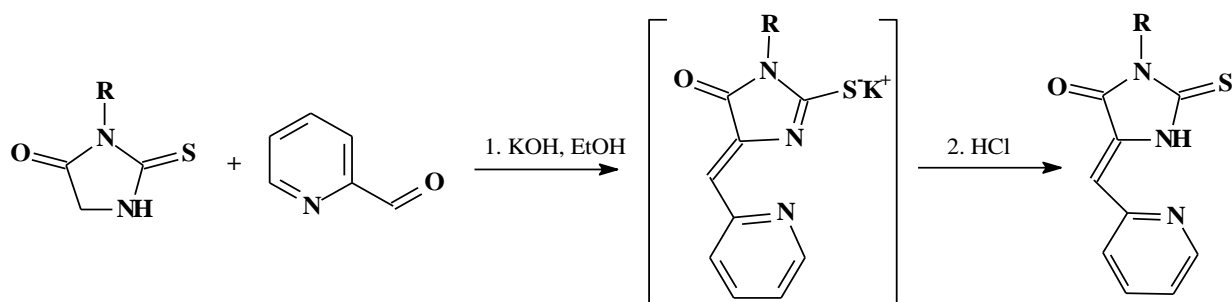
Для получения ранее не описанных моно- и бис-2-тиогидантоинов, содержащих гидрофобные и гидрофильные заместители при атоме N(3) тиогидантоинового цикла, был выбран и оптимизирован метод 2. Целевые соединения **5-16** были синтезированы при взаимодействии исходного изотиоцианатоэтилацетата и серии различных аминов в эфире с получением промежуточных тиомочевин и последующей циклизацией в конечные 2-тиогидантоины под действием концентрированной соляной кислоты в этиловом спирте.



Все полученные соединения охарактеризованы данными спектроскопии ЯМР ¹H и ИК-спектроскопии, состав подтвержден данными элементного анализа.

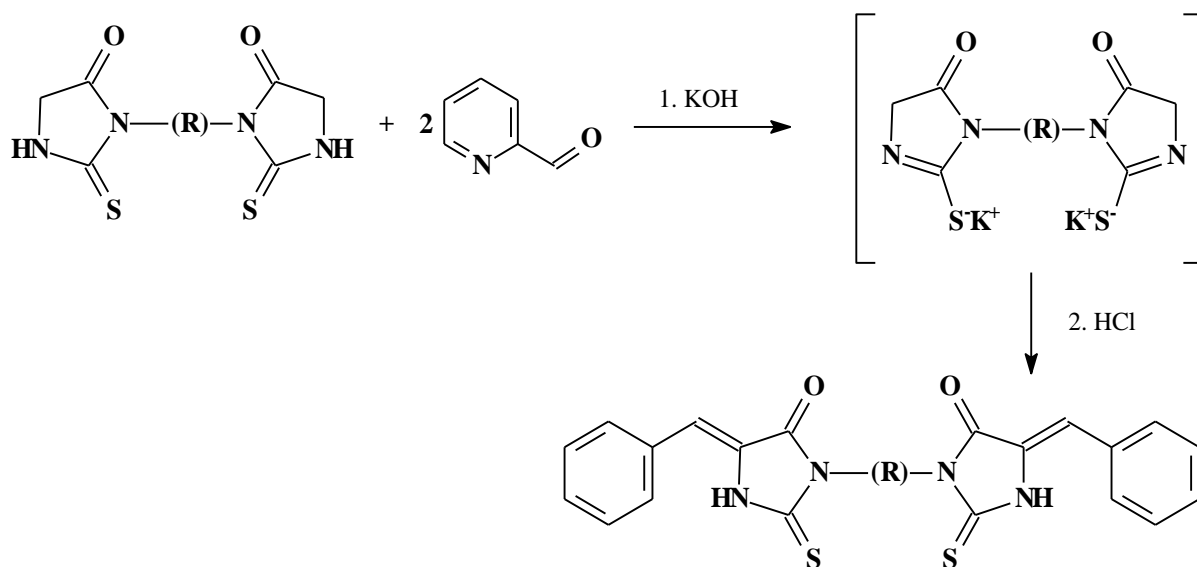
1.2. Синтез моно- и бис-5-пиридилметилзамещенных 2-тиогидантоинов

5-Пиридилметиленовые производные тиогидантоинов **17-22** были получены с использованием двухстадийного one-pot синтеза.



- 17**, R = Me, 85 %;
18, R = Ph, 95 %;
19, R = Allyl, 90 %
20, R = -C₆H₁₃, 67%;
21, R = -C₁₆H₃₃, 83%;
22, R = -CH₂COOC₂H₅, 62 %

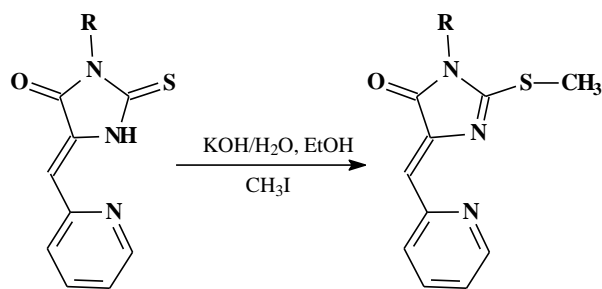
Для получения бис-2-тиогидантоинов **23-31**, содержащих два тиогидантоиновых фрагмента, соединенных через атомы азота в положении 3 тиогидантоинового цикла различными мостиковыми группировками, использована аналогичная методика:



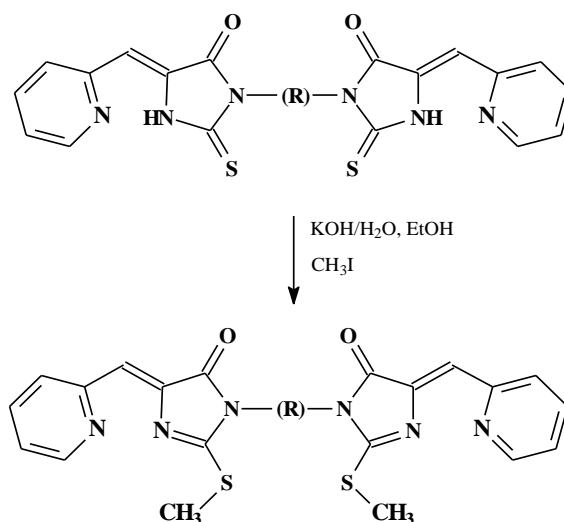
- 23**, R = -(CH₂)₂-, 21 %;
24, R = -(CH₂)₃-, 79 %;
25, R = -(CH₂)₅-, 96 %;
26, R = -(CH₂)₆-, 82 %;
27, R = -(CH₂)₈-, 80 %;
28, R = -(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂-, 83 %;
29, R = -(CH₂)₄O(CH₂)₄O(CH₂)₄-, 33 %;
30, R = -(CH₂)₂SS(CH₂)₂-, 73 %;
31, R = -C₆H₄SSC₆H₄-, 81 %.

1.3. Алкилирование моно- и бис- производных 2-тиогидантоинов метилиодидом

Замещенные в 3-м положении 2-тиогидантоины **19**, **21**, **22**, **24-28**, **31** вводились в реакции алкилирования метилиодидом. Выделены продукты S-алкилирования – 5-пиридилметилен-2-метилтио-имидазол-4-оны **32-40**, структура которых подтверждена данными ЯМР ^1H и ИК-спектроскопии, состав – данными элементного анализа.



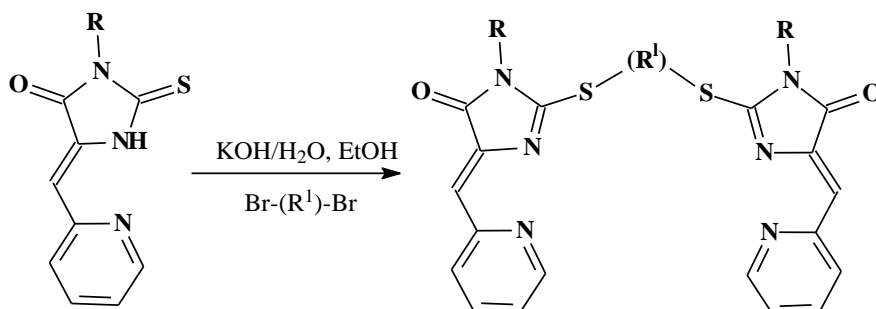
32: R = Allyl, 74 %;
33: R = $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, 92 %;
34: R = $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, 31 %;



35: R = $-(\text{CH}_2)_3-$, 84 %;
36: R = $-(\text{CH}_2)_5-$, 72 %;
37: R = $-(\text{CH}_2)_6-$, 65 %;
38: R = $-(\text{CH}_2)_8-$, 25 %;
39: R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, 50%;
40: R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4-$, 31 %.

1.4. Алкилирование моно- и бис- производных 2-тиогидантоинов α,ω -дигалогенидами

Алкилирование 2-тиогидантоинов дигалогенидами позволило получить производные **41-45**, содержащие два донорных 5-(2-пиридил)-2-тиоимидазолоновых фрагмента. Данную реакцию проводили в диметилформамиде в присутствии карбоната калия:



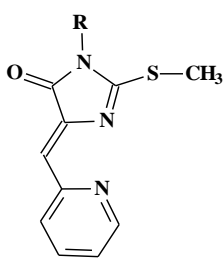
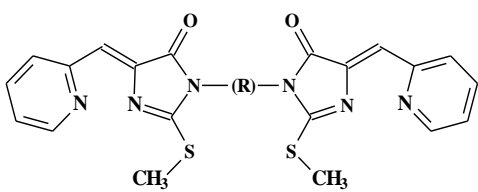
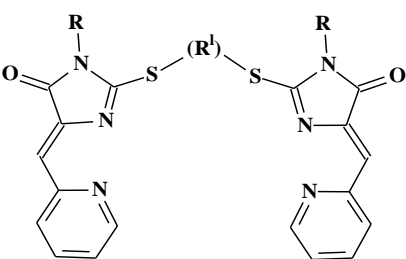
41: R = Allyl, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 89%; **42:** R = C_6H_{13} , R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 51%; **43:** R = $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 32%; **44:** R = Me, R' = 9,10-MeAnt*, 88%; **45:** R = Ph, R' = 9,10-MeAnt*, 97%.

* - Ant – антрацен.

Состав полученных соединений подтвержден данными элементного анализа, а строение - данными ЯМР ^1H и ИК-спектроскопии.

2. Синтез координационных соединений с производными 5-пиридилметилден-2-алкилтио-имидазол-4-онов

Все синтезированные 5-пиридилметилден-2-алкилтио-имидазол-4-оновые лиганды можно разделить на 3 структурных типа:

| Тип 1 | Тип 2 | Тип 3 |
|--|--|---|
|  |  |  |
| <p>32: R = Allyl; 33: R = $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$; 34: R = $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$</p> | <p>35: R = $-(\text{CH}_2)_3-$; 36: R = $-(\text{CH}_2)_5-$; 37: R = $-(\text{CH}_2)_6-$; 38: R = $-(\text{CH}_2)_8-$; 39: R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$; 40: R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4$</p> | <p>41: R = Allyl, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$; 42: R = C_6H_{13}, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$; 43: R = $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$; 44: R = Me, R' = 9,10-MeAnt; 45: R = Ph, R' = 9,10-MeAnt</p> |

Лиганды типа **1** потенциально способны образовывать мооядерные хелатные комплексы, координируя ионы металлов пиридиновым атомом азота и атомом азота N1 имидазолонового цикла, неподеленная электронная пара которого копланарна пиридиновому фрагменту. В отличие от них, лиганды типов **2** и **3** способны к образованию биядерных комплексов.

Координационные соединения с Cu(II) были получены при смешивании растворов тиогидантоиновых лигандов и растворов дигидрата хлорида меди(II) в смеси CH_2Cl_2 -MeOH при комнатной температуре. Структуры всех полученных комплексов подтверждены данными ИК-спектроскопии, а состав – элементным анализом.

2.1. Синтез координационных соединений с лигандами Типа 1

Лиганды типа **1** (**32-34**) хорошо растворимы в органических растворителях. Поэтому для получения их кристаллических координационных соединений использован метод медленной диффузии соли металла в раствор лиганда.

В случае лиганда **32**, содержащего в качестве заместителя при атоме азота N(3) аллильный фрагмент, вместо ожидаемого координационного соединения состава $\text{L}\cdot\text{CuCl}_2$

из раствора кристаллизуется ранее описанный биядерный комплекс **32a**, структура которого ранее доказана методом РСА (Рисунок 1).

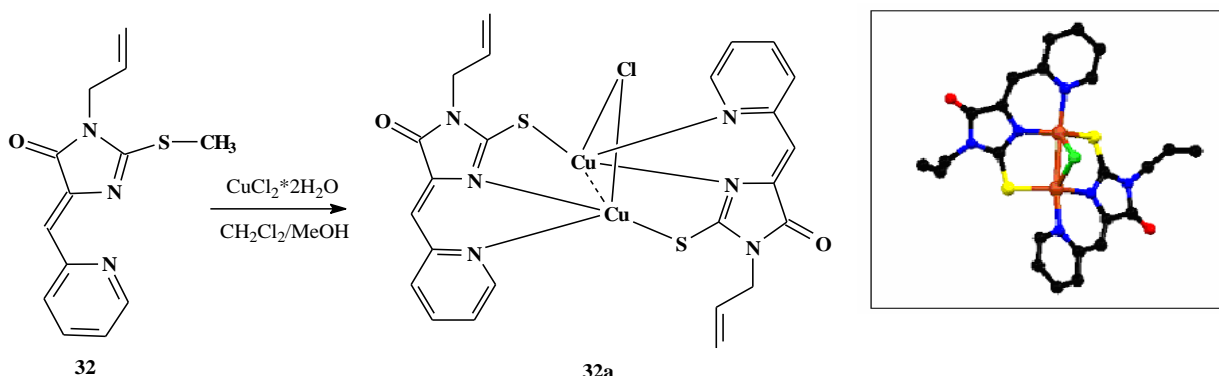
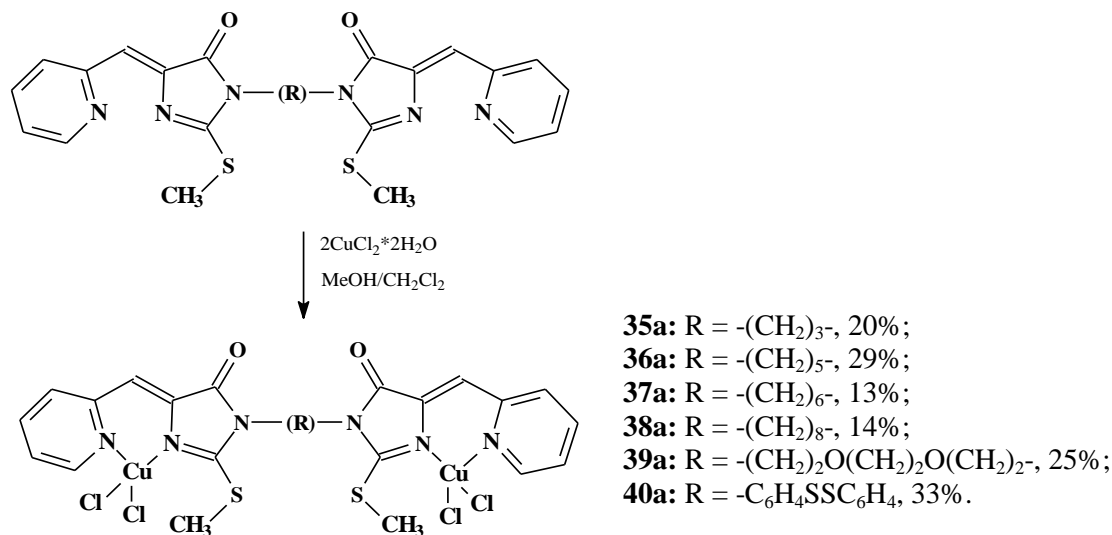


Рисунок 1. Схема синтеза комплекса **32a** и его молекулярная структура

По данным РСА два атома меди в комплексе эквивалентны, и каждый из них связан с атомом серы и с двумя атомами азота пиридинового и имидазольного циклов. Два атома меди также связаны между собой мостиковым атомом хлора.

2.2. Синтез координационных соединений с лигандами Типа 2

Для синтеза координационных соединений лигандов типа **2** использована методика, аналогичная использованной для получения координационных соединений с лигандами типа **1**.



При этом впервые получены координационные соединения бис-5-пиридилметилден-2-алкилтиоимидазолонов, соединенных различными мостиковыми группировками через атомы азота в 3-м положении тиогидантоинового цикла.

2.3. Синтез координационных соединений с лигандами Типа 3

В ходе предыдущих исследований нашей научной группы на основе лиганда **41** было получено соединение **41a**, показавшее наиболее высокую цитотоксичность при исследованиях на клеточных линиях MCF-7, HEK293 и SiHa.

Однако попытки получения аналогичных **41a** комплексных соединений с лигандами **42-44** не увенчались успехом: в результате смешивания растворов лигандов и раствора хлорида меди ожидаемые комплексы не выпадали. В реакции с участием лиганда **45** был получен комплекс **45a** (Рисунок 2).

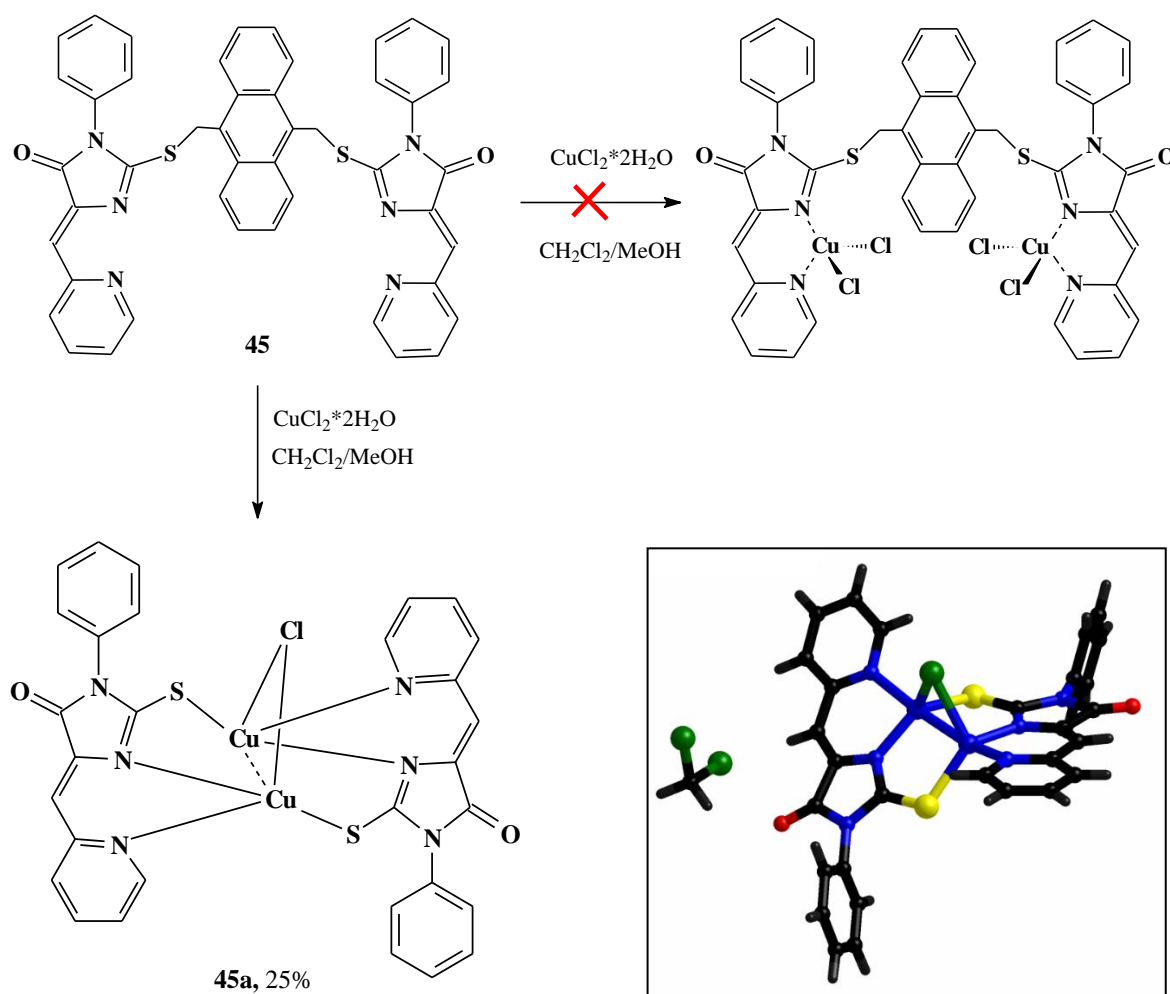
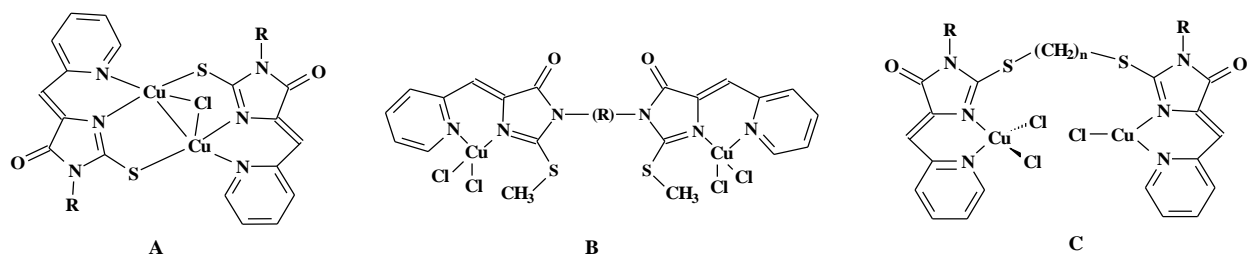


Рисунок 2. Схема образования и молекулярная структура полученного координационного соединения **45a**

3. Физико-химические исследования лигандов и координационных структур

Все полученные в данной работе координационные соединения 5-пиридилметил-2-алкилтиоимидазолонов можно разделить на три типа, в соответствии с различным координационным окружением ионов меди в комплексе, а также природой заместителей имидазольного цикла лиганда.



В качестве модельных соединений для оценки физико-химических параметров выбраны представители каждого структурного типа лигандов – соединения **32**, **37** и **41**, а также их комплексы **32a**, **37a** и **41a**.

Предварительным этапом работы было исследование кинетической и термодинамической устойчивости на основании УФ-спектров поглощения модельных соединений в средах ДМСО и ДМСО-вода.

Спектры поглощения показывают схожесть хромофорных групп, содержащих ароматический и гетероциклический фрагменты и сопряженные связи, для каждого типа лигандов. Максимумы на спектрах лигандов совпадали: 282–283 нм для **32a** и **37a** (288 нм для **41a**), 372 нм для **32a** и **37a** (374 нм для **41a**), и 391 нм (плечо) для **32a**, **37a**, **41a**. Молярные коэффициенты поглощения для **32a** ($\epsilon_{372} = 8.1 \times 10^3$ л/моль×см) и **37a** и **41a** ($\epsilon_{374} = 1.35 \times 10^4$ л/моль×см и $\epsilon_{372} = 1.45 \times 10^4$ л/моль×см соответственно) имеют соотношение 1:2, которое соответствует числу тиогидантоиновых циклов (хромофоров) в этих соединениях. Спектры комплексов схожи и имеют широкие полосы поглощения 345–348 (~ 1.1×10^4 л/моль×см), 365–369 нм (~ 1.1×10^4 л/моль×см), 397–399 нм (~ 1.2×10^4 л/моль×см), и 420 нм (~ 4×10^3 л/моль×см). Спектры каждого из лигандов и комплексов в ДМСО и в выбранных растворах ДМСО-вода в объемных соотношениях 15:5 – 5:15 отличаются незначимо.

Исходя из спектров поглощения выбраны диапазоны длин волн, которые характеризуются (1) максимальным отличием спектра поглощения комплекса от спектра соответствующего лиганда и (2) относительно низким светопоглощением лиганда для определения самого комплекса. Они составили 360-425 нм для **32a**, 365-408 нм для **37a** и 390-420 нм для комплекса **41a**.

Кинетическую стабильность комплексов **32a–41a** оценивали методом УФ-спектрофотометрии в выбранном растворителе ДМСО-вода в объемном соотношении 9:11. Показано, что комплексы стабильны в течение нескольких часов.

3.1. Оценка растворимости модельных лигандов и их комплексов в средах вода:ДМСО

Важной задачей является выбор подходящего растворителя для последующего применения комплекса металла в живых системах. Полученные лиганды и комплексы характеризуются относительно низкой растворимостью в воде, тогда как их растворимость в таких органических растворителях как ДМСО и ДМФА примерно в 100 раз выше растворимости в воде. Известно, что ДМСО допускается для применения в медицинской практике, поэтому для оценки растворимости мы выбрали водные среды с добавлением ДМСО. Было важно оценить, при каких соотношениях растворимость комплексных соединений в выбранных водно-органических средах была бы сопоставимой с растворимостью в ДМСО, а содержание органического растворителя было достаточно низким для минимизации его воздействия при введении в организм. Помимо этой задачи, для последующей оценки констант устойчивости модельных комплексов (см. ниже), необходимо было найти соотношение вода–органический растворитель, при котором как исследуемые координационные соединения, так и лиганды имели бы достаточно высокие концентрации для повышения точности определения констант.

Поскольку полноценное определение растворимости выходило за рамки этой работы, была проведена оценка растворимости модельных соединений в растворителях вода:ДМСО с превалирующим содержанием воды. Для такой оценки использовали относительное значение растворимости: т.е. максимальная растворимость для данного соединения (лиганда или комплекса) принималась за 1, а остальные значения рассчитаны как отношения к этой величине.

Для оценки растворимости использовали спектрофотометрию как наиболее простой метод, а также благодаря значительному светопоглощению всех выбранных соединений в УФ и видимой областях. Найдено, что спектры поглощения всех соединений меняются незначимо при изменении состава среды. Кроме того, полученные спектры поглощения лигандов в смеси ДМСО-вода аналогичны полученным спектрам поглощения в ДМСО.

При увеличении объемной доли ДМСО в системе растворимость лигандов увеличивается, растворимость лигандов меняется мало. Для соотношения ДМСО-вода 1:1 наблюдается наилучшая растворимость.

Для последующих исследований устойчивости комплексных соединений выбрана смесь ДМСО-вода 9:11 для обеспечения высокой растворимости как комплексов, так и лигандов, и возможности измерения рН в стандартных условиях (доля воды в смешанном растворителе более 50%).

В течение 1 ч регистрировали УФ-спектры поглощения растворов всех трех координационных соединений в этом растворителе. Спектры оставались неизменными в течение всего периода времени. Это говорит о высокой кинетической устойчивости комплексов.

3.2. Оценка устойчивости комплексов меди с выбранными модельными лигандами

Устойчивость комплекса металла имеет весьма важное значение при использовании его в качестве фармацевтического препарата.

Константы устойчивости для исследуемых соединений рассчитаны по разрушению комплексов за счет конкурирующего комплексообразования по меди с использованием этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Этот лиганд выбран в связи с тем, что комплексы с аминополикарбонowymi кислотами (комплексонами) образуются в соотношении 1:1, что исключает ступенчатое комплексообразование и упрощает расчеты. Константа устойчивости комплекса ЭДТА с медью ($\beta^\circ = 6.3 \times 10^{18}$) предположительно близка к константам исследуемых комплексов, при рН 7 условная константа устойчивости комплексоната меди равна 3.03×10^{15} . Наконец, светопоглощение комплексов меди с ЭДТА в выбранном диапазоне длин волн (максимальное поглощение исследуемых комплексов, см. выше) незначимо.

Для каждого из исследуемых комплексов построены зависимости оптической плотности от содержания ЭДТА в растворе, на которых видно разрушение комплексов под действием ЭДТА. На основании полученных данных рассчитаны условные константы устойчивости, из значений которых получены термодинамические константы (таблица 1).

Таблица 1. Константы устойчивости комплексов **32a** (8 параллельных измерений), **37a** (4 параллельных измерения), **41a** (7 параллельных измерений)

| № | β | $\lg \beta$ |
|------------|---|-------------|
| 32a | $6.67 (\pm 0.58) \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ | 15.8 |
| 37a | $5.70 (\pm 0.54) \times 10^{19} \text{ M}^{-1}$ | 19.9 |
| 41a | $4.88 (\pm 0.38) \times 10^{19} \text{ M}^{-1}$ | 19.7 |

Стабильность комплексов **37a** и **41a** состава $L:Cu = 1 : 2$ близка и выше по сравнению со стабильностью комплекса **32a**, состав которого $L:Cu = 1 : 1$. Стабильность комплекса **37a** незначительно выше по сравнению со стабильностью комплекса **41a**. Полученные для комплекса **32a** результаты сравнимы с константами устойчивости для других медьсодержащих низкомолекулярных комплексов (комплексы на основе лигандов бензоилацетона и нитрилотриуксусной кислоты), при этом значения констант для комплексов **37a** и **41a** значительно их превышают.

Для определения состава комплексных соединений использовали метод Остромысленского–Жоба (метод изомолярных серий).

Для всех исследованных лигандов на основании метода изомолярных серий в растворе можно сказать, что образуются комплексы в соотношении $L:Cu = 1:1$.

Полученный результат применим только для предварительной оценки стехиометрии в растворе. Для координационного соединения **32a** результаты PCA демонстрируют идентичный состав комплексного соединения. Однако для комплексов **37a** и **41a** на основании данных элементного анализа, а также полученных ранее данных PCA (в случае комплекса **41a**) состав обоих комплексов соответствует соотношению $L:Cu = 1:2$, что не совпадает с результатами по определению стехиометрии методом изомолярных серий.

3.3. Исследование модельной каталитической реакции¹

Медьсодержащий фермент N_2O -редуктаза отвечает за восстановление N_2O до N_2 на последней стадии круговорота азота в природе. Предполагаемый механизм восстановления N_2O до N_2 включает координацию молекулы оксида азота по двум атомам меди каталитического сайта Cu_I-Cu_{IV} .

Изучено электрохимическое поведение комплексов **32a** и **45a** в отсутствие и в присутствии N_2O методами циклической вольтамперометрии (ЦВА) на стеклоуглеродном (СУ) электроде в растворах ДМФА в присутствии 0.1 М Vu_4NClO_4 в качестве индифферентного электролита. Потенциалы электрохимического окисления и восстановления измерены относительно $Ag|AgCl|KCl(нас.)$ и представлены в таблице 2.

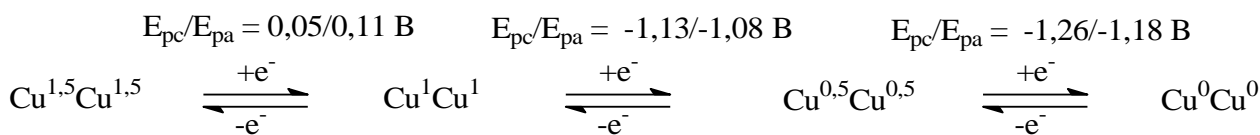
¹ Электрохимические исследования выполнены совместно с к.х.н., н.с. А.А. Моисеевой (химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова)

Таблица 2. Потенциалы окисления (E^{Ox}) и восстановления (E^{Red}) комплексных соединений **32a** и **45a**, измеренные методом ЦВА на стеклоуглеродном электроде

| Соединение | E_p^{Red} | E_p^{Ox} |
|------------|--|-------------------|
| 32a | 0.09/0.12 ^{b)} -0.15/-1.00 -1.14/-1.10 -1.77 | 0.46/0.38 |
| 45a | 0.05/0.11 ^{b)} -1.13/-1.08 -1.26/-1.18 -1.84 | 0.47/0.37 |

^{a)} E_{pc} – потенциалы пиков (скорость развертки потенциала 200 мВ с⁻¹); после косой черты потенциалы обратных пиков.
^{b)} Начальный потенциал 0.24 В

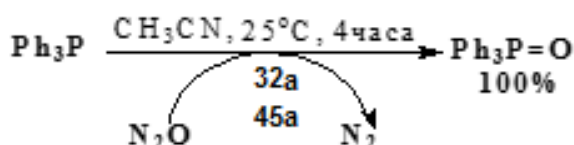
Оба исследованных комплекса имеют сходный характер окисления и восстановления. Так, для комплекса **45a** при сканировании в катодную область потенциалов на кривой ЦВА наблюдали три обратимых одноэлектронных редокс-процесса, вероятно соответствующих трём последовательным переходам



В анодной области ЦВА наблюдается квазиобратимый пик $E_{\text{pa}}/E_{\text{pc}} = 0.47/0.37$ В, очевидно, соответствующий переходу $\text{Cu}^{1,5}\text{Cu}^{1,5} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$.

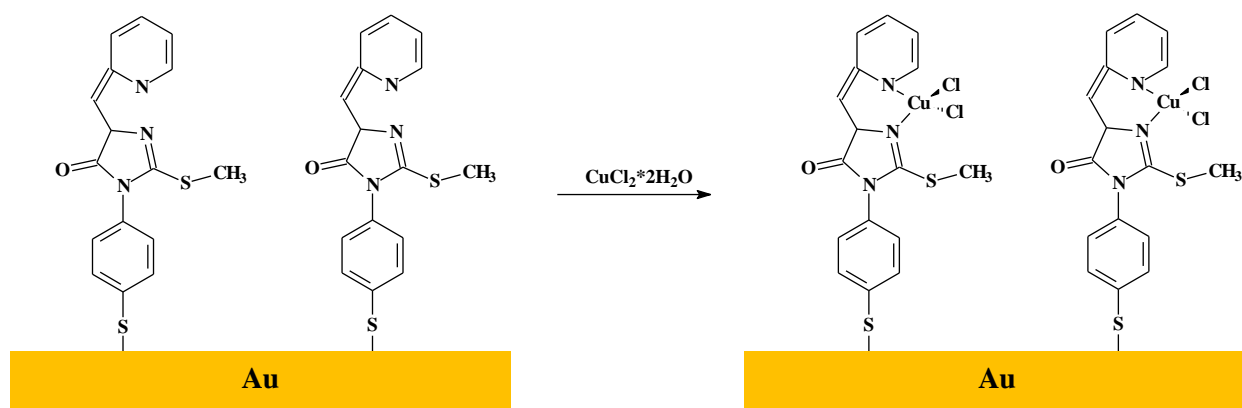
Каталитический прирост тока в присутствии N_2O наблюдали только при потенциалах адсорбционного предпика ($E^{\text{Red}} = -0.84$ В) и второго катодного пика ($E^{\text{Red}} = -1.13$ В), соответствующего образованию интермедиата $\text{Cu}^{0,5}\text{Cu}^{0,5}$.

Таким образом, комплексы **32a** и **45a** способны катализировать восстановление N_2O до N_2 в мягких условиях при умеренных потенциалах (около -1.0 В). Каталитическое действие комплексов **32a** и **45a**, структурные центры которых подобны центру в ферменте N_2O -редуктаза, изучено в модельной реакции окисления PPh_3 . Установлено, что в присутствии 5 мол.% комплексов **32a** и **45a** реакция образования оксида трифенилфосфина проходит на 100% в течение 4 ч при комнатной температуре, при этом выход Ph_3PO в реакции окисления PPh_3 с N_2O в отсутствие исследуемых комплексов в тех же условиях составляет только 8%.



3.4. Исследование адсорбции лигандов на поверхности золота²

Помимо получения комплексных соединений меди(II) с органическими лигандами в кристаллическом состоянии, исследована возможность образования таких комплексов с лигандами, адсорбированными на поверхности золота, методом измерения краевых углов натекания и отекания. В качестве модельного соединения для изучения образования самоорганизующихся монослоев на поверхности золота исследован (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] **40** и изучено образование его комплексного соединения на поверхности по следующей схеме:



Используя теорию смачивания гетерогенных поверхностей, рассчитана степень заполнения поверхности золота (x) адсорбционным слоем. Измерения краевых углов на модифицированных поверхностях показали, что монослой полностью формируется через 3 ч выдерживания в растворе лиганда **40**, при этом степень заполнения поверхности составляет 46 %.

Значительный гистерезис краевых углов монослоя, содержащего $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, свидетельствует о неоднородности поверхности монослоя, что, возможно, связано с наличием в молекуле лиганда донорных атомов различной природы (азота, серы и кислорода), которые могут связываться с атомами меди, или с неполным протеканием реакции комплексообразования, в результате чего на поверхности остается большое число некоординированных лигандных фрагментов.

Рассчитана удельная свободная поверхностная энергия монослоя σ_{sv} . Получено, что $\sigma_s^d = 12 \text{ мДж/м}^2$, $\sigma_s^p = 22 \text{ мДж/м}^2$, $\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p = 34 \text{ мДж/м}^2$, т.е. удельная поверхностная энергия монослоя комплекса незначительно возрастает по сравнению с энергией модифицированной монослоем лиганда **40** золотой поверхности.

² Данная часть работы выполнена совместно с к.х.н., доц. Должиковой В.Д. и к.х.н., доц. Богдановой Ю.Г., кафедра коллоидной химии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

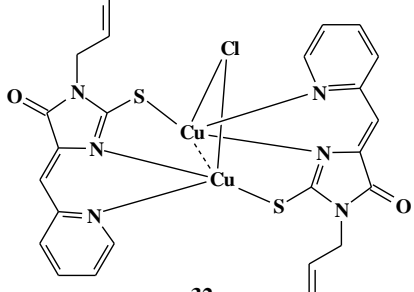
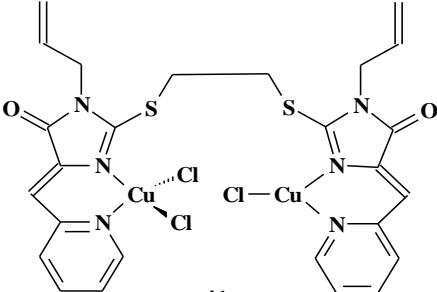
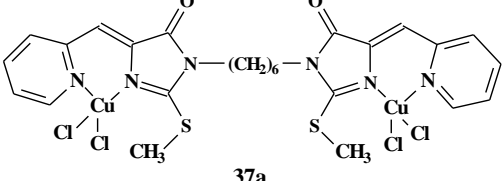
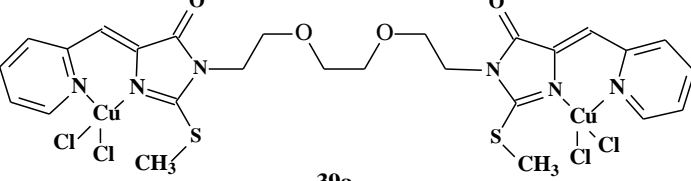
Полученные экспериментальные данные могут служить основой для получения в дальнейшем НЧ золота, стабилизированных лигандом **40** с последующим образованием комплексных соединений данного лиганда на поверхности золота.

3.5. Оценка цитотоксичности полученных координационных соединений³

На заключительном этапе проведено исследование биологической активности модельных координационных соединений. В качестве модели был выбран фермент теломераза, который экспрессируется в 80% опухолевых клеточных линий. Для исследования биологической активности использовали метод амплификации теломерных повторов TRAP.

Результаты исследования приведены в таблице 3:

Таблица 3. Значения IC_{50} , измеренные для комплексов **32a**, **37a**, **39a**, **41a**

| | |
|--|--|
|  <p style="text-align: center;">32a</p> <p>$IC_{50} = 100.1 \pm 1.6 \text{ мкМ}^4$</p> |  <p style="text-align: center;">41a</p> <p>$IC_{50} = 2.1 \pm 0.8 \text{ мкМ}$</p> |
|  <p style="text-align: center;">37a</p> <p>$IC_{50} = 4.2 \pm 2.3 \text{ мкМ}$</p> |  <p style="text-align: center;">39a</p> <p>$IC_{50} = 6.1 \pm 1.9 \text{ мкМ}$</p> |

Согласно полученным ранее в нашей научной группе данным⁵, механизм цитотоксического действия комплексов меди с тиогидантоиновыми лигандами не включает образование активных форм кислорода, а деградация ДНК, по-видимому, происходит за счет интеркаляции.

Для координационного соединения **32a** величина IC_{50} оказалась существенно выше, чем для ранее полученных. Значение IC_{50} для комплекса **37a** составило 4.2 мкМ. Можно

³ Данная часть работы выполнена совместно с зав. кафедрой ХПС Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова д.х.н., академиком РАН, профессором Донцовой О.А. и к.х.н., доц. Зверевой М.Э.

⁴ Юдина А.В. Новые органические лиганды ряда 2-тиоксотетрагидро-4Н-имидазол-4-онов и 2-алкилтио-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов и их координационные соединения с Cu(II). Синтез и физико-химическое исследование. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва, 2012.

⁵ Красновская О.О. Синтез и физико-химическое исследование координационных соединений Co(II), Cu(II), Cu(I) на основе имидазолин-4-онов для биомедицинского применения. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва, 2016.

сделать вывод, что изменение степени окисления одного из атомов меди (два иона меди(II) в составе комплекса) и линкерного фрагмента между атомами азота (вместо линкера между атомами серы) не оказывает существенного влияния на величину IC₅₀ по сравнению с описанным ранее соединением-лидером.

4. Заключение

В работе синтезированы новые производные 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов, в том числе разработан метод получения нового типа производных 2-тиогидантоинов – бис-5-(2-пиридилметил)-замещенных 2-тиогидантоинов, соединенных через атомы азота N(3) имидазолоновых фрагментов. Предложенная методика позволяет варьировать природу линкера, соединяющего два тиогидантоиновых фрагмента. Получен ряд координационных соединений разработанных лигандов с медью(II).

Оценены константы устойчивости трех основных типов тиогидантоиновых комплексов с использованием ЭДТА в подходящем для синтезированных соединений растворителе ДМСО-вода 9:11, показавшая возможность простой и экспрессной оценки стабильности координационных соединений с тиогидантоиновыми лигандами различной природы.

Помимо этого, показана цитотоксическая активность полученных координационных соединений и возможность их получения в адсорбированной на поверхности золота форме.

Выводы

1. Предложены новые и оптимизированы ранее описанные методы синтеза моно- и бис-5-(2-пиридилметилден)-замещенных 2-тиогидантоинов и их S-алкилированных производных.
2. Разработаны методы получения новых классов органических лигандов – бис-5-(2-пиридилметилден)-2-тиогидантоинов и бис-5-(2-пиридилметилден)-2-алкилтио-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми, диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов.
3. Синтезированные лиганды – производные 5-(2-пиридилметилден)-замещенных 2-тиогидантоинов исследованы в реакциях комплексообразования с хлоридом меди(II). Показано, что в зависимости от структуры органического лиганда в качестве продуктов образуются либо биядерные координационные соединения Cu(II), либо смешанновалентные комплексы $[Cu^{1.5}Cu^{1.5}]$, представляющие собой низкомолекулярные модели фермента N₂O редуктаза.
4. Впервые исследована стабильность медьсодержащих координационных соединений с производными 2-тиоксо-тетрагидро-4H-имидазолонов **32**, **37**, **41** в водно-органической среде и стехиометрия координационных соединений **32a**, **37a**, **41a** в растворе ДМСО:вода. Определены константы устойчивости комплексных соединений **32a**, **37a**, **41a**.
5. Установлена возможность адсорбции лиганда **40** на поверхности золота с последующим образованием координационного соединения хлорида меди(II) с адсорбированным лигандом. Рассчитана степень заполнения поверхности золота адсорбционным слоем.
6. Показана каталитическая активность смешанновалентных комплексов $[Cu^{1.5}Cu^{1.5}]$ с лигандами **32a** и **45a** в реакциях восстановления оксида азота(I) до азота и окисления фосфинов.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. **Тищенко К.И.**, Белоглазкина Е.К., Проскурнин М.А., Мажуга А.Г., Муратова М.Е., Скворцов Д.А., Зык Н.В. Синтез (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-(алкан- α,ω -диил)бис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтио-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов] и координационных соединений меди(II) на их основе // Известия Академии наук. Серия химическая. - 2016. - Т. 65. - № 5. - с. 1254-1259.
2. **Tishchenko K.I.**, Beloglazkina E.K., Mazhuga A.G., Zyk N.V. Copper-containing enzymes: Site types and low-molecular-weight model compounds. // Review Journal of Chemistry. - 2016. - V. 6. - №1. - P. 49-82.
3. **Tishchenko K.**, Muratova M., Volkov D., Filichkina V., Nedosekin D., Zharov V., Proskurnin M. Multi-Wavelength Thermal-Lens Spectrometry for High-Accuracy Measurements of Absorptivities and Quantum Yield of Photodegradation of a Hemoprotein-Lipid Complex. // Arabian J. Chem. - 2016. - In press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.009>;
4. **Тищенко К.И.** Самоорганизующиеся монослои дисульфида 2-тиоксо-3-фенил-5-((*Z*)-2-пиридилметилена)-2-имидазол-4-она / Материалы XV Международной молодежной научной конференции «Ломоносов» 2010, секция «Химия». Москва. - с. 44. – 2010.
5. Мажуга А.Г., Агрон Л.А., Белоглазкина Е.К., Манжелей Е.А., Ромашкина Р.Б., **Тищенко К.И.**, Юдин И.В., Юдина А.В., Скворцов Д.А., Зверева М.Э., Зык Н.В. Органическая, координационная и медицинская химия производных 4-оксоимидазолидин-2-тионов. / Сборник тезисов докладов III Международной конференции "Химия гетероциклических соединений", посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Николаевича Коста. Москва. - с. 27. - 2010.
6. **Тищенко К.И.**, Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Синтез новых лигандов ряда 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов и координационных соединений на их основе / Сборник тезисов докладов Всероссийской научной конференции с международным участием посвященной международному году химии «Успехи синтеза и комплексообразования». Москва. – с. 134. – 2011.
7. **Тищенко К.И.**, Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В. Синтез координационных соединений на основе новых лигандов ряда 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов / Сборник тезисов докладов XXV Международной Чугаевской конференции по координационной химии. Суздаль. – с. 207. – 2011.
8. Муратова М.Е., **Тищенко К.И.**, Проскурнин М.А., Белоглазкина Е.К., Мажуга А.Г., Зык Н.В. Изучение координационных соединений меди(II) с органическими лигандами ряда 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онона / Сборник тезисов докладов I Всероссийской молодежной школы-конференции «Успехи синтеза и комплексообразования». Москва. – с. 154. – 2016.